รหัสโครงการ SUT1-104-53-36-09

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและต้านมะเร็งของฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum*)

Antioxidant anti-inflammatory and anticancer activities of Hoan Ngoc (*Pseuderanthemum palatiferum*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชา ปรีคลินิก

สำนักวิชา วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม/2561

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2555 ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้อย่างต่อเนื่องรวมทั้งความอดกลั้นที่โครงการนี้ล่าช้ากว่ากำหนด ขอขอบคุณบุคคลากรของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี บุคลากรในสถาบันวิจัยและพัฒนา เพื่อนคณาจารย์และบุคคลากรในสาขาวิชาปรีคลีนิก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่เกี่ยวข้องทุกท่าน สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย การอำนวยความสะดวกและบริการในทุก ๆส่วนที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนข้อแนะนำที่มีคุณค่าในงานวิจัย ขอขอบคุณ prof. Dr. Norbert Kaminski สำหรับการอนุเคราะห์ให้น.ศ. ไปเรียนรู้เทคนิคและการใช้เครื่อง real time PCR ที่ Centre of Integrative Toxicology ที่ Michigan State University ตลอดจนการให้คำแนะนำที่มีค่ายิ่ง และความร่วมมือในการต่อยอดงานบางส่วนเพิ่มเติมจากโครงการวิจัยนี้เพื่อใช้ในการตีพิมพ์ และ ขอขอบคุณทุนวิจัยปริญญาเอกกาญจนาภิเษกสำหรับการสนับสนุนค่าใช้จ่ายของน.ศ. ผู้รับทุนไปทำวิจัยที่ Centre of Integrative Toxicology, Michigan State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ผู้วิจัยขอขอบคุณ อ. ดร. สนอง สุขแสวง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาถ่ายทอดเทคนิคการเตรียม chick chlorioallantoic membrane เพื่อใช้ใน CAM assay ตลอดจนคำแนะนำที่มีค่ายิ่งในการทดลองเกี่ยวกับ angiogenesis โครงการวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้ ถ้าปราศจากทีมงานวิจัยที่ทำงานอย่างแข็งขัน อดทน และใฝ่รู้ของลูกศิษย์ที่น่ารักทุกคน ดร. พัชรวรรณ สิทธิศาสตร์ (ในขณะนั้นรับทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก) คุณเบญจวรรณ ดุนขุนทด คุณเบญจมาศ ศาลางาม และคุณรัตนา เกียรติทรงชัย ที่เป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการ ทุกคนมีส่วนสำคัญร่วมกันในการผลักดันให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดีในที่สุด

ท้ายสุดขอกราบบูชาพระคุณของคุณพ่อ-คุณแม่ ที่ให้ความรัก ความอบอุ่น อบรมสั่งสอนและดูแลลูกอย่างดีเยี่ยม ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ความรักและเมตตาอบรมสั่งสอนศิษย์เสมอมา ท้ายสุดขอขอบคุณครอบครัว รศ. ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์ และ นายโพธิพล จิตรสมบูรณ์ที่เป็นขวัญและกำลังใจ เป็นน้ำหล่อเลี้ยงให้มีพลังในการทำงาน ทำให้สามารถฟันฝ่าอุปสรรคทั้งปวงจนงานสำเร็จได้ในท้ายที่สุด

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.) เป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับการกล่าวอ้างว่ามีสรรพคุณทางยามากมาย แต่การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของฮว่านง็อกยังมีปริมาณจำกัด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก รวมถึงประเมินฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ซึ่งอาจเป็นพิษระยะยาวที่ผู้บริโภคมีความกังวลใจมากที่สุด ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบสดด้วย 95% เอทานอล (95EE-FLP) และสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำ (WE-FLP) (ได้จากการแยกเอาส่วนเฉพาะที่ละลายน้ำออกจาก 95EE-FLP) มีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดจากใบแห้ง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า 95EE-FLP และ WE-FLP เมื่อประเมินโดยวิธี DPPH และ FRAP มีค่าสูงกว่าสารสกัดจากใบแห้ง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสอดคล้องกับปริมาณของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบ ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อถูกชักนำโดย tBOOH เมื่อใช้ probe เรืองแสง DCFH-DA ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เกิดพิษต่อเซลล์ (50-250 μg/ml) แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) และการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการอักเสบ iNOS และ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 1 μg/ml LPS และ 25 U/ml IFN-γ รวมทั้งการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและ m RNA ของ pro-inflammatory cytokines TNF-α และ IL-6 ใน RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย 100 ng/ml LPS ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดพบว่าเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ของคนชนิดต่าง ๆ มีความไวต่อความเป็นพิษของ 95EE-FLP และ WE-FLP ต่างกัน โดยเซลล์มะเร็งที่มีความไวเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ Jurkat > HepG2 > MCF-7 > PC3 สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 250-1,500 μg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่เป็นเซลล์คนปกติ สารสกัดทั้ง 2 ชักนำเซลล์ Jurkat ให้เกิดการตายด้วยกลไก apoptosis ดังหลักฐานบ่งชี้ทางสัณฐานวิทยาของ apoptotic เซลล์ เอกลักษณ์การแตกหักของดีเอ็นเอแบบขั้นบันไดใน gel electrophoresis การย้อมติด annexin V-PI และการหลั่งของ cytochrome c จาก mitochondria สู่ cytosol การตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใน *in vivo* ด้วยโมเดล CAM พบว่าสารสกัด 95EE-FLP (100-300 μg/ml) และ WE-FLP (30-300 μg/ml) มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำโดยเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ B16F10 ที่ปลูกถ่ายใน CAM โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติใน CAM การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ *in vitro* พบว่า ในช่วงความเข้มข้น 150-600 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อ สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ต่อแบคทีเรีย *S typhimurium* TA98 และ TA100 เมื่อทดสอบในสภาวะทั้งที่มีและไม่มี S9 mix ในวิธีทดสอบของ Ames

โดยรวม สารสกัดจากใบฮว่านง็อกมีศักยภาพสูงในการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ยา หรือ ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อประยุกต์ใช้ในการบรรเทาอาการของโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของโรคมะเร็ง การอักเสบ และอนุมูลอิสระ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Hoan-Ngoc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk; PP) has been claimed to possess many pharmaceutical properties, nevertheless, the studies of its pharmacological properties are still very limited. The present study aimed to further investigate the phytochemicals and explore the antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of Hoan Ngoc. In addition, a long term mutagenic effect of Hoan Nogoc, the issue most concern among consumers, was also evaluated. The results suggested that 95% ethanol extract prepared from fresh leaves of PP (95EE-FLP) and the water extract of PP (WE-FLP) (water fraction extracted from 95EE-FLP) significantly exhibited higher total phenolic and flavonoid contents than those of dried leaf extracts. 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 generation in tBuOOH-induced oxidative stress in macrophage RAW264.7 cells as monitored by using DCFH-DA fluorescent probe. At non-toxic concentrations (50-250 μg/ml), both 95 EE-FLP and WE-FLP effectively exhibited anti-inflammatory activities as evidenced by inhibition of nitric oxide production and the expressions of pro-inflammatory enzymes iNOS and COX2 in 1 μg/ml LPS plus 25 U/ml IFN-γ-stimulated RAW264.7 cells. In addition, 95EE-FLP also suppressed LPS-induced TNF-α and IL-6 protein synthesis and mRNA expression in RAW264.7 cells. *In vitro* cytotoxicity of 95EE-FLP and WE-FLP towards various types of human cancer cell lines revealed different susceptibility of cancer cells, and the sensitivity was ranged in the descending order of Jurkat > HepG2 > MCF-7 > PC-3. At the concentration range of 250-1,500 μg/ml, 95EE-FLP and WE-FLP preferentially targeted Jurkat cells with less toxicity to normal human peripheral blood mononuclear cells. Furthermore, the induction of Jurkat cell death by the extracts was mediated via apoptosis mechanism as evidenced by characteristic morphological feature of apoptotic cells, DNA ladder in gel electrophoresis, annexin V-PI staining and the release of cytochrome c from mitochondria to cytosol. The results of *In vivo* anticancer study conducted in the CAM model revealed that 95EE-FLP (100-300 μg/ml) and WE-FLP (100-

300 µg/ml) selectively suppressed the melanoma B16F10-induced angiogenesis at 24 and 48 hr. while sparing the normal neovascularization on the CAM. The mutagenic study indicated that both extracts in the range of 150 to 600 µg/plate had no mutagenicity, either in the presence or absence of S9 mix, in the Ames assay.

Overall, the crude extracts from fresh leaf of Hoan Ngoc has high potential to be developed as natural chemopreventive products or nutraceuticals in combating development of cancer, chronic inflammation and oxidative stress-related diseases.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข-ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง-จ
สารบัญ	ฉ-ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ณ-ฐ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1-3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk	6-8
อนุมูลอิสระและการเกิดโรค	8-9
Nitric oxide, nitric oxide synthase, cyclooxygenase และ cytokines กับกระบวนการอักเสบ	9-12
การเกิดพัฒนาการของโรคมะเร็ง	12-13
กระบวนการ apoptosis	13-19
การหลีกเลี่ยงกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง	19-21
กระบวนการเกิดเส้นเลือดใหม่ในก้อนเนื้องอก	21-24
โมเดลของ Chick chlorioallantoic membrane (CAM)	25-27
การกลายพันธุ์ (Mutation)	28-32
สารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี และ ชุดวิเคราะห์	34-37
Antibodies	37-38
เซลล์สายพันธุ์ (Cell lines)	38
น้ำ	38
วัสดุ	38-39
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย	39-41
สถานที่ทำการวิจัย	41
การเตรียมสกัดสารจากพืช	41-46

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ปริมาณของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ของสารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อก 46-47
ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก.. 47-50
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเพื่อใช้กับเซลล์ RAW264.7.............................. 51-55
การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ.. 55-64
การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดฮว่านง็อก.. 64-75
การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดย Ames test.. 75-77
การวิเคราะห์ข้อมูล.. 77
บทที่ 4 ผลการวิจัย
การเตรียมสารสกัดจากใบฮว่านง็อก 78
สารพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก 79-81
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก 81-87
การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์.. 88-90
ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดฮว่านง็อก... 91-97
ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก.. 97-128
บทที่ 5 การวิจารณ์.. 129-155
บทที่ 6 สรุป
สรุปผลการวิจัย.. 156-157
ข้อเสนอแนะ.. 157-160
บรรณานุกรม... 161-190
ภาคผนวก A 191-200
ภาคผนวก B.. 201-202
ภาคผนวก C.. 203-204
ภาคผนวก D.. 205-208
ภาคผนวก E 209-213
ภาคผนวก F 214-247
ประวัติผู้วิจัย.. 248

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการตายแบบ apoptosis และ necrosis................ 16
4.1 ปริมาณสุทธิและเปอร์เซ็นต์ปริมาณสุทธิของสารสกัดที่เตรียมจากใบฮว่านง็อก
ด้วยวิธีต่างกัน 78
4.2 เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์
4 ชนิด.. 100
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP
ต่อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ภายใต้สภาวะที่มี
หรือ ไม่มี S9 mix 128

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 รูปใบ (A) และ ดอก (B) ของ ฮว่านง็อก (*Pseudeanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.	6
2.2 Cytokines ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง	11
2.3 แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่กำลังเกิด apoptosis (A) และ การกำจัดชิ้นส่วนของ apoptotic body โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว (B)	15
2.4 แสดงลักษณะขั้นบันได (DNA ladder) ของ DNA ที่ได้จากเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis	15
2.5 แสดงบทบาทของ p53 ในการรักษาเสถียรภาพของจีโนม	17
2.6 แสดง intrinsic และ extrinsic pathway ของการเกิด apoptosis	19
2.7 ปรากฏการณ์ของการสร้างเส้นเลือดใหม่ การสร้างโครงข่ายเส้นเลือดใหม่ออกจากเส้นเลือดที่มีอยู่เดิม	21
2.8 แสดงการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่แตกแขนงออกจากเส้นเลือดที่มีอยู่เดิม (A) และขั้นตอนของการสร้างเส้นเลือดใหม่ (B)	23
2.9 การสร้างหลอดเลือดใหม่ถูกควบคุมโดยความสมดุลระหว่างตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง เมื่อเนื้องอกต้องการพลังงาน สารอาหาร ออกซิเจน ก็จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (a) อย่างไรก็ตามตัวควบคุมเชิงลบหรือตัวยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ สามารถยับยั้งการทำงานของตัวกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ (b)	24
2.10 แสดงโครงสร้างของเนื้อเยื่อด้านนอกของตัวอ่อนในไก่	25
2.11 แสดงโครงสร้างของ CAM ที่ประกอบจากการหลอมของเยื่อจากถุง chorion และถุง allantois (A) และระบบเลือดที่มาหล่อเลี้ยง (B)	26
2.12 แสดงตัวอย่างผลลัพท์จากการกลายพันธุ์แบบ point mutation และการแทรกเพียงเบสเดียว หรือ การสูญหายของเพียงเล็กน้อย ไม่กี่เบส	30
2.13 แสดงความผิดปกติด้านโครงสร้างชนิดต่าง ๆ ของ chromosome	31
3.1 แสดงใบสดของฮว่านง็อก (A) ก่อนนำมาตัดและปั่นจนละเอียดใน blender (B)	43
3.2 แสดงเครื่อง vacuum rotary evaporator (A) และเครื่อง freeze dryer (B)	43
3.3 แสดงการนับเส้นเลือดที่บริเวณหนึ่งของแผ่น disk ที่วางบน CAM	74
3.2 แสดงเครื่อง vacuum rotary evaporator (A) และเครื่อง freeze dryer (B)	43
4.1 แสดงค่า total phenolic content ของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่มีเงื่อนไขการสกัดที่แตกต่างกัน	80
4.2 แสดงค่า total flavonoid content ของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่มีเงื่อนไขการสกัดที่แตกต่างกัน	81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.4 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดต่าง ๆ จากใบฮว่านง็อก เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน vitamin C, trolox และ catechin 83

4.4 การต้านออกซิเดชันของสารสกัดต่าง ๆ จากใบฮว่านง็อกเมื่อทดสอบโดย FRAP assay............ 84

4.5 แสดงการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ RAW 264.7 ของสารสกัดจากใบสด ฮว่านง็อกใน DCFH-DA assay ที่ช่วงระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 240 นาที นับตั้งแต่การเติม tBuOOH ใน culture เซลล์ RAW264.7 บ่มล่วงหน้ากับ สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (A) หรือบ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP (B) หรือ WE-FLP (C) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆเป็นระยะเวลา 24 ชม. ก่อนที่จะบ่มร่วมกับ 20 μM DCFH-DA probe เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการกระตุ้นด้วย 500 μM t-BuOOH............ 87

4.6 ผลของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 เมื่อประเมินโดย MTT assay (A และ B) หรือ trypan blue exclusion method (C และ D)............ 88-89

4.7 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อความเป็นพิษของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อประเมินโดยการย้อมด้วย PI 90

4.8 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ สารสกัด WE-FLP (B) ต่อการสร้าง NO ใน RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 μg/ml) ร่วมกับ IFN-γ (25 U/ml) เป็นระยะเวลา 24 ชม หลังจากที่ได้รับการบ่มเซลล์ล่วงหน้ากับ antioxidant positive control 500 M vitamin C สารสกัด 95EE-FLP หรือ สารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 ชม. วัดปริมาณ NO ทางอ้อมโดยวัดปริมาณ ของ nitrite ด้วย Griess reagent............ 92

4.9 ผลของสาสกัด 95EE-FLP ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (C) และ ผลของสารสกัด WE-FLP ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (B) และ COX-2 (D) ใน RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ 93-94

4.10 การยับยั้งการหลั่งของ TNF-α (A) และ IL-6 (B) จาก RAW264.7 เซลล์ที่ถูก กระตุ้นด้วย LPS โดยสารสกัดจากใบฮว่านง็อก 95EE-FLP เซลล์ RAW264.7 ($2x10^6$ เซลล์/หลุม) บ่มล่วงหน้ากับ ตัวทำลาย หรือ สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-250 μg/ml) เป็นเวลา 1 ชม. ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/ml) เป็นเวลา 8 ชม. ส่วนที่เป็น supernantant ใน culture ถูกจัดเก็บ และวิเคราะห์ ปริมาณของ TNF-α และ IL-6 ด้วยวิธีELISA............96

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.11 การยับยั้งการแสดงออกระดับ gene ของ TNF-α (A) และ IL-6 (B) ใน RAW264.7 เซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยสารสกัด 95EE-FLP เซลล์ RAW264.7 ($2x10^6$ เซลล์/หลุม) บ่มล่วงหน้ากับตัวทำลาย หรือ สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-250 µg/ml) เป็นเวลา 1 ชม. ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/ml) เป็นเวลา 8 ชม. total RNA ของเซลล์ถูกสกัดและหาปริมาณ mRNA ของ TNF-α และ IL-6 ด้วยเทคนิค qRT-PCR ใช้ Taqman primers และ probe normalize ค่า โดยใช้ endogenous 18S rRNA เป็นเกณฑ์และรายงานผลการแสดงออกของ gene เป็นจำนวนเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับสารสกัดใช้วิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 97

4.12 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ HepG2, MCF-7, PC-3, และ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดนาน 24 ชม... 99

4.13 การเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat และ PBMCs เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงก่อนประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay...101

4.14 แสดง DNA ที่เกิดการแตกหักแบบขั้นบันไดใน Jurkat เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (C) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชม. และจากการบ่ม Jurkat เซลล์ร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP (B) และ WE-FLP (D) ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชม......................................103

4.15 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสด้วยการย้อมเซลล์ Jurkat ด้วยสี Hoechst 33258 ภายหลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับตัวทำละลายควบคุม หรือ 40 µg/ml etoposide หรือสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือ ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงในการศึกษาหาระยะเวลาที่ชักนำให้เกิด apoptosis.. 105

4.16 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสด้วยการย้อมเซลล์ Jurkat ด้วยสี Hoechst 33258 ภายหลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับตัวทำละลายควบคุม หรือ 40 µg/ml etoposide หรือสารสกัดใบฮว่านง็อก WE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือ ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงในการศึกษาหาระยะเวลาที่ชักนำให้เกิด apoptosis.. 105

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.17 การวิเคราะห์รูปแบบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ Jurkat ที่ย้อมเซลล์ด้วย annexin V ร่วมกับ PI และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry หลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือ ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง 108

4.18 การวิเคราะห์รูปแบบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ Jurkat ที่ย้อมเซลล์ด้วย annexin V ร่วมกับ PI และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry หลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือ ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง 109

4.19 เปอร์เซ็นต์การหลั่งของ Cytochrome c จาก mitochondrial membrane ในเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. (A) หรือ บ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (B) 111

4.20 เปอร์เซ็นต์การหลั่งของ Cytochrome c จาก mitochondrial membrane ในเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดใบฮว่านง็อก WE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. (A) หรือ บ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (B) 112

4.21 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ B16F10 เมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆนาน 24 ชม..... 114

4.22 การชักนำให้สร้างเส้นเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็ง B16F10 และ bFGF ใน CAM model เมื่อ ระยะเวลา 24 ชม..... 116

4.23 การชักนำให้สร้างเส้นเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็ง B16F10 และ bFGF ใน CAM model เมื่อ ระยะเวลา 48 ชม..... 116

4.24 เปรียบเทียบการสร้างเส้นเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็ง B16F10 และ bFGF ใน CAM model ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชม..... 117

4.25 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM ที่ 24ชม..... 119

4.26 ผลของสารสกัด 95EE-F:P (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM ที่ 48 ชม..... 120

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.27 เปรียบเทียบผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM ระหว่าง 24 และ 48 ชม....121

4.28 การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 โดยสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ใน CAM model ที่ระยะเวลา 24 ชม.... 123

4.29 การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 .โดยสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ใน CAM model ที่ระยะเวลา 48 ชม.... 124

4.30 เปรียบเทียบผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 ใน CAM ระหว่าง 24 และ 48 ชม.... 125

4.31 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) WE-FLP (B) ต่อการเพิ่มของจำนวนเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 จากระยะเวลา 24 ถึง 48 ชม ใน CAM model....126

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากการศึกษาและงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผัก ผลไม้ และธัญพืชมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น สารกลุ่ม phenolics และกลุ่ม Flavonoids ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมนุษย์ ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (inflammation) (Kubola และ Siriamornpun, 2008; Atmani et al., 2009) สภาวะการอักเสบเรื้อรังเป็นสาเหตุหนึ่งของเกิดโรคมะเร็ง โดยก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย หรือ เสียหาย เป็นการเพิ่มโอกาสความผิดพลาดทางพันธุกรรม (genetic error) และชักนำให้เกิดกระบวนการกลายพันธุ์ (mutagenesis) อันเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญซึ่งชักนำให้เกิดโรคมะเร็งได้ต่อไป (Jakeson et al., 1997; Preston-Martin et al., 1990) pro-inflammatory cytokine เช่น IL-1β, IL-6, TNF-α, และ growth factor ต่างๆ ที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการอักเสบ สามารถกระตุ้นการทำงานของ Vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถชักนำการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis inducer) ทั้ง pro-inflammatory cytokine และ VEGF นำไปสู่การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และนำมาสู่การเจริญเติบโตของเนื้องอก (tumor growth) (Sheeja, Guruvayoorappan, และ Kuttan, 2007) นอกจากนั้น VEGF ยังมีบทบาทกระตุ้นการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) NO เป็นสารโมเลกุลทางชีวภาพที่สำคัญในร่างกาย เมื่ออยู่ในระดับปริมาณที่เหมาะสม NO ช่วยรักษาสภาวะสมดุลของสารชีวโมเลกุลอื่นๆ และมีบทบาทสำคัญในร่างกาย อย่างไรก็ตามเมื่อระดับของ NO อยู่ในระดับที่ไม่สมดุล คือมีระดับที่สูงเกินไปก็จะแสดงบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ การเกิดมะเร็ง และการทำลายตนเองของเซลล์ด้วยกระบวนการ apoptosis รวมถึงการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ด้วย (Sheeja et al., 2007; Coulter et al., 2008) ดังนั้น การเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) กระบวนการอักเสบ (inflammation) และกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesia) จึงมีความสัมพันธ์กัน และกระบวนการเหล่านี้เป็นปัจจัยเสริม หรือ ร่วมกันนำไปสู่การพัฒนาการเกิดโรคมะเร็ง รวมทั้งโรคเรื้อรังอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ

งานวิจัยในปัจจุบันชี้ชัดว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง flavonoids มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง ตัวอย่างเช่น มะระขี้นก *(Momordica charantia* L.) มีส่วนประกอบของ gallic acid, catechin, และ caffeic acid ซึ่งมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Kubola และ siriamopun, 2008) ในประเทศ Algeria พบพืชสมุนไพรที่มีสารประกอบphenolic ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง (Atmani et al., 2009) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเซลล์ (proliferation) โดยการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ของเซลล์สายพันธุ์ SKBR3 ที่เป็นเซลล์มะเร็งเต้านม และมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยยับยั้งการเกิด reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ (Moongakarndi et al., 2004) สารสกัดจากเมล็ดชาลาบาดอร์ (Labrador tea) *(Ledum groenlandicum* Retzius) ซึ่งมีสารประกอบ phenolic ในปริมาณสูง มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการหลั่งของ NO จากเซลล์สายพันธุ์แมคโครฟาจ Raw 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) นอกจากนั้น สารสกัดยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ DLD-1 และเซลล์มะเร็งปอด A-549 (Dufour et al., 2007) สารสกัดฟ้าทลายโจร *(Andrographis panicalata)* ที่มีสารประกอบหลัก (major compound) เป็น andrographolide และสารประกอบรอง (minor compound) เป็น andrograpanin มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งของมนุษย์เกิดการตายแบบ apoptosis ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (Zhou et al., 2006; Sheeja et al., 2007; Liu et al., 2008) นอกจากนั้น สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรยังสามารยับยั้งการสร้างเส้นเลือดฝอย (capillary) ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็งสร้างเม็ดสีของผิวหนัง B16F-10 melanoma ในหนูเม้าส์ C57BL/6 สารสกัดฟ้าทลายโจรนอกจากจะมีคุณสมบัติลด proangiogenic molecules (VEGF and NO) และ pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF-α และ GM-CFS) แล้ว ยังก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ anti-angiogenic molecules (IL-2 และ TIMP-1)) เมื่อศึกษาแบบ *in vitro* โดยใช้ rat aortic ring model (Sheeja et al., 2007) Yoon et al. (1995) รายงานว่าสารสกัด mistletoe *(Vism album coloratum)* สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง B16-BL6 เซลล์มะเร็งลำไส้ 26-M3.1และ เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง L5178Y-ML25 ในหนูเม้าส์ โดยยับยั้งการเติบโตของเนื้องอกและจำนวนของหลอดเลือดที่มาหล่อเลี้ยงเนื้องอก

สาร β-sitosterol เป็นพฤกษเคมี (phytochemical) ชนิดหนึ่งที่ส่วนใหญ่พบในพืช เช่น ถั่ว pecans ปาล์มเลื้อย (*Serenoa repens*), avocados, เมล็ดฟักทอง *(Curcurbita pepo), Pygeum africanum* มะม่วงหิมพานต์ น้ำมันข้าวโพด ถั่วเหลือง seabuckthorn และเก๋ากี้ (http://en.wikipedia .org /wiki/Beta-sitosterol) β-sitosterol มีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายด้าน อาทิเช่น ลด cholesterol

เพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ลดอาการอักเสบ ป้องกันอนุมูลอิสระไม่ทำลายเซลล์ และลดความเสี่ยงของมะเร็ง โดยสามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งทรวงอก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งลำไส้อีกด้วย (Saeidnia et al., 2014; Bouic et al., 1996; Baskar et al., 2012; Bandolier, 2001; Chai et al., 2008; Loizou et al., 2010; Park et al., 2007; Sugano et al., 1977; Holtz et al., 1998) ในยุโรป β-sitosterol ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคต่อมลูกหมากโต ผลการรักษาพบว่า β-sitosterol สามารถรักษาอาการต่อมลูกหมากโตได้โดยเพิ่มการหลั่งและลดปริมาณปัสสาวะที่ตกค้างในกระเพาะปัสสาวะ อย่างไรก็ตามขนาดของต่อมลูกหมากของกลุ่มผู้ป่วยที่รักษาด้วย β-sitosterol ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มผู้ป่วยที่รักษาด้วยยาหลอก (placebo group) (Berges et al., 1995; Wilt et al., 1999)

ในประเทศเวียดนาม ฮว่านง็อกเป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับการขนานนามว่า "สมุนไพรมหัศจรรย์" เนื่องจากสามารถนำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคต่าง ๆ ได้หลายชนิด เช่น บรรเทาอาการบาดเจ็บ โรคกระเพาะลำไส้อักเสบ ความดันโลหิต โรคไต ท้องร่วง เบาหวานและมะเร็ง เป็นต้น พยาธิสภาพของโรคดังกล่าวมีสาเหตุหลักจากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และกระบวนการอักเสบ ใบฮว่านง็อกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบโดยใช้ human blood peroxidase model (Dieu et al., 2006; วงศ์สถิต ฉั่วสกุล และ อรัญญา ศรีบุศราคัม 2551) สารสกัดจากใบฮว่านง็อกประกอบด้วย β-sitosterol และ apigenin-7-*O*- β-glucoside ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยามากมาย Backhouse et al. (2008) ได้รายงานว่า สวนผสมของสาร apigenin-β-glucoside, β-sitosterol และ stigmasterol ในใบของ *Buddleja globosa* มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ สามารถลดการบวม (edema) ในหนูเมาส์ที่ได้รับสารส่งเสริมการเกิดเนื้องอก (tumor promoter) 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้สูงว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ น่าจะมีศักยภาพในการต้านการอักเสบ และต้านการเกิดมะเร็ง ในปัจจุบัน แม้ว่าทั้งประชาชนในประเทศเวียดนามและประเทศไทยได้มีการใช้ใบฮว่านง็อกกันอย่างแพร่หลายและยาวนานเพื่อป้องกันและรักษาโรคต่างๆ แต่รายงานการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยเฉพาะการต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านมะเร็งยังมีปริมาณจำกัด ทั้ง ๆ ที่เป็นสรรพคุณของฮว่านง็อกอันเลื่องชื่อ เป็นที่กล่าวขานและอวดอ้างมากที่สุดในกลุ่มผู้ขายและผู้บริโภค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกควบคู่กับการศึกษาผลของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกต่อการกลายพันธุ์เพื่อตรวจสอบพิษเบื้องต้นในการบริโภคใบฮว่านง็อกในระยะยาว

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เสนอขอเพื่อตรวจสอบหาความเป็นพิษระยะยาวเบื้องต้น และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก โดยมีวัตถุประสงค์เฉพาะดังนี้คือ

1. หาปริมาณ polyphenols และ flavonoid ในสารสกัดจากใบฮว่านง็อก
2. หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกโดยใช้ DPPH assay, FRAP assay และ DCFH-DA assay
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกโดยทดสอบการยับยั้งการสร้าง NO, iNOS, COX-2 และ proinflammatory cytokines ต่าง ๆของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ/หรือ IFN-γ
4. ทดสอบความเป็นพิษและการชักนำของ ฮว่านง็อกให้เกิดการตายแบบ apoptosis ต่อเซลล์มะเร็ง *in vitro*
5. ทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก *in vivo* โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ใน chick chorioallantoic membrane (CAM) ที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็ง โดยเซลล์ B16-F10 melanoma
6. ทดสอบพิษก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกโดยใช้ Ames assay

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้จำกัดการศึกษาพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของฮว่านง็อกโดยใช้เฉพาะสารสกัดจากใบซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการบริโภค การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะใช้การทดสอบแบบ *in vitro* ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะจำกัดการทดสอบโดยใช้ DPPH, FRAP และ DCFH-DA assay ฤทธิ์ต้านการอักเสบใน *in vitro* จะจำกัดการศึกษาเฉพาะ RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ/หรือ IFN-γ หรือ PMA การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง ใน *in vitro* จะจำกัดการศึกษาพิษโดยตรงของสารสกัดจากใบ ฮว่านง็อกต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการคัดกรองว่ามีความไวต่อสารสกัด ส่วนฤทธิ์ต้านมะเร็งใน *in vivo* จะใช้ CAM โมเดล ที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งโดยใช้เซลล์ B16-F10 melanoma สำหรับฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะศึกษา *in vitro* โดยใช้ Ames assay

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของฮว่านง็อก จะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคที่ทวีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปัจจุบัน หรือช่วยการตัดสินใจสำหรับผู้ที่จะบริโภคในอนาคต

2. ข้อมูลด้านพิษวิทยาและฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการที่สนใจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับฮว่านง็อก เป็นการบริหารจัดการและใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด

3. ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สามารถวิจัยต่อยอดได้อีกมากมาย ฤทธิ์ทางชีวภาพของฮว่านง็อกที่ถูกอ้างอิงยังมีอีกหลายด้าน โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด และความดันโลหิต เป็นต้น งานวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวางแผนงานวิจัยทางคลินิกเพื่อใช้ฮว่านง็อกป้องกัน และรักษาโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ รวมทั้งให้ข้อมูลเบื้องต้นต่อการอนุมานผล (extrapolation) และออกแบบการทดลองใน *in vivo* ต่อไป หรือใช้วางแผนการทดลอง เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการบริโภคในคนที่ก่อให้เกิดพิษต่ำสุด

4. เป็นงานวิจัยที่ส่งเสริมองค์ความรู้เกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่เป็นภูมิปัญญาของชาวไทยมาช้านาน ถึงแม้ฮว่านง็อกจะมีถิ่นกำเนิดจากประเทศเวียดนาม แต่ฮว่านง็อกเป็นพืชที่สามารถปลูกและขยายพันธุ์ง่าย เติบโตได้ดีในสภาวะภูมิอากาศในประเทศไทย ถ้าฮว่านง็อกดีจริงตามสรรพคุณที่ถูกกล่าวขาน น่าจะสามารถนำไปสู่ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพหรือยา ชักนำให้เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจท้องถิ่น และช่วยลดปัญหาการเสียดุลการค้า สั่งยาหรืออาหารเสริมสุขภาพที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

5. ได้ความรู้ซึ่งสามารถถ่ายทอดแก่นักศึกษา ประชาชนท้องถิ่น และหน่วยงานการศึกษาทั้งภาครัฐและเอกชนที่สนใจ

6. ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสรรพคุณของฮว่านง็อก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อตำราแพทย์แผนไทย หรือแพทย์ทางเลือก เป็นการส่งเสริมองค์ความรู้ของภูมิปัญญาไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk)

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. หรือ ฮว่านง็อก จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเวียดนาม ฮว่านง็อกถูกค้นพบในช่วงครึ่งหลังของปี 1990 ที่ Cuc Phuong forest ทางตอนเหนือของประเทศเวียดนาม และได้ถูกนำมาปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศเวียดนามในลักษณะของพืชสมุนไพรและไม้ประดับ (Dieu et al., 2005; Dieu et al., 2006) ในประเทศไทย ฮว่านง็อกถูกนำเข้ามาโดยกลุ่มทหารผ่านศึกสมัยสงครามเวียดนามผ่านทาง อิสานตอนใต้ เช่น จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดบุรีรัมย์ และจังหวัดศรีษะเกษ ฮว่านง็อกมีชื่อเรียกในภาษาไทยว่า “ว่านลิง” หรือ “พญาวานร”

ฮว่านง็อกเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยม เปลือกต้นผิวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปรีถึงรูปใบหอก กว้าง 3-5 ซม. ยาว 5-15 ซม. โคนใบสอบ ปลายใบแหลมเรียว ขอบใบเรียบ มีเส้นแขนงใบ 8-11 คู่ ผิวใบมีขนยาวห่าง (pilose) ดอกช่อแยกแขนงแบบช่อเชิงลด (spicitiform paniculate) ใบประดับรูปแถบหรือไม่มีใบประดับ มีก้านดอกย่อย ยาวประมาณ 0.5 มม. มีขนสั้นนุ่มที่ใบประดับ ก้านดอกย่อยและกลีบเลี้ยง กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ รูปแถบ วงกลีบดอกสีชมพู น้ำเงิน ม่วง หรือ เกือบดำ (วงศ์สถิต ฉั่วสกุล และ อรัญญา ศรีบุศราคัม, 2551) (รูปที่ 2.1)

รูปที่ 2.1 รูปใบ (A) และ ดอก (B) ของ ฮว่านง็อก (*Pseudeanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. (http://kusherb.exteen.com/page/3; http://www.bloggang.om/viewdiary.php.)

ชาวเวียดนามเชื่อว่าฮว่านง็อกเป็นพืชสมุนไพรมหัศจรรย์ เพียงการเคี้ยวใบสด และการดื่มน้ำที่คั้นจากใบสดหรือผ่านการต้มของฮว่านง็อก ก็สามารถรักษาอาการของโรคต่าง ๆ ได้หลายชนิด เช่นอาการบาดเจ็บ ปวดท้อง ลำไส้อักเสบ ความดันโลหิต โรคไต ท้องร่วง เบาหวานและมะเร็ง เป็นต้น นอกจากรักษาโรคในคน ฮว่านง็อกยังถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อรักษาและป้องกันโรคของสัตว์อีกด้วย (Dieu et al., 2005; Dieu et al., 2006) ในประเทศไทย มีการปลูกฮว่านง็อกอย่างแพร่หลาย คนไทยนิยมใช้ใบของฮว่านง็อกมาป้องกันและรักษาอาการของโรคหลายชนิด เช่น อาการเจ็บปวดเมื่อยของผู้สูงอายุ การบาดเจ็บ โรคที่เกี่ยวกับระบบประสาท ไข้หวัด ความดันโลหิต โรคที่เกี่ยวกับกระเพาะอาหารและลำไส้ โรคไต โรคตับ เบาหวาน รวมทั้งโรคมะเร็ง (มูลนิธิเพื่อสุขภาพไทย) ในประเทศไทยนิยมใช้ใบฮว่านง็อกสำหรับบรรเทาอาการของโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของคนไทย (สำนักงานพัฒนาระบบข้อมูลข่าวสารสุขภาพ) แม้ใบฮว่านง็อกจะถูกใช้อย่างแพร่หลายในกลุ่มผู้บริโภคโดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็ง แต่ในปัจจุบัน ยังขาดข้อมูลวิจัยและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันสรรพคุณต่าง ๆ ของฮว่านง็อก และรายงานการศึกษาที่พอมีเกี่ยวกับฮว่านง็อก ส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่กระทำในประเทศเวียดนาม Dieu et al. (2006) และ Dieu (2008) รายงานว่า ส่วนประกอบทางเคมีของใบฮว่านง็อกเป็นสารผสมระหว่าง apigenin-7-*O*-β -glucoside 1-triacontanol, salicyclic acid, และ pseuderantin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนและมีความคงตัวสูงในความร้อน ส่วนสารอาหารต่างๆ ที่พบในใบฮว่านง็อกได้แก่ โปรตีน (พบในปริมาณ 30.8 % ของน้ำหนักแห้ง) เกลือแร่ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดง ส่วนกรดอะมิโนที่พบคือ lysine, methionine, และ threonine (Dieu et al., 2005) Dieu et al. (2006) ได้เปรียบเทียบฤทธิ์การบรรเทาอาการท้องร่วงในลูกสุกรระหว่างใบสดและใบแห้งของฮว่านง็อกกับยาปฏิชีวนะ Coli-Norgent และ Cotrimxazol และพบว่าฤทธิ์ของใบฮว่านง็อกให้ผลดีเทียบเท่ายาปฏิชีวนะที่ศึกษาทั้ง 2 ชนิด Ngyen และ Eun (2011) รายงานว่าสารสกัดของใบฮว่านง็อกที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ methanol, ethanol, acetone และน้ำ ประกอบไปด้วยสารประกอบ phenolic และ flavonoid รวมทั้งมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, FRAP และ metal chelating assays Giang et al., (2005) ยังรายงานว่าสารสกัด ethyl acetate และ buthanol จากใบ ฮว่านง็ฮก ซึ่งมี flavonoids เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบโดยใช้ human blood peroxidase model นอกจากนั้น สารสกัดใบฮว่านง็อกยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (*Salmonella typhi 15, Shigella flexneri*, และ *Escherichia coli)* และมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *(Candida* และ *C. stellatoides)* Nam (2003) รายงานว่า สารสกัด methanol จากใบฮว่านง็อกมีพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง B16 melanoma และยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใน human umbilical venous cell นอกจากนั้น ยังมีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (mutation) โดยการใช้ *Salmonella typhimurium* (TA98) พบว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และยังพบว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร

สกัดใบฮว่านง็อกต่อการเจริญ (cell proliferation) ของเซลล์สายพันธุ์ลำไส้ (colon cancer cell lines) คือ HTC15, SW48 และ SW480 พบว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกมีผลต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด (Pamok et al., 2012)

2.2 อนุมูลอิสระและการเกิดโรค

อนมูลอิสระ (free radical) เป็นอะตอม อิออน หรือโมเลกุลที่มีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งอิเล็คตรอนวงนอกสุด (valence electron) ของ orbital ที่ไร้คู่ (unpaired electron) และสามารถดำรงอยู่ได้อย่างเป็นอิสระ อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีอายุครึ่งชีวิต (half-life) สั้นมาก ประมาณ 10^{-3}-10^{-10} หรือ 1 วินาที มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมี อนมูลอิสระมีหลายชนิด ส่วนใหญ่มักเป็นสารประกอบออกซิเจนใน reactive oxygen species (ROSs) หรืออาจเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอื่น ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจน (oxygen radicals) เช่น superoxide anion (O_2^{-}), hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$), peroxyl radical ($LOO^{\bullet}$) เป็นต้น หรือ ROSs อาจประกอบด้วยอนุพันธ์ของสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical derivatives) อาทิ hydrogen peroxide (H_2O_2) และ singlet oxygen ($^1O_2$) เป็นต้น สำหรับอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่ออกซิเจน ได้แก่อนุพันธ์ของไนโตรเจน ractive nitrogen species (RNSs) ได้แก่ nitric oxide (NO) peroxynitrite เป็นต้น (Halliwell และ Gutteridge, 1999; Fang et al., 2009; สหพัฒน์ 2548)

อนุมูลอิสระที่เกิดภายในร่างกายมีทั้งประโยชน์และโทษ ที่ความเข้มข้นต่ำ หรือ ปานกลาง ROS/RNS มีหน้าที่ทางสรีรวิทยา อาทิ การทำหน้าที่ของ macrophage และ neutrophils ในการทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ เช่นทำลายแบคทีเรีย ต้านไวรัส และต้านสารก่อเนื้องอก (anti-tumor agents) RNS ควบคุมความดันโลหิตผ่าน cGMP ทั้ง ROS/RNS ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางในการสื่อสารภายในเซลล์ (intracellular messengers) ในหลายวิถีทางของการส่งสัญญาณของเซลล์ (cellular signaling pathway) โดยเฉพาะในการตอบสนองของ mitogen และ การควบคุมรีดอกส์ (redox regulation) (Phaniendra et al., 2015; Lander, 1997) แต่ที่ความเข้มข้นสูง ทั้ง ROS/RNS สามารถก่อให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และ สภาวะเครียดไนโตรเซชัน (nitrosative stress) ทำความเสียหายให้กับเซลล์ ส่งผลให้เกิดการทำลายโปรตีน DNA ไขมัน การเสียสภาพของเอ็นไซม์ ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ (Liu et al., 2002; Dufour et al., 2007) งานวิจัยในปัจจุบันชี้ชัดว่า ถ้าขาดความสมดุลของการสร้างอนุมูลอิสระ ROS/RNS และสารต้านออกซิเดชัน จะก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาท

(neurodengenerative diseases) เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis โรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) และ โรคภูมิต้านตนเอง (autoimmune disease) เป็นต้น (Minussi et al., 2003; Kubola and Siriamorpun, 2008; Phaniendra et al., 2015; Halliwell and Gutteridge, 1999) อย่างไรก็ตามร่างกายสามารถลดผลกระทบที่เกิดจากสภาวะ oxidative stress ได้โดยเอ็นไซม์ต้านออกซิเดชัน (anti-oxidant enzyme) ที่สร้างขึ้นภายในร่างกาย (endogenous system) ได้แก่ catalase, peroxidase, และ superoxide dismutase เป็นต้นหรืออาศัยสารต้านออกซิเดชันจากแหล่งภายนอกร่างกาย (exogenous system) ซึ่งอาจได้จากการสังเคราะห์หรือสกัดจากพืชสมุนไพรตามธรรมชาติ (natural medicinal plant) เช่น วิตามินซี resveratrol, curcumin, EGCG และ α–tocopherol เป็นต้น (Atmani et al., 2009; Sánchez-Moreno et al., 1999; Surh, 2003)

2.3 Nitric oxide, nitric oxide synthase, cyclooxygenase และ cytokines กับกระบวนการอักเสบ

เซลล์ macrophage มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ สามารถปลดปล่อยสารจำพวก pro-inflammatory cytokines และโมเลกุลของสารอักเสบอื่นๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น NO และ prostaglandin (PGs) เป็นต้น (Macmicking et al., 1997; Zideka and Mašek, 1998; Harris et al., 2002)

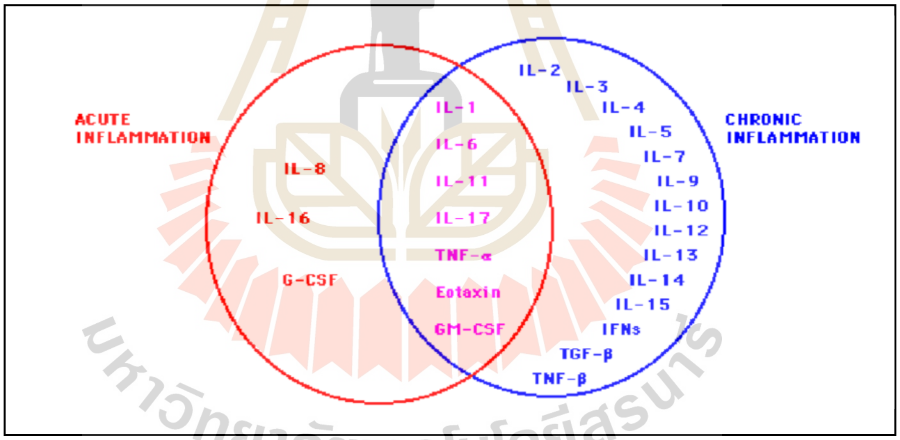
แก๊ส NO ถูกสังเคราะห์ในรูปของอนุมูลอิสระจาก L-arginine โดยเอนไซม์ตระกูล nitric oxide synthase (NOSs) NO มีทั้งคุณประโยชน์และโทษต่อร่างกาย ในสภาวะปกติ NO จะถูกควบคุมหรือผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ endothelial NOS (eNOS) และ neuronal NOS (nNOS) ซึ่งทั้งคู่จัดเป็น constitutive isoform ของ NOS (cNOS) ในสภาวะปกติ NO ทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวกลางในการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ ขึ้นกับว่า NO ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตำแหน่งใด เช่น NO ทำหน้าที่เป็น neurotransmitter และ signaling molecule ใน signal transduction pathway ควบคุมพัฒนาการ และความเสื่อม (degenerative) ของเซลล์ประสาท มีบทบาทในการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilator) ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดใน endothelial cell การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การแข็งตัวขององคชาติ ช่วยควบคุมการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน และมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็ง เป็นต้น บทบาทของ NO ที่เป็นโทษเกิดเมื่อความเข้มข้นของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในร่างกายมีปริมาณผิดปกติ เช่น ถ้าระดับของ NO ต่ำกว่าปกติ สามารถนำไปสู่โรคความดันสูง โรคหลอดเลือดสมองตีบ (strokes) ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (heart attack) หรือ หัวใจวาย เป็นต้น แต่ถ้าปริมาณ NO มีระดับสูงเกินไป

โดยเฉพาะการถูกสังเคราะห์ผ่านเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) จะสัมพันธ์กับภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) โรคความดันต่ำ และโรคที่เกี่ยวข้องการอักเสบเรื้อรังและเฉียบพลันต่าง ๆ เช่นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และ โรคเบาหวาน เป็นต้น นอกจากนั้น นักวิทยาศาสตร์ได้ชี้ชัดว่า NO สัมพันธ์กับการเกิดโรคภูมิต้านตนเอง โรคภูมิแพ้ การกลายพันธุ์ ตลอดจนการชักนำให้เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ (Medical Research Council, 2014; Sharma et al., 2007; Robbin and Sisson, 1996; Park et al., 2000; Morgan and Dabco, 2000; deRojas-Walker et al., 1995; Sandoval et al., 1997; Kolb and Kolb-Bachofen, 1992; Alessandro et al., 1994; Macmicking et al., 1997; Bernstein et al.,2005; Korde (Choudhari), Sridharan, Gadbail, และ Poornima, 2012).

ท่ามกลางความหลากหลายของตัวกลาง (mediator) ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ PGs เป็นหนึ่งในตัวกลางที่มีความสำคัญยิ่งในการควบคุมกระบวนการอักเสบ PGs ถูกสังเคราะห์จาก arachidonic acid โดยเอ็นไซม์ prostaglandin endoperoxide synthase หรือ cyclooxygenase (COX) ที่ประกอบไปด้วย 2 isoform ได้แก่ COX-1 และ COX-2 ซึ่งทั้งคู่มีบทบาทที่แตกต่างกันในร่างกาย COX-1 เป็น housekeeping enzyme และเป็น constitutive isoform ของ COX ซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะปกติของร่างกาย ในขณะเดียวกัน COX-2 ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นเฉพาะภายใต้ภาวะการอักเสบ (Donnelly and Hawkey, 1997; Harris et al., 2002) เนื้องอกหลายชนิดมีการแสดงออกของระดับที่เพิ่มขึ้น (high expression) ของ COX-2 และมักเกิดร่วมกับภาวะที่มี PGs ในระดับสูง (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003) มีงานวิจัยชี้แนะว่าโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้ง NO และ PGs รวมถึงสารตั้งต้น (precursors) ของสารทั้งสองสามารถตรวจพบได้ในเซลล์ macrophage เมื่อเกิดการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นทั้งแบบเดี่ยวๆ หรือแบบเสริมฤทธิ์กันระหว่าง lipopolysaccharide (LPS) และ interferon-γ (IFN-γ) (Iyengar et al., 1987; Lorsbach et al., 1993; Song et al., 2002; Jang et al., 2005) มีหลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า ในเซลล์ที่เกิดการอักเสบ มีระดับของ NO เพิ่มสูงขึ้น ร่วมกับปริมาณที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้ง iNOS และ COX-2 (Lin et al., 2003; Park et al., 2005; Kim et al., 2006; Lee et al., 2008; Shin et al., 2008). ดังนั้น การลดระดับของ NO, iNOS และ COX-2 จึงน่าจะเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่สำคัญในการควบคุม หรือ ยับยั้งกระบวนการอักเสบ

Cytokine เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 8-40,000 dalton สร้างจากเซลล์แทบทุกชนิดที่มี nucleus โดยเฉพาะจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็น lymohocye และ macrophage บทบาทของ cytokine มีมากมาย ขึ้นกับว่าเป็น cytokine ชนิดใด โดยรวม cytokine ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อโรค การทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการอักเสบและการบาดเจ็บ

เป็นต้น สำหรับ cytokine ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ มีทั้งกลุ่มที่ส่งเสริมการอักเสบ เรียกว่า proinflammatory cytokines และกลุ่มที่ช่วยลดการอักเสบและช่วยสมาน (healing) การบาดเจ็บ หรือความเสียหายจากกระบวนการอักเสบ เรียกว่า anti-inflammatory cytokines ตัวอย่าง proinflammatory cytokines ได้แก่ IL-1, IL-6, TNF และ IL-8 ที่สร้างจาก lymphocyte และ macrophage ที่ถูกกระตุ้น (activated lymphocyte และ activated macrophage) ที่ไม่ได้เกิดในสภาวะปกติสุขของร่างกาย เช่น อาจเกิดในสภาวะติดเชื้อ การบาดเจ็บ การขาดเลือดหล่อเลี้ยง (ischemia) การกระตุ้น T เซลล์ การได้รับ toxin ต่าง ๆ เป็นต้น cytokine มีคุณสมบัติที่เป็น pleiotropic คือ cytokine ชนิดเดียวมักทำหน้าที่ได้หลากหลายชนิด (multifunctional) cytokineชนิดเดียวกัน อาจทำหน้าที่ต่างกันได้ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างชนิด หรือ ในสภาวะที่แตกต่างกัน นอกจากนั้น cytokine ยังมีคุณสมบัติของ redundancy คือ cytokine ต่างชนิดกันอาจทำหน้าที่ร่วมกันได้ ดังตัวอย่างของ cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเฉียบพลัน และการอักเสบเรื้อรังในรูปที่ 2.2 ตัวอย่าง cytokine ที่ทำหน้าที่เป็น anti-inflammatory cytokines ได้แก่ IL-4, IL-10, IL-13 และ transforming growth factor (TGF)-β เป็นต้น (Dinarello, 2000; Feghali and Wright, 1997)



รูปที่ 2.2 Cytokines ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง (ดัดแปลงจาก Feghali and Wright, 1997)

Proinflammatory cytokines ที่สำคัญ IL-6 และ TNF-α ยังมีบทบาทการควบคุมความสมดุลของพลังงาน (energy balance) กระบวนการเผาผลาญ (metabolic) ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และการซ่อมแซม (regenerate) ของร่างกาย รวมทั้งการส่งเสริมการเกิดมะเร็ง คือเป็น pro-tumorigenic cytokines (Popko et al., 2010; Grivennikov and Karin, 2017) ดังนั้น ทั้ง IL-6 และ TNF จึงเป็น

เป้าหมายสำคัญหนึ่งในแนวทางการรักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง การเกิดโรคเบาหวาน โรคอ้วน รวมทั้งการเกิดมะเร็ง

2.4 การเกิดพัฒนาการของโรคมะเร็ง

Neoplasm หมายถึง "new growth" ใช้ในทางพยาธิวิทยา หมายถึงการเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่ของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีการเจริญมากผิดปกติ นอกเหนือจากการควบคุมตามปกติ ในปัจจุบันนิยมใช้คำว่า เนื้องอก เพื่อสื่อความหมายของ "tumor" เนื้องอกแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ 1) เนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง (benign tumor or benign neoplasm) ซึ่งยังไม่ใช่มะเร็ง เป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวที่ผิดปกติ ยังไม่ลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) หรือแพร่กระจายไปสู่ส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย (metastasis) อย่างไรก็ตาม benign tumor cell ที่มีปริมาณมากขึ้น ก็สามารถเบียดเซลล์ปกติและรบกวนการทำหน้าที่ตามปกติของเซลล์ หรือ ของอวัยวะในบริเวณนั้นได้ การรักษากระทำได้ง่ายกว่าเนื้องอกชนิดร้ายแรง มักจะกระทำโดยการผ่าตัดทิ้ง 2) เนื้องอกชนิดร้ายแรง (malignant tumor or malignant neoplasm) หรือที่เรียกว่ามะเร็ง เป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติที่สามารถลุกลามออกจากตำแหน่งที่เกิด และ metastasize ไปยังตำแหน่งอื่น ๆ ของร่างกายผ่านทางกระแสเลือด หรือ ระบบน้ำเหลือง การรักษากระทำได้ยากกว่าแบบ benign tumor เพราะไม่สามารถใช้วิธีการผ่าตัดเพียงอย่างเดียว แต่จำเป็นต้องใช้ยา หรือใช้รังสีร่วมด้วย สืบเนื่องจากคุณสมบัติของ metastasis ของเซลล์มะเร็ง จึงนิยมเรียกโรคมะเร็งว่า "cancer" ซึ่งเป็นภาษาลาตินหมายถึง ปู เนื่องจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเปรียบดังขาปูที่ยื่นออกมาได้หลายทิศทาง นั่นเอง (https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html)

โรคมะเร็งเป็นโรคเรื้อรังที่มีกระบวนการเกิดหลายขั้นตอน (multistep process) แบ่งออกเป็น 3 ระยะหลักคือ ระยะเริ่มแรก (initiation) มีการผลักดันให้เกิดการกลายพันธุ์ (initial driver mutation) เซลล์ต้องมีการเปลี่ยนแปลงในระดับ gene ทำให้ DNA ของเซลล์เกิดความเสียหาย ไม่สามารถซ่อมแซมได้ เกิดการกลายพันธุ์ของยีน ส่งผลที่อาจเกิดการกระตุ้น oncogene หรือ ลดการทำงานของ tumor suppressor gene ที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) หรือ gene ที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ (signal transduction) ที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ และ/หรือ การสื่อสารระหว่างเซลล์ เป็นต้น ตัวอย่างปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ที่สามารถชักนำให้เซลล์เกิดความผิดปกติในพันธุกรรมในระยะแรก (initiated cell) ได้แก่ การสูบบุหรี่ ติดเชื้อไวรัส ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เป็นต้น เซลล์ที่ DNA เกิดความเสียหายในระยะ initiation นี้ เป็นกระบวนการไม่ย้อนกลับ (irreversible process) ระยะที่สองเป็นการส่งเสริม (promotion) ให้เกิดการเจริญของเซลล์ที่ผิดปกติ (initiated cell) จนเกิดเป็นก้อนเนื้องอก หรือการส่งเสริม tumorigenesis นั่นเอง ขั้นตอนนี้ initiated cell ถูกส่งเสริมโดย promoting agent ให้แบ่งตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว กลไกอาจเกิดผ่าน genetic mechanism ที่ชักนำให้เกิดความ

เสียหายโดยตรง ต่อ DNA เกิด mutation ของ gene เหมือนในระยะเริ่มแรก หรืออาจเกิดผ่าน epigenetic mechanism ที่ไม่เกี่ยวข้องกับความเสียหายต่อ DNA โดยเปลี่ยนแปลงระดับเบสหรือโครงสร้างของ DNA โดยตรง เช่น การได้รับ hormone ที่ส่งเสริมให้เซลล์ที่กลายพันธุ์ทวีจำนวนอย่างรวดเร็ว ในระยะนี้ เซลล์ที่ผิดปกติจะหลั่งสารดึงดูดเซลล์ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ หลั่งปัจจัยที่กระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ เช่น เอนไซม์ หรือprotease ต่าง ๆ เป็นต้น ระยะ promotion stage เป็นกระบวนที่สามารถย้อนกลับได้ (reversible process) โดยเฉพาะถ้าสามารถกำจัดสารส่งเสริม (promoting agent) ออกไป หรือผ่าตัดก้อนเนื้อออกทันท่วงที ก็จะไม่พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งได้ ระยะ promotion stage จึงเป็นระยะที่มีความสำคัญยิ่งในเชิงรักษา และป้องกันเนื้องอกที่เป็นแค่ benign ไม่ให้พัฒนาเป็น malignant สำหรับระยะสุดท้ายเป็นระยะก้าวหน้าของมะเร็ง (progression) เป็นระยะที่เซลล์เกิด mutation เพิ่มขึ้น สะสมความผิดปกติของ gene เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เกิดการคัดเลือกโคลน (clonal selection) ของเซลล์ผิดปกติที่มีความสามารถในการแบ่งเซลล์สูงสุด รอบแล้วรอบเล่า จนได้กลุ่มเซลล์มะเร็งที่เติบโตเป็นเนื้องอกที่พัฒนาจากเพียงเซลล์เดียว (clonity) ลุกลามออกจากเนื้อเยื่อเดิม และแพร่กระจายไปตำแหน่งอื่นในร่างกาย สามารถเจริญในตำแหน่งใหม่ และทำความเสียหายให้กับอวัยวะหรือ เนื้อเยื่อในบริเวณนั้น พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งเต็มรูปแบบ หรือเรียกว่าเป็นระยะแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์ที่ผิดปกติ progression stage ของมะเร็งเป็นกระบวนการที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (Brudnak, 2000; Devi, 2005;) ดังนั้น พัฒนาการของมะเร็ง โดยทั่วไป ใช้ระยะเวลานาน หลายสิบปี และเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของ gene หลายชนิดร่วมกัน โดยเฉพาะการกระตุ้น (activation) oncogenes และ การยั้บยั้ง (inactivation) tumor suppressor genes ซึ่งเป็นกลุ่ม gene ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งมากที่สุด

2.5 กระบวนการ apoptosis

นอกเหนือจากการเจริญด้วยอัตราการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วที่ไม่สามารถถูกควบคุม (uncontrolled growth) เอกลักษณ์อีกอย่างหนึ่งของเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่คือสามารถหลบหลีกการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ซึ่งเป็นกระบวนการฆ่าตัวเองตายของเซลล์ (cellular suicide) เมื่อตกอยู่ในสภาวะที่ความอยู่รอดของเซลล์นั้นจะเป็นอันตรายต่อร่างกาย

Apoptosis เป็นกระบวนการฆ่าตัวเองของเซลล์ที่ได้ถูกโปรแกรมไว้ล่วงหน้า (programmed cell death) ในระดับ gene กระบวนการนี้จัดเป็นการตายของเซลล์ที่พบมากที่สุดในการเจริญและพัฒนาการทางสรีรวิทยา (physiologi cell death) ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (Kam and Ferch, 2000) กระบวนการ apoptosis มีบทบาทสำคัญทั้งทางด้านสุขภาพ และ การเกิดโรค ตัวอย่างบทบาทของ apoptosis ทางด้านสุขภาพ ได้แก่ ก่อให้เกิดพัฒนาการที่ถูกต้องและเหมาะสมในระยะที่เป็นตัวอ่อน เช่น

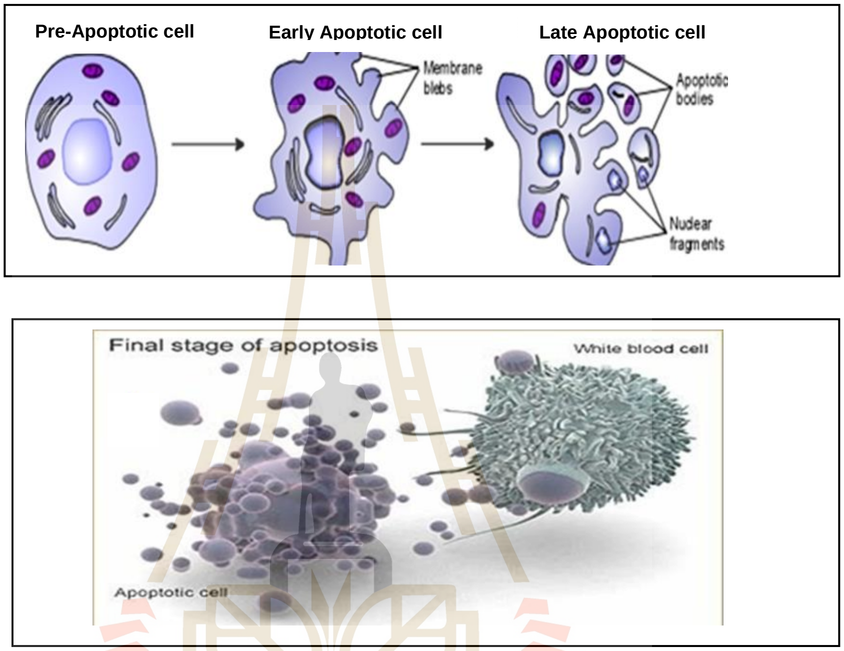
กำจัดส่วนหางของลูกอ๊อดออกไป เมื่อพัฒนาเป็นกบเต็มวัย เนื่องจากเซลล์ส่วนหางเกิดการตายด้วยกระบวนการ apoptosis เป็นต้น ช่วยรักษาสภาวะความสมดุลภายในร่างกาย (homeostasis) ในผู้ใหญ่ เช่น ช่วยการผลัดเซลล์ให้เป็นไปตามปกติ (normal cell turnover) ช่วยในการพัฒนาและการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน การฝ่อลีบเนื่องจากฮอร์โมน (hormone-dependent atrophy) และกำจัดเซลล์ที่หมดอายุ หรือเซลล์ที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย เช่น เซลล์ที่มี DNA เสียหายมากเกินซ่อมแซม เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส หรือเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Rastogi et al., 2009; Elmore, 2007) บทบาทของ apoptosis ที่เกี่ยวกับการเกิดโรคเกิดเมื่อ gene ที่ควบคุมกระบวนการ apoptosis ถูกยับยั้ง (suppressed) กระตุ้นการแสดงออก (overexpressed) หรือ เปลี่ยนแปลงเพราะเกิดการกลายพันธุ์ ตัวอย่างโรคที่เกิดเมื่อเกิดกระบวนการ apoptosis มากเกินไป ได้แก่ โรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของประสาท เช่น โรค Alzheimer และ Parkinson หรือการขาดเลือดหล่อเลี้ยงในสมอง (cerebral ischaemia) การขาด lymphocyte ในภาวะติดเชื้อ (sepsis) และติดเชื้อ HIV (human immunodeficiency virus) ตัวอย่างโรคที่เกิดเมื่อมีการลด หรือยับยั้งกระบวนการ apoptosis ได้แก่ โรคมะเร็ง hyperplasia การเกิดโรคภูมิต้านตนเอง (autoimmunity) มะเร็งในเม็ดเลือดขาว (leukemia) และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) (Kam and Ferch, 2000)

สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่กำลังเกิดการตายแบบ apoptosis คือเซลล์หดตัวเล็กลง (cell shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเกิดการปูดพอง ตะปุ่มตะป่ำเป็นกระเปาะเล็ก ๆ (plasma membrane and nuclear membrane blebbing) รอบ ๆ ขอบเซลล์ (รูปที่ 2.3) chromatin หดแน่นหนาตัวขึ้นติดกับผนังของ nucleus เกิดลักษณะของ pyknotic nuclei ส่วนที่เสียหายมากที่สุดคือ nucleus ซึ่งผนัง nucleus แยกตัว แตกออกเป็นเสี่ยง ๆ (nuclear fragmentation) chromosome ถูกทำลาย และ DNA ถูกตัดเป็นท่อนที่มีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 180-200 bp ซึ่งเป็นขนาดของ nucleosome และท้ายสุดเซลล์แตกออกเป็นเสี่ยง ๆ (cell fragmentation) โดยกระเปาะที่ขอบเซลล์หลุดออกเป็นถุงเล็ก ๆ มากมาย ที่เกิดจาก membrane ห่อหุ้มชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหัก ไขมัน และ macromolecules อื่น ๆ เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งจะถูกกำจัดออกไปอย่างรวดเร็วโดยการเก็บกินและย่อยสลายโดยเซลล์ macrophage การที่ DNA ถูกตัดที่ nucleosome ทำให้เกิดปรากฏการณ์ของขั้นบันได DNA (DNA ladder) เมื่อ load DNA ที่สกัดจากเซลล์ที่เกิด apoptosis ลงใน gel electrophoresis ซึ่งปรากฏการณ์ของ DNA ladder เป็นคุณลักษณะจำเพาะหนึ่งของเซลล์ที่ตายด้วย apoptosis (รูปที่ 2.4) การตายแบบ apoptosis ของเซลล์เป็นการตายแบบมีระเบียบแบบแผน เป็น active process ที่ต้องใช้พลังงาน ไม่ก่อให้เกิดปฏิกริยาการอักเสบ (inflammation reaction) และไม่ก่อให้เซลล์ข้างเคียง หรือ เนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดความเสียหายแต่อย่างใด ซึ่งแตกต่างจากการตายของเซลล์ที่เกิดการบาดเจ็บเนื่องจากอุบัติเหตุ หรือได้รับสารเคมีอันตราย เป็นการตายแบบ necrosis ที่ก่อให้เกิดปฏิกริย

การตอบสนองต่อการอักเสบ อันส่งผลให้เซลล์ หรือ เนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดความเสียหายเป็นบริเวณกว้าง (Singh and Anand, 1995; Kam and Ferch, 2000) ตัวอย่างปัจจัยที่ทำให้เซลล์ตายด้วยกระบวนการ necrosis คือ ROSs, toxin, รังสี ความร้อน อุบัติเหตุ และความร้อน เป็นต้น (Sarastea and Pulkkic, 2000; Eguchi et al., 1997) ตารางที่ 2. เปรียบเทียบความแตกต่างของการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis

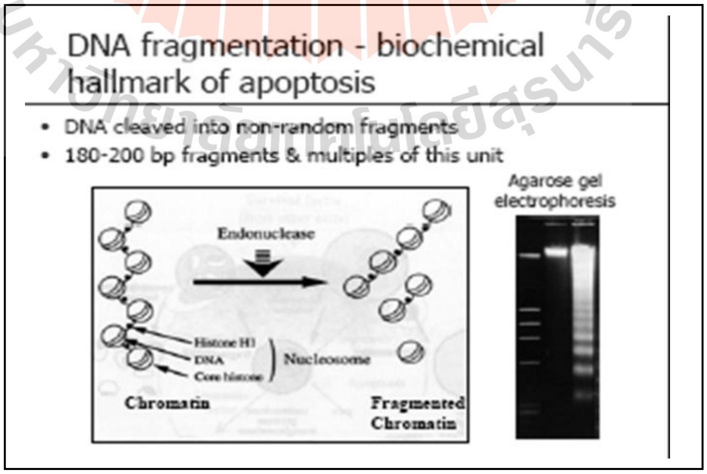
A

B



รูปที่ 2.3 แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่กำลังเกิด apoptosis (A) และ การกำจัดชิ้นส่วนของ apoptotic body โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว (B) (http://sciencenectar.blogspot.com)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะขั้นบันได (DNA ladder) ของ DNA ที่ได้จากเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis (http://www.uta.edu/biology/wilk/classnotes/tissues.culture/apoptosis.pdf)

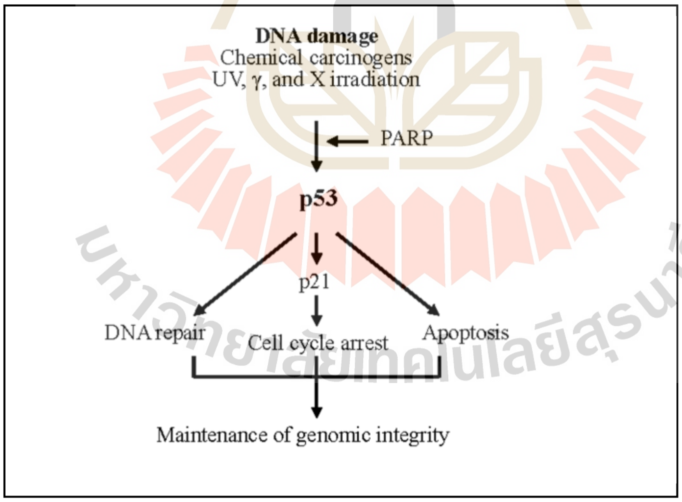
ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการตายแบบ apoptosis และ necrosis (ดัดแปลงจาก Kam and Ferch, 2000; Sarastea and Pulkkic, 2000)

Apoptosis	Necrosis
สาเหตุทางสรีรวิทยา หรือ พยาธิวิทยา	สาเหตุทางพยาธิวิทยาเสมอ
เกิดได้แม้เพียงเซลล์เดียว	เกิดพร้อมกันหลายเซลล์
ถูกโปรแกรม หรือ ควบคุมด้วย gene	เกิดจากอุบัติเหตุทางกายภาพ หรือได้รับสารพิษ
เป็นกระบวนการที่ active ต้องอาศัยพลังงาน	เป็นกระบวนการ passive ไม่ต้องอาศัยพลังงาน
Nucleus เกิดความเสียหายสูงสุด	Cell membrane เสียหายสูงสุด เกิดการแตกของเซลล์ (cell lysis)
สูญเสียความคงสภาพของ membrane (membrane integrity) เมื่อตอนท้าย	สูญเสีย membrane integrity เมื่อเริ่มต้น
เซลล์มีการหดตัว เหี่ยวลง	เซลล์ และ อวัยวะของเซลล์บวม
Chromatin ถูกตัดเป็นท่อน ๆ ลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder formation)	Nuclear chromatin สลายตัว (disintegration)
ไม่เกิดปฏิกริยาอักเสบ	เกิดปฏิกริยาอักเสบ

การควบคุม apoptosis มี 2 ระยะคือ เริ่มแรกเป็นระยะตัดสิน (decision phase) เป็นการควบคุมระดับ gene โดยกลุ่ม protein ที่เป็น regulator ทำหน้าที่ประมวลความผิดปกติของสิ่งแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกเซลล์ว่ามากน้อยเพียงใด และตัดสินว่าเซลล์ควรมีชีวิตอยู่ต่อไป หรือควรจะตาย ความผิดปกติที่เกิดขึ้น อาจเป็นความเสียหายของ DNA สัญญาณที่เกิดจากการกระตุ้น oncogene การขาดออกซิเจน และขาด growth factor เป็นต้น ถัดจากระยะตัดสิน เป็นระยะของการดำเนินการ (execution phase) โดยกลุ่มเอนไซม์ cysteine aspartyl-specific proteases เรียกย่อ ๆ ว่า caspase ทำหน้าทีเป็น effector ดำเนินการให้มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยานำไปสู่การตายของเซลล์ caspase เป็น protease ที่มี cysteine residue อยู่ที่ active site และตัดโปรตีนหลัง aspartic residue ในปัจจุบัน มีประมาณ 14 caspase gene ที่พบใน human genome (Kam and Ferch, 2000; สหพัฒน์ 2548)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Apoptosis ถูกควบคุมโดย gene หลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ tumor suppressor gene เช่น *p53* และ oncogene เช่น *Bcl-2* และ *Akt* ที่สร้างโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการ apoptosis โปรตีนในวงศ์ Bcl-2 (Bcl-2 family) ทำหน้าที่ทั้งชักนำและยับยั้ง apoptosis กลุ่มโปรตีนในวงศ์ Bcl-2 ที่ทำหน้าที่ยับยั้ง apoptosis (anti-apoptotic proteins) ได้แก่ Bcl-2. Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, A1 ส่วนกลุ่มโปรตีนที่ชักนำให้เกิด apoptosis (pro-apoptotic proteins) คือ พวก Bcl-2 associated x protein (Bax) เช่น Bax, Bok, Bak, Bcl-Xs, และ Bcl-G_L และกลุ่มสุดท้ายในวงศ์ Bcl-2 คือกลุ่มที่มีแต่โดเมน BH-3 ได้แก่ Bad, Bik, Bid, Bim, Bmf, Noxa, Puma เป็นต้น (Kam and Ferch, 2000; Singh, 2007; สหพัฒน์ 2548) p53 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญ ถูกจัดเป็นผู้พิทักษ์จีโนม (guardian of the genome) ทำหน้าที่เป็น transcription factor ควบคุมการเจริญของเซลล์และการซ่อมแซม DNA เมื่อ DNA เกิดความเสียหาย หรือ chromosome ผิดปกติ p53 จะสร้าง p21 ที่สามารถหยุดวัฎจักรเซลล์ (cell cycle arrest) เพื่อทำการซ่อมแซม DNA แต่ในกรณีที่ DNA มีความเสียหายมาก เกินเยียวยา p53 จะชักนำให้เกิด apoptosis โดยสร้าง pro-apoptotic protein Bax, Puman, Noxa ซึ่งทำให้ mitochondria หลั่ง cytochrome c และนำไปสู่การเกิด apoptosis ในที่สุด (รูปที่ 2.5) (Amaral et al., 2010; Kam and Ferch, 2000)



รูปที่ 2.5 แสดงบทบาทของ p53 ในการรักษาเสถียรภาพของจีโนม (http://users.ipfw.edu/blumenth/CancBiol/p53.html)

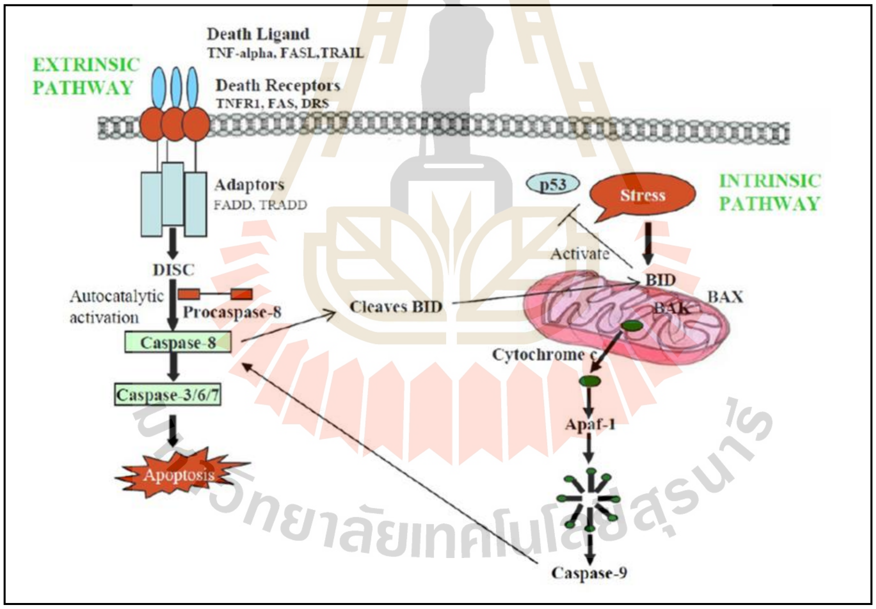
กลไกการเกิด apoptosis มี 2 วิถีทางหลัก (pathway) คือ

1. วิถีภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway) สัญญาณเกิดจากการจับของ ligand ที่จำเพาะกับ death receptor ที่ผิวเซลล์ เช่น การจับกันระหว่าง Fas ligand กับ Fas receptor (CD95 หรือ APO-1) หรือ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) เช่น TNF (tumor necrosis factor) จับกับ TNF receptor ทำให้สามารถจับกับ adaptor protein ใน cytoplasm คือ Fas-associated death domain (FADD) (ในกรณีของ Fas R) หรือจับกับ TNF receptor-associated death domain (TRADD) (ในกรณีของ TNF receptor) ซึ่งต้องจับกับ FADD อีกทอดหนึ่ง ทำให้เกิดโครงสร้างซับซ้อนของโปรตีนเรียกว่า Death–inducing signaling complex (DISC) ที่สามารถกระตุ้น initiator caspase (ซึ่งอาจจะเป็น pro-caspase 2, 8, 9, 10 หรือ 11) ให้ active และไปกระตุ้น effector caspase (pro-caspase 3, 6, หรือ 7) อีกทอดหนึ่ง effector caspase เป็น protease ย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น actin, lamin, ICAD/CAD, PARP, Rb, p27, p21 ก่อให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ในที่สุด (รูปที่ 2.6) ในปัจจุบัน มีรายงานของ death receptor family หลายชนิดคือ TNF-R1, Fas, DR-3, DR-4/TRAIL-R1, DR-5/TRAIL-R2. DR-6 และ NGF-R (Fernald and Kurokawa, 2013; Rampal et al., 2012; Singh,2007; French and Tschopp, 2003) อนึ่ง การนำสัญญาณการเจริญออกจากเซลล์ เช่น นำ growth factor (nerve growth factor), IL-3 ออกจากเซลล์ ก็สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis ได้เช่นกัน (Kam and Ferch, 2007)

2. วิถีภายในเซลล์ (intrinsic pathway) เป็นกลไกของการเกิด apoptosis โดยไม่ผ่าน death receptor แต่เกิดผ่าน mitochondria และ apoptosome สัญญาณที่เป็นสิ่งเร้าภายในเซลล์ชักนำให้เกิด apoptosis อาจอยู่ใน nucleus, mitochondria, ER lysosomes และ golgi bodies (Singh, 2007; Ferri and Kroemer, 2001) ตัวอย่างของสิ่งเร้าได้แก่ สภาวะเครียดออกซิเดชัน ความเสียหายของ DNA ที่รุนแรง รังสี (ionizing radiation) หรือ สารเคมี เช่น alkylating agent ที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง สภาวะออกซิเจนต่ำ เป็นต้น ความเสียหายของ DNA จะกระตุ้น p53 ซึ่งไปกระตุ้น pro-apoptotic protein Bax ที่อยู่ที่เยื่อของ mitochondria การเกิด oligomerization ระหว่าง Bax ด้วยกัน หรือระหว่าง Bax กับ Bak ที่ mitochondrial membrane ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการยอมให้สารผ่าน (permeability) ของเยื่อชั้นนอกของ mitochondria (mitochondrial outer membrane permeabilization; MOMP) ทำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c ออกจาก mitochondrial membrane cytochrome c จับกับ Apaf-1 ใน cytoplasm เกิด apoptosome ซึ่งสามารถกระตุ้น pro-caspase-9 ซึ่งเป็น initiator caspase ให้ active และไปกระตุ้น effector caspase ซึ่งนำไปสู่การเกิด apoptosis ต่อไปในที่สุด (รูปที่ 2.6) (Rampal et al., 2012; Singh,2007) การเกิด MOMP

นอกจากจะทำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c ยังสามารถหลั่งสารอื่นที่ส่งผลต่อการเกิด apoptosis ร่วมด้วย เช่น apoptosis inducing factor (AIF) ที่ยับยั้ง apoptosis, (SMAC/DIABLO) (second mitochondrial activator of caspases /direct inhibitor of apoptosis binding protein with low PI) ซึ่งส่งเสริมให้เกิด apoptosis โดยยับยั้ง AIF เซลล์ซึ่งมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ Bcl-2 สามารถยับยั้ง SMAC/DIABLO ได้ (Adrian et al., 2001; Singh, 2007)

วิถีของ extrinsic pathway สามารถเชื่อม (cross talk) กับ intrinsic pathway ได้ โดย initiator caspase 8 ใน extrinsic pathway ตัด bid ที่อยู่ใน cytoplasm ได้ truncated bid (tBid) ที่สามารถไปแทนที่ Bak ที่จับกับ Bcl-2 ที่ mitochondrial membrane ปลอดปล่อย Bak ให้เป็นอิสระ การเกิด oligomerization ระหว่าง Bak และ/หรือ Bax ที่ mitochondrial membrane ก่อให้เกิดการรั่วไหลของ cytochrome c ออกจาก mitochondria นำไปสู่การเกิด apoptosis โดยผ่าน mitochondria และ apoptosome ได้เช่นเดียวกับ intrinsic pathway (Rampal et al., 2012)



รูปที่ 2.6 แสดง intrinsic และ extrinsic pathway ของการเกิด apoptosis (Rampal et al., 1012)

2.6 การหลีกเลี่ยงกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งมีความต่างจากเซลล์ปกติที่ต้องอยู่ภายใต้ความกดดันอย่างต่อเนื่อง เช่น มีความเครียด (stress) จาก oncogene มีสารพันธุกรรมที่ผิดปกติ ไม่มีเสถียรภาพ และเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะที่อยู่กลางก้อนเนื้องอกมักอยู่ภายใต้ภาวะออกซิเจนต่ำ ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแต่เป็นสัญญาณให้กระตุ้น

intrinsic pathway ของกระบวนการ apoptosis อย่างไรก็ตาม เซลล์มะเร็งมีกลยุทธ์มากมายในการหลีกเลี่ยงการเกิด apoptosis จึงสามารถเจริญ เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว มีชีวิตอยู่รอด คงความเป็นอมตะ (immortal) อันเป็นคุณลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการควบคุม intrinsic pathway ของ apoptosis จึงน่าจะมีความสำคัญมากกว่า extrinsic pathway ในการป้องกันการเกิดมะเร็ง

กลยุทธ์หลักของเซลล์มะเร็งในการหลีกเลี่ยงการเกิด apoptosis คือ การขยายสัญญาณของการต้าน apoptosis และลดสัญญาณการกระตุ้นให้เกิด apoptosis หรือใช้ทั้ง 2 กลยุทธ์ร่วมกัน โดยเซลล์มะเร็งสามารถควบคุมและเปลี่ยนแปลง (modulate) วิถีทางของ apoptosis ทั้งในระดับ transcription, translation และ post-translation (Fernald and Kurokawa, 2013)

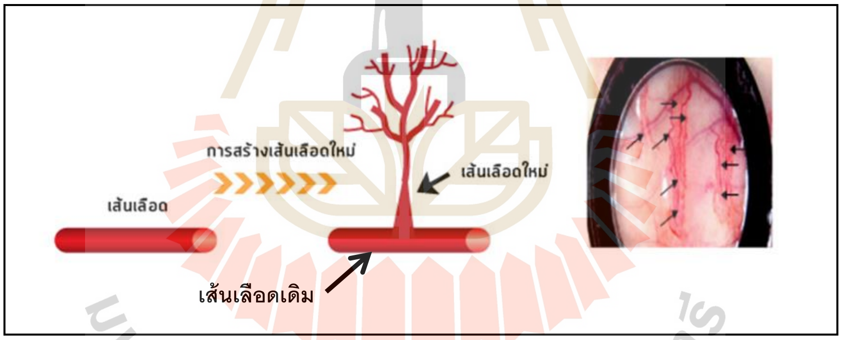
กลไกการยับยั้งการเกิด apoptosis โดยเซลล์มะเร็งมักเกิดกับ tumor suppressor gene โดยเฉพาะ *p53* (*TP53*) เพราะเป็น gene ที่สร้างโปรตีน p53 ที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor ทำให้เกิดการสร้าง pro-apoptotic protein BAX และ PUMA ได้ มากกว่า 50% ของมะเร็งทุกชนิดในคนมีการกลายพันธุ์ของ *p53* ส่งผลให้โปรตีน p53 ทำหน้าผิดปกติไป ลดปริมาณลง ถูกยับยั้งการสังเคราะห์ หรือไม่ก็เพิ่มตัวยับยั้ง p53 รวมทั้งลดการทำหน้าที่ของตัวกระตุ้น p53 เช่น human papilloma virus สร้างโปรตีน E6 ที่สามารถจับกับ p53 ทำให้ p53 ไม่ active เซลล์มะเร็งหลายชนิดลดระดับ หรือ การแสดงออกของ pro-apoptotic protein เช่น Bax, PUMA NOXA, APAF-1 เซลล์มะเร็งทรวงอก (breast cancer cell) ยับยั้ง activity ของ caspase 7 ที่เป็น effector caspase ก่อให้เกิด apoptosis เซลล์มะเร็งปอด (lung cancer cell) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer cell) ทำลาย pro-apoptotic protein Bik ด้วยการติดฉลาก ubiquitin เพื่อทำลาย (ubiquitination and degradation) นอกจากนั้นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่บางชนิดสามารถยับยั้ง XIAP ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง apoptosis หลั่งออกมาจาก mitochondria โดยชักนำให้เกิด autoubiquitination (Fernald and Kurokawa, 2013)

เนื่องจากความสมดุลระหว่าง pro- และ anti-apoptotic Bcl-2 family protein มีบทบาทสำคัญต่อ MOMP ซึ่งชักนำให้เกิด apoptosis ใน intrinsic pathway เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่จึงมักป้องกันการเกิด MOMP ด้วยการขยายสัญญาณ (amplification) ของ anti-apoptotic protein หรือลด pro-apoptotic protein ใน Bcl-2 family protein ตัวอย่างกลไกการขยายสัญญาณการต้าน apoptosis ได้แก่ เซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง เกิด genetic translocation ของ *BCL-2* gene ส่งผลให้เกิดการแสดงออกอย่างต่อเนื่องด้วยการสร้าง Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein ตลอดเวลา (constitutive expression) ช่วยให้หลบหลีกการเกิด apoptosis เซลล์มะเร็งปอดและเซลล์เนื้องอกของกระดูก (lung and giant-cell tumor of bone) สามารถขยายสัญญาน (amplification) ของ *BCL-XL* gene ซึ่งสร้าง anti-apoptotic protein Bcl-XL ในทำนองเดียวกัน การขยายสัญญาณของ *MCL-1* gene ที่สร้าง anti-

apoptotic protein Mcl-1 มักถูกตรวจพบในเนื้อเยื่อของเซลล์มะเร็งปอด และ เซลล์มะเร็งทรวงอก นอกจากนั้น *Myc* oncogene ยังทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ anti-apoptotic Bcl-2 family protein ที่มีความสัมพันธ์กับความก้าวร้าวของพัฒนาการในก้อนเนื้องอก นอกจากนั้น เซลล์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) และเซลล์มะเร็งปอด เพิ่มระดับของโปรตีน XIAP โดยการแสดงออกของ miR7 และ miR-24 ที่ไปยับยั้ง XIAP mRNA เป็นการหลบเลี่ยง apoptosis เพราะ XIAP เป็น protein ที่หลั่งออกมาจาก mitochondria พร้อม cytochrome c โดย XIAP สามารถยับยั้ง apoptosis โดยไป inactivate effector caspase 3, 7, 9 (Fernald and Kurokawa, 2013; Hübner et al., 2008; Bean et al., 2013)

2.7 กระบวนการเกิดเส้นเลือดใหม่ในก้อนเนื้องอก

การเกิดเส้นเลือดเลือดใหม่ (angiogenesis) คือกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่จากเส้นเลือดเดิมที่มีอยู่ (pre-existing capillaries และ post-capillary venules) (รูปที่ 2.7) โดยมีรากศัพท์ “angio” แปลว่าเส้นเลือด “genesis” แปลว่า “การเกิด”



รูปที่ 2.7 ปรากฏการณ์ของการสร้างเส้นเลือดใหม่ การสร้างโครงข่ายเส้นเลือดใหม่ออกจากเส้นเลือดที่มีอยู่เดิม (ดัดแปลงจาก https://www.heimat-ltd.com/th/research/anti-angiogenesis/about-angiogenesis.html)

กระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่เป็นกระบวนการปกติที่เกิดในร่างกายที่มีการควบคุมอย่างเคร่งครัด จำเป็นสำหรับการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อในร่างกายและมีบทบาทในกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับระบบไหลเวียนโลหิต ในร่างกาย การสร้างเส้นเลือดใหม่พบได้ในช่วงระยะของการสมานบาดแผล (wound healing) ในเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโต เช่น ระยะการพัฒนาของตัวอ่อน (embryogenesis) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่ (tissue remodeling) การพัฒนาของ corpus luteum และการไหลเวียนสำรอง (collateral formation) เพื่อเพิ่มโลหิตในการหล่อเลี้ยงอวัยวะ (organ

perfusion) การสร้างเส้นเลือดใหม่เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ต้องอาศัยปฏิกริยาร่วมกันระหว่าง angiogenic factor ซึ่งเป็น ปัจจัยการกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด ส่วนประกอบของ เมตริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) และเซลล์อื่น ๆ อีกหลายชนิด การเร่งหรือกระตุ้นกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ สภาวะพยาธิสภาพ ความไม่สมดุล หรือ การขาดการควบคุมกระบวนการนี้อย่างต่อเนื่องเป็นสาเหตุหรือเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคได้หลายชนิด อาทิ เช่น หลอดเลือดที่ผิดปกติ (angiogenic disorder) โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) โรคข้อเข่าอักเสบ (Osteoarthrosis) โรคจอตาเสื่อมในเบาหวาน และผู้สูงอายุ อาการตาบอดสืบเนื่องจาก ocular neovascularization ความเสื่อมของผิวหนังจากแสงแดด (photoaging) โรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) โรคอ้วนหรือโรคที่เกี่ยวกับ metabolic syndrome รวมทั้งการลุกลาม (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Hong et al., 2014; Rajabi and Mousa, 2017; Szekanecz et al., 2010; Velasco et al., 2002; Chung and Eun, 2007; Cao, 2007; Detmar et al., 1994; Leong et al., 2005; Crawford et al., 2009; Heier, 2013; Siervo et al., 2010; Wang et al., 2004)

กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นกระบวนการสำคัญในการควบคุมการพัฒนา (development) และระยะความก้าวหน้า (progression) ของโรคมะเร็งหลายชนิด ก้อนเนื้องอก (tumor) ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 -2 ลูกบาศก์มิลลิเมตรจะไม่มีการสร้างเส้นเลือดใหม่ไปหล่อเลี้ยง แต่ถ้าก้อนเนื้องอกมีขนาดมากกว่า 2 ลูกบาศก์มิลลิเมตรขึ้นไป อาหารและออกซิเจนจะผ่านเข้าสู่เซลล์ที่อยู่ใจกลางของเนื้องอกได้ยาก ก่อให้เกิด hypoxia หรือสภาวะออกซิเจนต่ำภายในเซลล์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ในเนื้องอก เพื่อนำสารอาหารและออกซิเจนเข้ามาหล่อเลี้ยง รวมทั้งนำพาของเสียจากการสันดาปออกไปการก่อตัวของเส้นเลือดใหม่นี้เป็นกระบวนการของการลุกลามและขยายตัวของเนื้องอกซึ่งนำไปสู่การก่อตัวเป็นเนื้อร้ายได้ในที่สุด เนื่องจากกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่เป็นกระบวนการสำคัญช่วยการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งทั่วร่างกาย กระบวนการนี้จึงถูกใช้เป็นดัชนีบ่งชี้แนวโน้มของการพัฒนาจากเนื้องอกเป็นเนื้อร้ายหรือเป็นโรคมะเร็งได้ (Folkman, 1971; Bielenberg and Zetter, 2015)

เมื่อ basement membrane ในเนื้อเยื่อที่ได้รับการบาดเจ็บ หรือถูกทำลาย หรือในก้อนเนื้องอกที่เกิดภาวะ hypoxia และต้องการสารอาหารและออกซิเจนมาหล่อเลี้ยง กระบวนการเกิดเส้นเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ (neovascularization) รวมทั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ในก้อนเนื้องอก (tumor angiogenesis) มีขั้นตอนหลักดังนี้คือ (Rajabi and Mousa, 2017) (รูปที่ 2.8)

1. เซลล์ที่ผิวของหลอดเลือด endothelial cell เมื่อถูกกระตุ้นโดยสัญญาณโมเลกุลที่เป็น angiogenic factors หรือ growth factor ที่หลั่งจากเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต้องการให้เส้นเลือดไปหล่อเลี้ยง

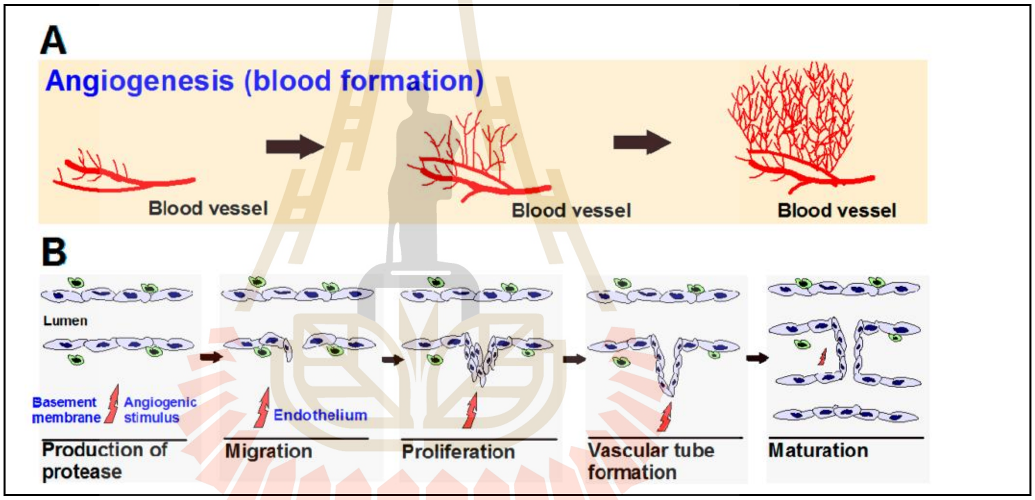
จะสร้างเอนไซม์ protease ย่อยส่วนที่เป็น basement membrane ของหลอดเลือด เพื่อเปิดเส้นทางให้มีการเจริญของ endothelial cell ไปยังเป้าหมาย

2. Endothelial cell เกิดการเคลื่อนที่ (migration)

3. Endothelial cell เกิดการเจริญ (proliferation) แบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวน ไปยังทิศทางของเนื้อเยื่อเป้าหมายตอบสนองตามความเข้มข้นของสัญญาณโมเลกุลที่เพิ่มสูงขึ้น

4. Endothelial cell มีการเรียงตัวต่อกันไปเซลล์ต่อเซลล์จนมีรูปร่างเป็นหลอดเลือด (vascular tube formation)

5. การประสานเชื่อมกันเป็นหลอดเลือดใหม่ที่สมบูรณ์ (anastomosis of newly formed tubes) มีการสังเคราะห์ basement membrane, มี matrix protein เข้ามาสะสม และมี pericytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่ช่วยรักษาความเสถียร (stabilize) ของหลอดเลือด รวมทั้งมี smooth muscle cell เกิดขึ้น

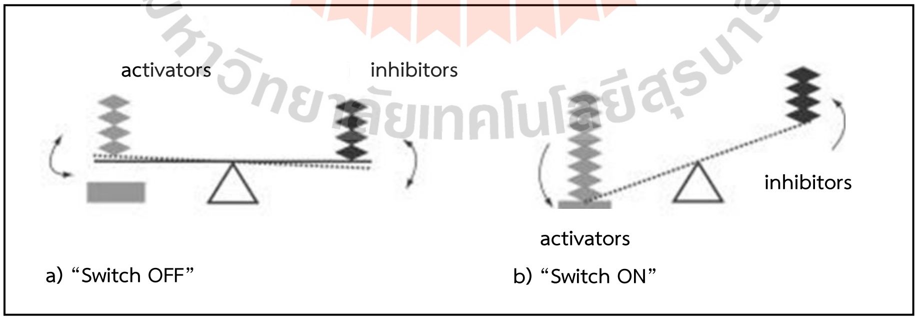


รูปที่ 2.8 แสดงการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่แตกแขนงออกจากเส้นเลือดที่มีอยู่เดิม (A) และขั้นตอนของการสร้างเส้นเลือดใหม่ (B) (Rajabi และ Mousa, 2017)

ในการชักนำการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็ง เซลล์ที่ผิวของหลอดเลือด (endothelial cell) เดิม ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณโมเลกุล (signaling molecules) หรือ growth factor ต่าง ๆ ที่หลั่งออกจากเซลล์เนื้องอกที่ต้องการหลอดเลือดใหม่ไปหล่อเลี้ยง ตัวอย่าง growth factor ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF) , basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF2), epidermal growth factor (EGF), angiogenin, transforming growth factor (TGF-α, TGF-β, tumor necrosis factor (TNF-α), platelet-derived endothelial growth factor, granulocyte colony-stimulating factor, placental growth factor, interleukin-8 และ

hepatocyte growth factor (Rajabi and Mousa, 2017) Angiogenic factors เหล่านี้ สามารถจับกับตัวรับรู้ (receptor) จำเพาะของมันบนผิวของ endothelial cell ทำให้หลอดเลือดยอมให้สารต่าง ๆ ซึมผ่าน (vascular permeability) ได้ง่ายขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง VEGF จัดเป็น growth factor ที่มีความสำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง VEGF แบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ VEGF B, C , D และ E VEGF ทำงานโดยการจับกับกลุ่ม tyrosine kinase receptors VEGFR-1, VEGFR-2 และ VEGFR-3 เมื่อ VEGFR-2 เมื่อจับกับVEGF จะส่งผลเกี่ยวกับการสร้างเส้นเลือดใหม่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) เป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุม expression ของ VEGF ในการตอบสนองต่อสภาวะ hypoxia HIF-1α จัดเป็นกุญแจดอกสำคัญของกระบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) การสร้างหลอดเลือดใหม่ของก้อนเนื้องอก การเจริญเติบโต การลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Liu et al., 2011) นอกจาก angiogenic activator ที่เป็นตัวกระตุ้น การสร้างเส้นเลือดใหม่ยังถูกควบคุมโดย angiogenesis inhibitor ที่มีอยู่ในร่างกาย อาทิเช่น soluble VEGF-1, thrombospondin-1 และ thrombospondin-2, angiostatin, angiopoietin-2, CCN3, vasostatin, osteopontin เป็นต้น (Rajabi and Mousa, 2017)

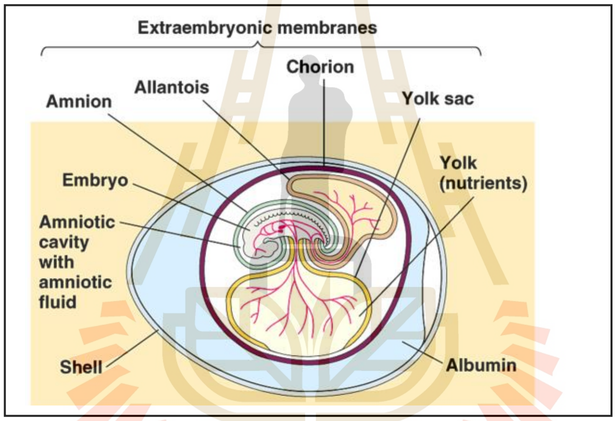
การรักษาความสมดุลระหว่างตัวกระตุ้น angiogenic activator และตัวยับยั้ง angiogenesis inhibitor ช่วยให้เกิดความสมดุลภายในของระบบหลอดเลือด (vascular homeostasis) อย่างไรก็ตาม ในเนื้องอก การกระตุ้นโดย angiogenic factors เพียงลำพัง ไม่มีอิทธิพลเพียงพอในการชักนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ เพราะมีมีบทบาทของตัวยับยั้งที่ควบคุมเชิงลบร่วมอยู่ด้วย ดังนั้น ในการชักนำการสร้างหลอดเลือดใหม่ของก้อนเนื้องอก นอกจากการกระตุ้นด้วย angiogenic factor แล้ว ยังจำเป็นต้องลดการควบคุม (down regulate) จากตัวยับยั้งด้วย (รูปที่ 2.9.) (Naoyo, 2006)



รูปที่ 2.9 การสร้างหลอดเลือดใหม่ถูกควบคุมโดยความสมดุลระหว่างตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง (a) เมื่อเนื้องอกต้องการพลังงาน สารอาหาร ออกซิเจน ก็จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (a) อย่างไรก็ตามตัวควบคุมเชิงลบหรือตัวยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่สามารถยับยั้งการทำงานของตัวกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ (b) (Naoyo, 2006)

2.7 โมเดลของ Chick chlorioallantoic membrane (CAM)

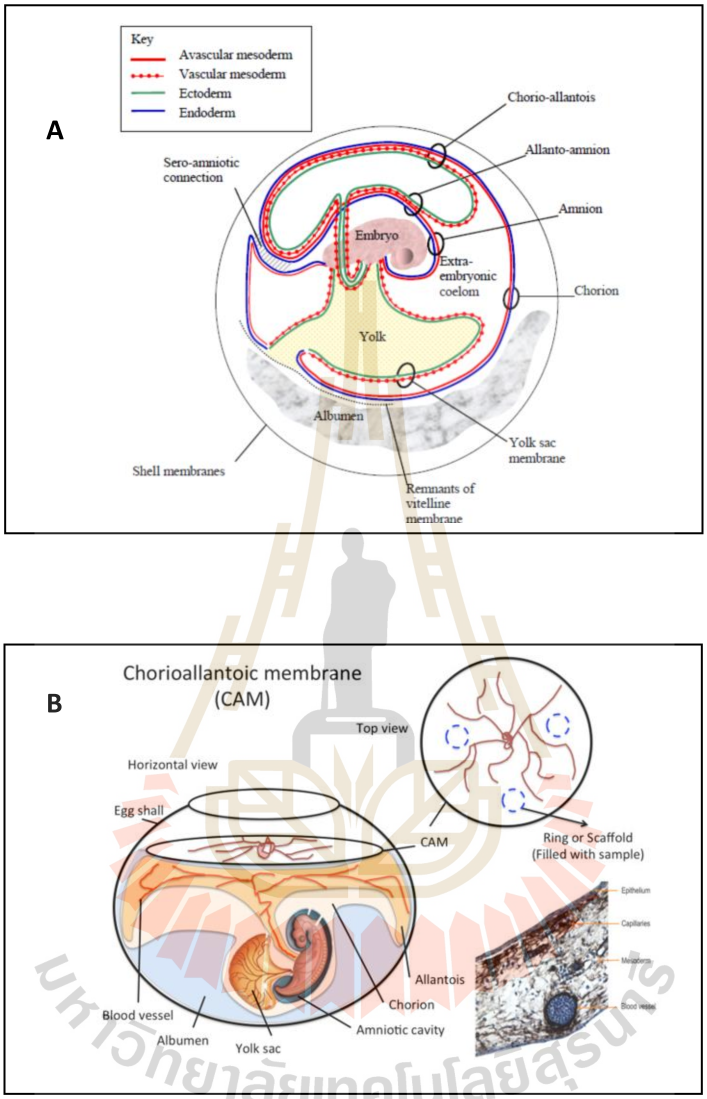
ในการพัฒนาตัวอ่อน หรือ embryo ของไก่ มีโครงสร้างของเนื้อเยื่ออยู่ด้านนอกของ embryo (extraembryonic membrane) ที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตที่ออกลูกเป็นไข่ (รูปที่ 2.10) คือ ถุงไข่แดง (yolk sac) เพื่อบรรจุอาหารเลี้ยงตัวอ่อน ถุงน้ำคร่ำ (amnion) และ ถุง chorion ที่เกิดจากการพับซ้อนของเนื้อเยื่อชั้นนอกและชั้นกลางเรียกว่า amniotic fold ทำหน้าที่ช่วยป้องกัน embryo จากการกระทบกระเทือนภายนอก โดยถุงน้ำคร่ำอยู่ใกล้ embryo ถุง chorion หุ้มอยู่รอบนอกล้อมรอบ embryo และโครงสร้างที่อยู่นอก embryo ไว้ทั้งหมด ระหว่างถุงน้ำคร่ำและ ถุง chorion เป็นช่องเรียกว่า chorionic cavity ที่ติดต่อถึง embryo ได้ ส่วน ถุง allantois ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊สภายนอกและเก็บของเสีย uric acid ที่ embryo ขับออกมา ถุง allantois ขยายตามขนาดของ embryo ที่เพิ่มขึ้น (http://www.vetech.in.th/ index.php?topic=2.0)



รูปที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของเนื้อเยื่อด้านนอกของตัวอ่อนในไก่ (http://www.bio.miami.edu/dana/pix/amnioticegg.gif)

Chorioallantoic membrane (CAM) เป็นเยื่อพิเศษอยู่นอกร่างกายตัวอ่อนในไข่ไก่ เกิดจากการหลอมรวมกันของเยื่อบุผิว (epithelial sheet) 2 ชั้น ระหว่างถุง chorion และ ถุง allantois (รูปที่ 2.11 A) CAM ก่อตัวขึ้นในวันที่ 3 ของระยะการพัฒนาของตัวอ่อน และเริ่มจับ (attachment) กับเยื่อชั้นในของเปลือกไข่ในวันที่ 4-5 CAM เป็นเยื่อชั้นนอกตัวอ่อนที่มีระบบเลือดมาหล่อเลี้ยงจำนวนมาก ทั้งหลอดเลือดแดง (arteries) หลอดเลือดดำ (veins) และหลอดเลือดฝอย (capillaries) (รูปที่ 2.11 B) ในวันที่ 16 CAM จะมีขนาดใหญ่จนเกือบคลุมถุงไข่แดงมิดและถูกดันติดกับเยื่อของเปลือกไข่ ทำให้ CAM สามารถทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊ส oxygen และ carbon dioxide ผ่านรูของเปลือกไข่ได้ CAM จึงทำหน้าที่แลกเปลี่ยนสารอาหาร และก๊าซระหว่างตัวอ่อนกับบรรยากาศที่ห้อมล้อมไข่ และ CAM ทำหน้าที่ของปอด

ในช่วงชีวิตของไก่ที่เป็นระยะตัวอ่อน โดย พื้นที่ผิวของ CAM จะเพิ่มจาก 6 ตารางเซนติเมตร ในวันที่ 6 จนถึง 65 ตารางเซนติเมตรในวันที่ 14 (Ribatti, 2014; Deryugina และ Quigley, 2008; Miller et al., 2004)



รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้างของ CAM ที่ประกอบจากการหลอมของเยื่อจากถุง chorion และ ถุง allantois (A) และระบบเลือดที่มาหล่อเลี้ยง (B) (https://stemcell2016blog. wordpress.com /2017/03/14/การประยุกต์-chorioallantoic-membrane; Baggott, 2001)

ในปัจจุบัน CAM เป็น *in vivo* โมเดลที่ได้รับความนิยมอย่างสูงในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเส้นเลือดใหม่ของก้อนเนื้องอก (tumor angiogenesis) การลุกลาม และ การแพร่กระจายของโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งที่ลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) และ/หรือมะเร็งที่ทวารหนัก (bowel

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

cancer) เนื้องอกของเซลล์สมองหรือไขสันหลังที่มีต้นกำเนิดจา glia cell (glioma) มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งในเม็ดเลือดขาว (leukemia) และ มะเร็งกระดูก (osteosarcoma) เป็นต้น รวมทั้งนิยมใช้โมเดล CAM ในการคัดกรอง (screen) สารที่กระตุ้น หรือ ยับยั้งการเจริญของเส้นเลือดใหม่ (Lokman et al., 2012; Deryugina and Quigley, 2008) ข้อได้เปรียบที่ทำให้โมเดล CAM เป็นที่นิยมในการศึกษาเกี่ยวกับเนื้องอก หรือ มะเร็ง; มีดังนี้ คือ

1 ธรรมชาติของ CAM ที่มีหลอดเลือดหล่อเลี้ยงจำนวนมาก ช่วยส่งเสริมการปลูกถ่ายของเซลล์เนื้องอก (tumor cell grafting) CAM จะเกิดการเจริญของหลอดเลือดจนกระทั่งถึงวันที่ 11 ของการพัฒนาในตัวอ่อน และในช่วงระหว่างวันที่ 8-10 กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่จะมีความไวสูงสุดในการตอบสนองต่อสารทั้งที่สามารถส่งเสริม หรือ ต้านการเจริญของหลอดเลือดใหม่

2 ให้ผลการทดลองที่สม่ำเสมอ (reproducibility)

3 เป็นโมเดลที่ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำ

4 ใช้เวลาน้อยในการทดสอบเมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองอื่น

5 การทดสอบ CAM เป็นระบบปิด ดังนั้น โมเลกุลของสารทดสอบที่มีขนาดเล็ก เช่น petptide สั้น ๆ จะมีอายุครึ่งชีวิต (half life) ยาวกว่าใน CAM เมื่อเปรียบเทียบกับอยู่ในร่างกายของสัตว์ทดลองอื่น โมเดล CAM จึงสามารถใช้ทดสอบศักยภาพของสารที่จะใช้เป็นตัวต่อต้านการแพร่กระจายของมะเร็งทีมีปริมาณจำกัด

6 CAM ประกอบด้วย extracellular matrix protein เช่น fibronectin, laminin, collagen type I และ integrin α_v/β_3 ซึ่งเลียนแบบ หรือใกล้เคียงกับสภาวะแวดล้อมจริงของเซลล์มะเร็งเมื่ออยู่ภายในร่างกาย

เนื่องจากยังไม่มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันใน CAM จนกระทั่งตัวอ่อนมีอายุครบ 17 วัน จึงทำให้ CAM เป็นโมเดลที่เหมาะสมสำหรับงานด้านการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถปลูกถ่ายเซลล์ได้ทุกชนิด แม้เซลล์ที่ปลูกถ่ายจะเป็น species ต่างกัน ดังนั้น นอกจากจะได้รับความนิยมอย่างสูงในงานวิจัยเกี่ยวกับมะเร็ง CAM ยังถูกใช้เป็นโมเดลในการศึกษาด้านปลูกถ่ายเซลล์ หรือเนื้อเยื่อด้วย (Lokman et al., 2012; Chen et al., 2010; Deryugina และ Quigley, 2008; Miller et al., 2004; Peifer และ Dannhardt, 2004)

2.8 การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ (Mutation) คือการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม โดยการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลิโอไทด์ (nucleotide sequence) ใน coding region ของ DNA ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับของ amino acid ในโปรตีน หรือ การกลายพันธุ์อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงใน noncoding regions ของ DNA ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ gene เช่น เร่งการทำงานของ promoter เป็นต้น สาเหตุการกลายพันธุ์อาจเกิด 1) ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ในระหว่างการแบ่งเซลล์ กลไกที่เกิดการกลายพันธุ์อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงเพียง 1 nucleotide จนกระทั่งการสูญเสีย ทวีจำนวน หรือ การจัดเรียงตัวใหม่ของ chromosome (Mahdieh and Rabbani, 2013) เชื่อกันว่าในวิวัฒนาการของมนุษย์ มีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์อยู่ที่ 0.5×10^{-9} ต่อ base-pair ต่อ ปี (Scally et al., 2016) 2) เกิดจากการชักนำ (induced mutation) โดยสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เช่น รังสีแกมมา แสง UV, หรือ สารเคมี เช่น benzo(a)pyrene, ethylene dibromide, nitrite, hydroxylamine, methylene chloride หรือยาบางชนิด เช่น mitomycin C, adriamycin เป็นต้น (Klassen and Doull, 2013) สารก่อกลายพันธุ์จะสามารถจับกับ DNA ได้โดยตรง และก่อให้เกิดรอยโรค (lesion) ในโครงสร้าง หรือ ความผิดปกติในเบสของ DNA แต่สารบางชนิดจำเป็นต้องผ่านกระบวนการ metabolism ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในร่างกายก่อน จึงเกิด metabolite product ที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ สารก่อกลายพันธุ์ประเภทที่ต้องถูกกระตุ้นโดยกระบวนการ metabolism เรียก pro-mutagen เอนไซม์สำคัญในร่างกายที่สามารถเปลี่ยน pro-mutagen ให้เป็น mutagen ได้แก่ cytochrome P450, microsomal epoxide hydrolase และ glutathione-S-transferase (Marinkovićl et al., 2013)

การกลายพันธุ์อาจเป็นการกลายพันธุ์ระดับ gene (gene-based mutation) หรือ การกลายพันธุ์ระดับ chromosome (chromosomal mutation) ถ้าการกลายพันธุ์ระดับ gene เป็นการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เบสเพียงตัวเดียว โดยเฉพาะตรงตำแหน่งของ gene ที่เป็นรหัส (code) สำหรับการสร้างโปรตีนเรียกว่า Point mutation ซึ่งจัดเป็น micro lesion ตัวอย่างของ gene locus mutation (Mahdieh and Rabbani, 2013; Klassen and Doull, 2013; Williams, 2003) ได้แก่

1. Base-pair substitution เป็นการแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสอีกชนิดหนึ่งทำให้การจับคู่กับเบสคู่สมของสาย DNA เปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนเบสอาจจะเป็นการเปลี่ยนแบบ transition คือเปลี่ยนเบสจาก purine (A, G) เป็น purine (G, A) หรือ เปลี่ยนจาก pyrimidine (C, T) เป็น pyrimidine (T, C) หรือการเปลี่ยนแปลงเบสอาจจะเป็นแบบ transversion คือเบสเปลี่ยนจาก purine (A, G) เป็น pyrimidine (T,C) หรือ เปลี่ยนจาก pyrimidine (T, C) เป็น purine (A, G)

2. Deletion เกิดการสูญหายของ base pair อาจจะหายไป 1 nucleotide หรือ base pair จำนวนเพียงเล็กน้อย ที่กระทบต่อการทำหน้าที่ของเพียง gene เดียว

3. Insertion หรือ Addition มีการเพิ่ม 1 nucleotide หรือ เพิ่ม base pair จำนวนเล็กน้อย

การแทนที่คู่เบส หรือ base-pair substitution อาจส่งผลลัพท์ที่แตกต่างกันดังนี้คือ

1. Missense mutation คือการกลายพันธุ์ที่การเปลี่ยนแปลงของเบสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรม (codon) ส่งผลให้ amino acid ชนิดเดิมใน protein ถูกแทนที่ด้วย amino acid ชนิดใหม่ และทำให้คุณสมบัติของโปรตีนเปลี่ยนแปลงจากเดิม

2. Nonsense mutation คือการกลายพันธุ์ที่การเปลี่ยนแปลงของเบสทำให้ codon เดิมซึ่งเป็นรหัสสำรับการสร้าง amino acid เปลี่ยนไปเป็นรหัสหยุด (stop codon) ส่งผลให้สาย polypeptide

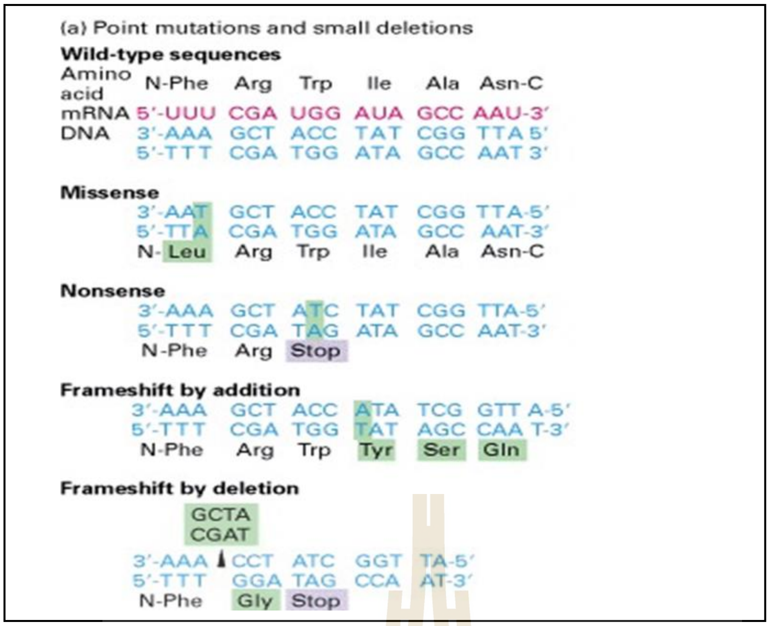
ของโปรตีนไม่สามารถสังเคราะห์ให้ยาวต่อไป เพราะพบ stop codon (UAA, UAG และ UGA) เสียก่อน

3. Silent mutation คือการกลายพันธุ์ที่ไม่ส่งผลกระทบใด ๆ เพราะการเปลี่ยนแปลงของเบสไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ในสายโปรตีนแต่อย่างใด เช่น GCT, GCC, GCA, GCG ทุก codon เป็นรหัส สำหรับการสร้าง Ala ดังนั้น แม้เกิดการแทนทีเบสในตำแหน่งที่ 3 ยังคงได้ amino acid ตัวเดิมคือ Ala

4. Neutral mutation คือการกลายพันธุ์ที่แม้การเปลี่ยนแปลงเบสเดิมจะก่อให้เกิด amino acid ตัวใหม่ แต่ไม่ส่งผลกระทบใด ๆ ไม่มีความเสียหาย หรือ ผลประโยชน์ใดทั้งสิ้นจากการกลายพันธุ์ ทั้งนี้มักเป็นการกลายพันธุ์ที่พบในบริเวณที่ไม่ได้สร้างรหัสพันธุกรรม (non-coding region) ของ DNA

5. Frame shift mutation การกลายพันธุ์ที่เกิดในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้น หรือ การสูญหายของเบส แล้วทำให้ลำดับการอ่านรหัสพันธุกรรมของสาย DNA คลาดเคลื่อนไปจากเดิม จะส่งผลให้เกิดการสร้าง amino acid ที่ผิดจากเดิมต่อเนื่องกันไปตามลำดับของการถอดรหัสตาม triplet code ใหม่ที่เกิดจากการแทรก หรือการสูญหายไปของเบส ส่งผลให้โปรตีนยาวขึ้น สั้นลง หรือไม่ทำงาน

ตัวอย่างผลลัพท์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ระดับ gene แสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 แสดงตัวอย่างผลลัพท์จากการกลายพันธุ์แบบ point mutation และ การแทรกเพียงเบสเดียว หรือ การสูญหายของเพียงเล็กน้อย ไม่กี่เบส (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/ NBK21578)

โดยภาพรวมการกลายพันธุ์อาจทำให้เกิดการสูญเสียการทำหน้าที่ (loss-of-function) ของ gene ส่งผลให้เกิดการลดการสร้าง หรือ ลด activity ของโปรตีนที่ code จาก gene นั้น หรือการกลายพันธุ์อาจทำให้เกิดการเพิ่มการทำหน้าที่ (gain-of-function) ของ gene ส่งผลให้เพิ่มการสร้าง หรือเพิ่ม activity ของโปรตีนที่ code จาก gene และบางครั้งอาจทำให้เกิดคุณสมบัติขึ้นใหม่ที่อาจเป็นพิษ ชักนำไปสู่พยาธิสภาพต่าง ๆ ได้

การกลายพันธุ์ระดับ chromosome จัดเป็น macro lesion เพราะเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดกับ gene จำนวนมากของ chromosome ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตที่เกิด chromosomal mutation แสดงลักษณะอาการทาง phenotype ซึ่งมักมีมากกว่า 1 อาการ เรียกว่า กลุ่มอาการ หรือ syndrome นอกจากการแสดงอาการให้เห็นทาง phenotype การกลายพันธุ์ระดับ chromosome ยังถูกตรวจวิเคราะห์ได้ทาง genotype ด้วยการใช้เทคนิคต่าง ๆในห้องปฏิบัติการซึ่งมีทั้งเทคนิคในระดับเซลล์และในระดับอณูชีววิทยา เช่น การทำ karyototype, FISH ใน cytogenetics และการใช้เทคนิค RFLP, RT-PCR, real-time PCR, และ SSCP เป็นต้น ในการตรวจวัดวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา (Mahdieh and Rabbani, 2013) การเกิดการกลายพันธุ์ระดับ chromosome อาจเกิดจากสาเหตุดังนี้คือ

1. การเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างของ chromosome (stuctural aberrations) chromosome มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ซึ่งอาจสืบเนื่องจากการได้รับสารกัมมันตภาพรังสี

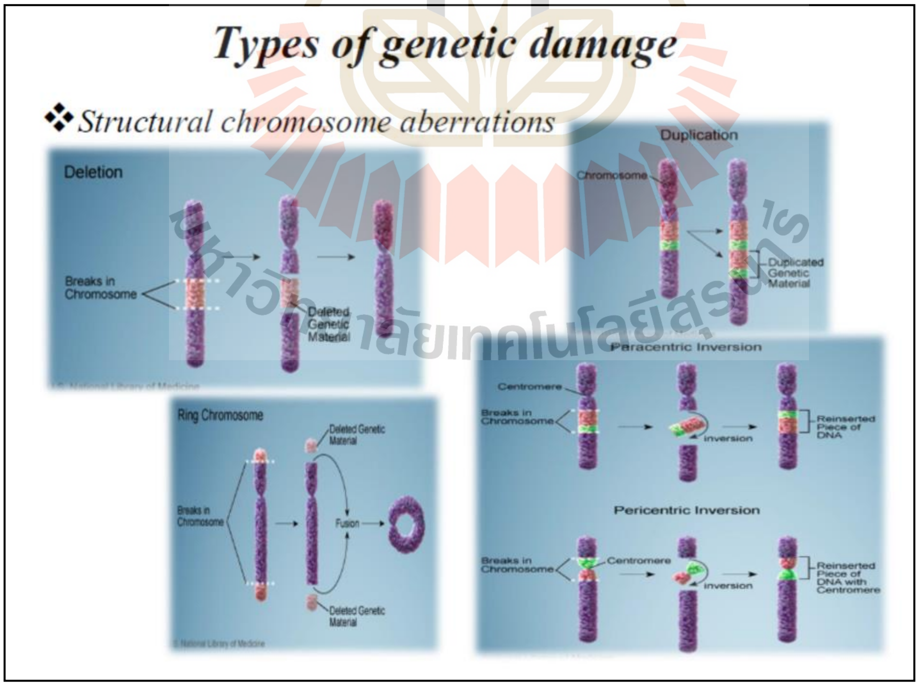
เช่น x-ray ได้รับสารเคมี มลภาวะ หรือยาบางชนิด เช่น mustard gas การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ chromosome (รูปที่ 2.13) อาจเกิดจากความผิดปกติที่แตกต่างกันดังนี้

1.1 การขาดหาย (deletion) คือความผิดปกติของ chromosome ที่มีบางชิ้นส่วนแตกหัก หรือขาดหายไป ถ้าส่วนที่ขาดออกไป ไม่มี centromere เรียกว่า acentric fragment

1.2 การเพิ่มเติม (duplication) คือความผิดปกติที่มีบางส่วนของ chromosome เพิ่มเติมขึ้นจากสภาวะปกติ ส่วนที่เพิ่มเติมขึ้นเรียกว่า duplicated segment

1.3 การสลับหัวหางของชิ้นส่วน (inversion) คือความผิดปกติที่บางส่วนของ chromosome มีการสลับหัวหาง อันเนื่องจากเกิดการแตกหักของ chromosome และชิ้นส่วนที่แตกหักนั้น เกิดการเชื่อมกลับที่เดิม แต่การเชื่อมเกิดการสลับหัวสลับหางกันขึ้น ถ้าชิ้นส่วน chromosome ที่เชื่อมสลับหัวหางนั้นมี centromere ร่วมด้วย เรียกว่า pericentric inversion แต่ถ้าไม่ได้รวม centromere เรียกว่า paracentric inversion

1.4 การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (translocation) คือความผิดปกติของ chromosome ที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนซึ่งกันและกันระหว่าง non-homologous chromosome



รูปที่ 2.13 แสดงความผิดปกติด้านโครงสร้างชนิดต่าง ๆ ของ chromosome (Aliomrani, 2016)

2. การเปลี่ยนแปลงทางด้านจำนวน (Numerical aberrations) คือความผิดปกติของ chromosome ที่มีจำนวนของ chromosome เพิ่มขึ้น หรือ ลดลงจากเดิม ซึ่งอาจจะเป็นแบบ aneuploidy หรือ euploidy สิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนของ chromosome ผิดไปจากเดิมเรียกว่า polyploidy

2.1 Aneuploidy คือความผิดปกติของจำนวน chromosome ที่เพิ่มขึ้น หรือ ลดลงจากจำนวนเดิมเพียง 1, 2, 3 หรือ 4 แท่ง มิได้ขาดหรือเพิ่มเป็นจำนวนชุดของ chromosome พื้นฐาน เช่น คนมีจำนวน chromosome 2n = 46 คนที่เป็น aneuploidy ที่จำนวน chromosome 2n-1 (ขาดไป 1 แท่ง) เรียกว่า monosomy ถ้าขาดหายไป 2 แท่ง (2n-1-1) เรียกว่า double monosomic แต่ถ้ามีจำนวน chromosome เพิ่มขึ้น 1 แท่ง เป็น 2n+1 เรียก trisomy เช่นในคนที่เป็น Down's syndrome ใน chromosome แท่งที่ 21 มี homologous chromosome เพิ่มขึ้นมาอีก 1 แท่ง (47,XX, +21) ถ้า aneuploidy ที่มีจำนวน homologous chromosome เพิ่มขึ้นจากจำนวนเดิม 2 แท่ง (2n+2) เรียกว่า tetrasomy แต่ถ้า chromosome ที่เพิ่มขึ้นมานั้น ไม่ใช่ homologous chromosome เรียกว่า double trisomic (2n+1+1) เรียกว่า doube trisomic เป็นต้น

2.2 Euploidy คือความผิดปกติที่จำนวน chromosome ขาด หรือ เพิ่มจากเดิมเป็นจำนวนชุด หรือจำนวนเท่าของจำนวน chromosome ขั้นพื้นฐาน โดย เช่น คนมี chromosome 2n = 46 (chromosome พื้นฐานคือ n = 23) การเรียกชื่อความผิดปกติเรียกตามจำนวนเท่าของจำนวน chromosome ขั้นพื้นฐานที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง เช่น พวก euploidy ที่มีจำนวน chromosome ลดลง 1 ชุด เหลือ n = 23 เรียกว่า monoploidy ถ้ามีจำนวน chromosome เท่ากับ 3 เท่าของชุด chromosome (3n = 69) เรียกว่า triploidy เป็นต้น ดังนั้น ถ้าเป็น tetraploidy, pentaploidy ก็จะหมายถึงความผิดปกติที่มี chromosome เพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 5 เท่าของ chromosome พื้นฐานตามลำดับ (Mahdieh and Rabbani, 2013; Klassen and Doull, 2013)

ในปัจจุบัน มีวิธีคัดกรองสารก่อกลายพันธุ์ใน *in vitro* ซึ่งถือว่าเป็นการคัดกรองสารก่อมะเร็งด้วย เนื่องจากสารก่อมะเร็งส่วนใหญ่มักมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และการกลายพันธุ์เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญยิ่งในการชักนำให้เกิดโรคมะเร็ง (Klassen and Doull, 2013; Griffiths et al., 2000; Tennant, 2014) ตัวอย่างวิธีการคัดกรองที่ใช้ได้แก่ Ames assay, chromosomal aberrations, unscheduled DNA synthesis, cell transformation assay และ microarray expression analysis เป็นต้น (Goldman and Shields, 2003)

2.9 สารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง

สารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในผัก ผลไม้ และธัญพืชส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วย โดยเฉพาะ polyphenol ในสารประกอบ phenolics และ β-sitosterol ใน phytosterol กลไกการต้านมะเร็งของสารเหล่านี้อาจจะเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis และยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง (Cao et al., 2002) ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata)* ชาลาบาดอร์ *(Ledum groenlandicum* Retzius) พริไทย *(Piper longum*) resveratrol ในองุ่นและ epigallocatechin-3-gallate จากใบชาเขียว (Cao et al., 2002; Sunila และ Kuttan, 2006; Dufour et al., 2007) สารพฤกษเคมีในพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง อาทิ เช่น acacetin มี flavonoids เป็นสารประกอบพบในพืชหลายชนิดทั้งเมล็ดและใบ สามารถยับยั้งการเจริญ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การลุกลามและการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง scopoletin พบในพืชหลายชนิดในประเทศจีนเช่น *Erycibeobtusifolia* Benth ใช้ในการรักษาโรครูมาตอยด์ ต้านการอับเสบ ต้านอนุมูลอิสระและต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยการยับยั้ง endothelial cell growth ใบฮว่านง็อกประกอบไปด้วย flavonoids, β-sitosterol และ apigenin-7-*O*-β-glucoside ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า สารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การอักเสบ และมะเร็ง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกน่าจะมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ซึ่งมีความเกี่ยวโยงกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหา phenolics และ flavonoids และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบฮว่านง็อก ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมุ่งเน้นฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ และ การยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ iNOS และ COX-2 รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis และการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งในการทดลองแบบ *in vitro และ in vivo* เนื่องจากได้มีการใช้สมุนไพรฮว่านง็อกมาช้านานในประเทศเวียดนาม และ ในไทย และยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับพิษเฉียบพลัน หรือพิษกึ่งเฉียบพลันจากการใช้ฮว่านง็อก แต่สิ่งที่ผู้บริโภคมักมีความกังวลเกี่ยวกับการใช้พืชสมุนไพรต่อเนื่องในระยะยาว คือพิษเรื้อรัง โดยเฉพาะการก่อกลายพันธุ์และการชักนำให้เกิดมะเร็ง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์การก่อกลายพันธ์ของสารสกัดใบฮว่านง็อกเพื่อประเมินความเป็นพิษในการบริโภคในระยะยาว ว่าสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือไม่ โดยเลือกวิธี Ames assay ที่เป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้นสำหรับสารก่อกลายพันธุ์ และ สารก่อมะเร็ง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี และ ชุดวิเคราะห์

1 kb DNA Ladder (New England Biolabs Inc., Beverly, MA)

100 bp DNA Ladder (New England Biolabs Inc., Beverly, MA)

1, 4-Piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

2-Aminoanthracene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

2-Nitrofluorene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (p-NAG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Absolute ethanol (Carlo Erba, Milan, Italy)

Albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Aluminum chloride hexahydrate ($AlCl_3 \cdot 6H2O$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

AnnexinV-FITC Apoptosis Detection kit (EXBIO, Czech Republic)

Anti-DNP (mouse monoclonal IgE) (SPE-7) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Apoptosis Assay Kit - FITC (Exbio, Prague, Czech Republic)

Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Bacto agar (Becton Dickinson, Sparks, MD)

Basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Biotin (ACROS, NJ, USA)

Catechin hydrate (Fluka Chemine GmbH, Buchs, Switzerland)

Crystal violet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

DCFH-DA: 2’,7’-dichlorofluorescin-diacetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Dinitrophenyl (DNP-albumin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

DMSO: Dimethyl sulfoxide (AMRESCO, Fountain Parkway Solon, OH)

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA)

ECL Western blotting substrate (Pierce^{TM} /Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

Ethidium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Etoposide (20 mg/ml) (Cayman, Ann Arbor, MI)

FBS: Fetal bovine serum (Hyclone, Logan, Utah)

Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3$•6H2O) (Carlo Erba , Milan, Italy)

Ferric-2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (FeIII-TPTZ) (ACROS, NJ, USA)

Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4$•$7H_2O$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Ficoll- Biocoll separating solution density 1.077 g/ml, isotonic (Biochrome, Berlin, Germany)

Folin-Ciocalteu’s phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

G-6-P (D-Glucose 6-phosphate disodium salt hydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Genomic DNA detection kit (Qiagen, Valencia, CA)

Glucose (Fluka, Germany)

Hank’s balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR)

HEPES: (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2 ethanesulfonic acid) (USB, Cleveland, OH)

Hexane (Carlo Erba, Milan, Italy)

Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

L-histidine (ACROS, NJ, USA)

LPS: lipopolysaccharide (*Escherichia coli* O111:B4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Magnesium chloride (Analar Normapur®, VWR Inc., Radnor, PA)

Magnesium sulfate (Carlo Erba, Milan, Italy)

Methyl alcohol (Fisher Scientific, Pittsburgh PA.)

mIFN-γ: Mouse interferon gamma (Piearce Protein Research Products, Rockford, IL)

Millipore's FlowCellect™ Cytochrome c kit (Millipore Corp. Billerica, MA)

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Invitrogen, Carlsbad, CA)

N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Na_2HPO_4 (Carlo Erba, Milan, Italy)

NaCl (AMRESCO, Fountain Parkway Solon, OH)

Nutrient broth no. 2 (Oxiod, Hampshire, UK)

PBS: Phosphate buffered saline (Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

Penicillin G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

PI: Propidium iodide (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR).

Potassium chloride (Carlo Erba, Milan, Italy)

QIAamp DNA Mini and Blood Mini kits (Qiagen, Valencia, CA)

Quercetin dihydrate (INDOFINE Chemical Company, Inc., Hillsborough, NJ).

RNase A (Genemark, Teipei, Taiwan)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY).

S9 fraction (ภาควิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่)

Sodium azide (NaN_3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Sodium hydroxide (Carlo Erba, Milan, Italy)

Sodium nitrite (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Streptavidin-HRP conjugate (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

Streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Sulfanilamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

*t*BuOOH: *tert*-butyl hydroperoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Trolox: 6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Sigma-Aldrich Chemine Gmbh, Steinheim, Germany).

Trypan blue solution (0.4%) (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR)

Trypsin (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY).

β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate (NADP-Na_2; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

3.2 Antibodies

α-Tubulin (mouse monoclonal IgG) (B-7, Sc5286) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)

Anti-COX-2 (murine polyclonal) (160106) (Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)

Anti-DNP (mouse monoclonal IgE) (SPE-7) (Sigma (St. Louis, MO)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Anti-iNOS (mouse monoclonal IgG1) (C-11) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)

Anti-mouse IL-6 (MP5-20F3) (eBioscience™, San Diego, CA)

Anti-mouse/rat TNF-α (TN3-19.12) (eBioscience™, San Diego, CA)

Biotinylated anti-mosure IL-6 (MP5-32C11) (eBioscience™, San Diego, CA)

Biotinylated anti-mosure/rat TNF-α (polyclonal Ab) (eBioscience™, San Diego, CA)

Goat-anti-mouse-IgG-HRP conjugate (Sc-2005) Santa Cruz (Santa Cruz, CA)

Goat-anti-rabbit-IgG-HRP conjugate (10004301) Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)

3.3 เซลล์สายพันธุ์ (Cell lines)

เซลล์มะเร็งแมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW264.7 (Mouse macrophage RAW264.7 cell line) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat (Human T cell leukemia Jurkat cell line) สั่งซื้อจาก Cell Lines Service (Eppelheim, Germany) เซลล์มะเร็งตับสายพันธุ์ HepG2 (Human hepatocyte-carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากสายพันธุ์ PC-3 (Human prostate adenocarcinoma cell line) และเซลล์มะเร็งเม็ดสีของผิวหนัง (melanoma) สายพันธุ์ B16-F10 สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) และ (Cell Lines Service, Germany)

3.4 น้ำ

น้ำที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็น deionized water ที่ได้จากเครื่องกรองน้ำของ Cascada Bio water (Life sciences, Ann Arbor, MI)

3.5 วัสดุ

วัสดุปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

15 ml และ 50 ml conical tubes (Corning Inc., Corning, NY)

96 well flat bottom plate (Corning Inc., Corning, NY)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

96 well plate costar black/clear bottom (Corning Inc., Corning, NY)

Culture flasks ขนาด 25 และ 75 cm^2 (Nunc, Rochester, NY)

Petri dish ขนาด 60x15 mm และ 100x15 mm (Corning Inc., Corning, NY)

Cell scraper (SPL Life Sciences Inc., Gyeonggi-do, Korea)

Acrodisc filter 0.2 μm (Corning Inc., Corning, NY)

วัสดุอื่นๆ

Glass test tube ขนาด 10x75 mm, 13x100 mm และ 16x125 mm

Immunolon strip plates (Thermo, York, PA)

ถุงมือ

3.6 เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

Applied Biosystems 7900 PRISM Thermocycler (ABI, Foster city, CA)

Autoclave (model HVE-50) Hirayama)

Biohazard safety carbinet class II (model SG600E, Holton)

Blender (Phillips)

Carbon dioxide incubator (SHEL LAB)

Centrifuge (model ICT15RT, Techcomp)

Compound microscope (model CX21, Olympus)

Dessicator (Schott)

EL-808 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT)

Electrohoresis power supply (EPS601, Amersham)

Electrophoresis system (model HE33, Hoefer)

FACScalibur^{TM} cell analyzer (model FACSCalibur flow cytometer)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(Becton Dickinson, Biosciences)

Gemini EM fluorescence microplate reader (Molecular Device)

Glasswares (Pyrex)

Haemocytometer and cover slip (Fisher Scientific)

Hot-air oven (Memmert GmblH & Co. KG,)

Immunolon strip plates (Thermo, York, PA)

Inverted microscope (model CKX41, Olympus)

Inverted fluorescence microscope (model Olympus IX51) (Olympus)

Low-e microscope slides (MirrIR) (Kevley Technologies)

Lyophilizer (Freeze-zone 12 plus, Labconco Corporation)

Micropipette 0.5-10 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl และ 500-5000 μl (Pipetman®, Gilson)

Microplate spectrophotometer (Cecil 1000 Series,Cecil instrument)

8-Multichannel pipette 5-50 μl และ 50-300 μl (Gibco)

Nanodrop (model ND-1000 spectrophotometer) (Bioactive)

Pasteur pipettes (Fisher Scientific)

pH meter (Metrohm)

Pump (Millipore)

Rotary evaporator with vacuum (model R205) (Buchi)

Water bath (Memmert)

WEALTEC Dolphin-DOC ultraviolet analyzer (WEALTEC Corp., Sparks, Nevada)

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (model PG5 002-S), Mettler Toledo)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (model PW254, ADAM®)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตู้เย็น (4˚C) (model Superior frost free T H 8903, Sharp)

ตู้แช่แข็ง(-20˚C) (Whirlpool)

ตู้แช่แข็ง(-80˚C) (Forma 900 series, Thermo scientific)

3.7 สถานที่ทำการวิจัย

ทุกการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) และ เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย กระทำในตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet class II) ทั้งนี้ ในงานทดลองด้าน cell culture และแบคทีเรีย ใช้ตู้ปลอดเชื้อ ตู้บ่มเซลล์ และตู้บ่มเชื้อแยกออกจากกัน คนละชุด ไม่ใช้ร่วมกันเด็ดขาด ในการทำงานด้านเซลล์ และ ด้านที่เกี่ยวกับแบคทีเรีย ใช้วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆปลอดเชื้อ รวมทั้งใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ระบุในการทดลองเกี่ยวกับเซลล์เป็นความเข้มข้นสุดท้ายของสารใน culture การบ่มเซลล์กระทำในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ $37^{\circ}C$ และ 5% CO_2 และการทดลองเกี่ยวกับเซลล์กระทำในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ชั้น 4 ส่วนการทดลองเกี่ยวกับแบคทีเรียกระทำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาชั้น 2 การทดลองอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์กระทำในห้องปฏิบัติการพิษวิทยาชั้น 4 ทุกห้องปฏิบัติการอยู่ที่อาคารเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ส่วนการทดลองเกี่ยวกับการแสดงออกของ IL-6 และ TNF-α gene ที่กระทำโดยใช้เครื่อง real time PCR กระทำที่ห้องปฏิบัติการ Centre for Integrative Toxicology, Michigan State University, ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลการทดลองที่แสดงทุกการทดลองเป็นตัวแทนของการทดลองแบบเดียวกันอย่างน้อยที่สุด 2 ซ้ำ

3.8 การเตรียมสารสกัดจากพืช

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ ethanol การสกัดแบ่งออกเป็นการสกัดใบสดด้วยวิธีการปั่น และการสกัดใบแห้งด้วยวิธีการหมัก (maceration) ตามด้วยการแยกเฉพาะส่วน (fraction) ที่ละลายน้ำ ที่ได้จากผงแห้งของสารที่สกัดด้วย 95% ethanol และสกัดต่อด้วยน้ำและ hexane

3.8.1 พืชที่ใช้ทดสอบ

ใบสดของฮว่านง็อก (*Pseuderanthemum palatiferum* nees Radlk.) ถูกซื้อมาจากชาวบ้านที่ปลูกพืชชนิดนี้ไว้เพื่อรักษาโรคต่างๆ จากจังหวัดยโสธร ตัวอย่างพืชถูกตรวจสอบโดย ดร. ก่องกานดา ชยามฤต นักอนุกรมวิธานพืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ตัวอย่างพืช (BKF 174009) ถูกเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

3.8.2 การเตรียมสารสกัดจากใบสดใน ethanol

สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดใบสดของฮว่านง็อกใน ethanol โดยใช้วิธีการปั่น มีขั้นตอนดังนี้คือ

1 ตัดก้านใบทิ้ง ล้างด้วยน้ำให้สะอาด เช็ดและผึ่งจนกระทั่งใบไม่เปียกชื้น ชั่งใบสด 100 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกร

2 ปั่นใบสด ใน ethanol 80% และ 95% (ใช้ใบสด 100 g : ตัวทำละลาย 400 ml) ด้วยเครื่อง blender ปั่น โดยเว้นจังหวะหยุดเป็นช่วง ๆ (ไม่เกิน 1-2 นาที) เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดความร้อนขณะปั่น และเริ่มปั่นใหม่ต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งใบละเอียด (รูปที่ 3.1)

3 กรองกากของใบฮง่านง็อกออกโดยใช้ผ้า gauze ที่พับซ้อนกันประมาณ 4-5 ชั้น เทน้ำปั่นใบฮว่านง็อกลงใน 50 ml conical tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 *x* g, 4°C เป็นเวลา 10 นาที

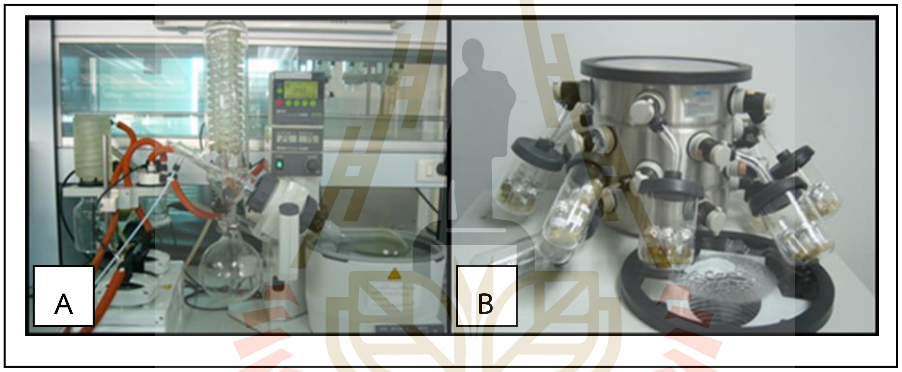
4 เก็บรวบรวม supernatant และนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 อีกครั้ง เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ยังคงอยู่ในสารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อก

5 รวบรวม supernatant ที่ผ่านการกรองทั้งหมดไปทำให้เข้มข้นด้วยการใช้เครื่อง vacuum rotary evaporator นำสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงที่ได้จากการระเหยภายใต้สูญญากาศ มาทำให้เป็นผงแห้งโดยการ lyophilization ด้วยเครื่อง freeze dryer (รูปที่ 3..2)

6 นำผงแห้งทั้งหมดที่ได้จากการสกัดในแต่ละครั้งมาผสมรวมกัน ชั่งน้ำหนัก และแยกเก็บเป็นส่วน (aliquot) เก็บไว้ที่ -20°C จากขั้นตอนนี้ได้ผลผลิตเป็นสารสกัดหยาบใบสดจาก 80% ethanol (crude extract of 80% ethanol fresh leaf extract: 80EE-FLP) และสารสกัดหยาบใบสดจาก 95% ethanol (95% ethanol fresh leaf extraction: 95EE-FLP)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.1 แสดงใบสดของฮว่านง็อก (A) ก่อนนำมาตัดและปั่นจนละเอียดใน blender (B)



รูปที่ 3.2 แสดงเครื่อง vacuum rotary evaporator (A) และเครื่อง freeze dryer (B)

3.8.3 การเตรียมสารสกัดที่ละลายน้ำจาก 95EE-FLP

เพื่อให้ได้สารสกัดที่ละลายน้ำได้จากใบสดที่สกัดด้วย ethanol ด้วยวิธีการปั่น จึงทำการแยก fraction ของสารที่ละลายน้ำจากสารสกัด 95EE-FLP โดยมีขั้นตอนดังนี้

1 ชั่งสารสกัดแห้งจาก 95EE-FLP 5 กรัม นำมาสกัดต่อด้วย hexane และ น้ำ (อัตราส่วน 1:1) ใน separatory funnel เพื่อสกัด chlorophyll ไขมัน และ wax ให้อยู่ในชั้น hexane ดังนั้นของเหลวจะแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือชั้นบนของ hexane ซึ่งเป็นสีเขียว และชั้นล่างที่เป็นน้ำซึ่งเป็นสีน้ำตาล

2 เก็บชั้นที่ละลายด้วยน้ำ ซึ่งแยกอยู่ชั้นล่างไว้ แล้วเติม hexane ในอัตราส่วน 1: 1 เพื่อทำการสกัดซ้ำชั้นของน้ำอีกประมาณ 2 ครั้ง หรือทำการสกัดจนกระทั่งได้ชั้น

ของ hexane ใส ซึ่งแสดงว่าได้กำจัด chlorophyll และ wax ออกจากสารสกัดส่วนทีละลายในน้ำออกได้หมดแล้ว

3 เก็บชั้นที่ละลายในน้ำมารวมกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 *x* g ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

4 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ทำให้เข้มข้นด้วยการ evaporation ด้วย vacuum rotary evaporator และตามด้วยทำให้แห้งเป็นผงโดยวิธี lyophilization ด้วย เครื่อง freeze dryer

5 นำสารสกัดที่เป็นผงแห้งจากชั้นของน้ำที่แยกส่วน (fractionate) จาก 95EE-FLP (WE-FLP) มารวมกัน ชั่งน้ำหนัก และแยกเก็บเป็น aliquot ไว้ที่ -20°C

3.8.4 การเตรียมสารสกัดจากใบแห้งใน ethanol

สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดใบแห้งของฮว่านง็อกใน ethanol ใช้วิธีการหมัก (maceration) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ตัดก้านใบทิ้ง และล้างด้วยน้ำให้สะอาด เช็ดและผึ่งในที่ร่มจนกระทั่งใบแห้ง
2. นำใบแห้งไปบดด้วยเครื่อง blender จนกระทั่งได้ผงแห้งที่ละเอียด
3. เติมผงบดแห้งของใบฮว่านง็อก 60 g ลงไปใน ขวดรูปชมพู่ขนาด 2000 ml และเติมตัวทำละลาย 95% หรือ 80% ethanol ลงไปในขวดรูปชมพู่ (ผงลดแห้ง 60 g : ตัวทำละลาย 600 ml)
4. ผสมสารละลายด้วยการใช้ magnetic stir bar บน hot plate magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม เทสารสกัดเก็บไว้ที่ 4°C และเติม 600 ml ของตัวทำละลายใหม่ (80% ethanol หรือ 95% ethanol) ลงไปใน flask อีก ทำแบบเดิมจนกระทั่งครบ 3 รอบ
5. นำสารสกัดทั้งหมดที่ได้ของแต่ละตัวทำละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ 3500 *x* g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1,
6. ทำให้สารสกัดเข้มข้นด้วยการ evaporation โดยใช้ rotary evaporator และทำให้เป็นผงแห้งด้วยวิธี lyophilization โดยใช้เครื่อง freeze dryer

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7 นำผงแห้งของสารสกัดทั้งหมดของแต่ละตัวทำละลาย มาชั่งน้ำหนัก และเก็บแยกเป็น aliquot ไว้ที่ -20°C ถึงขั้นตอนนี้ได้สารสกัดหยาบจากใบแห้งด้วยวิธีการหมักใน 80% ethanol (crude extract of 80% ethanol maceration extract: 80EE-DLPและใน 95% ethanol (crude extract of 95% ethanol maceration extract: 95EE-FLP)

3.8.5 การเตรียมสารสกัดที่ละลายน้ำจาก 95EE-DLP

เพื่อให้ได้สารสกัดที่ละลายน้ำจากใบแห้งที่สกัดด้วย ethanol ด้วยวิธีการหมัก จึงทำการแยก fraction ของสารที่ละลายน้ำออกจากสารสกัด 95EE-DLP โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งสารสกัดแห้งจาก 95EE-DLP 5 กรัม นำมาสกัดต่อด้วย hexane และ น้ำ (อัตราส่วน 1:1) ใน separatory funnel เพื่อกำจัด chlorophyll และ wax ออกมาให้อยู่ในชั้นของ hexane ดังนั้นของเหลวจะแยกออกเป็น 2 ชั้น คือชั้นบนของ hexane ซึ่งเป็นสีเขียว และชั้นล่างของส่วนที่ละลายในน้ำ ซึ่งมีสีน้ำตาล

2. เก็บชั้นที่ละลายด้วยน้ำ ซึ่งอยู่ชั้นล่างไว้ แล้วเติม hexane ใหม่ลงไปอีกในอัตราส่วน 1:1 ทำการสกัด chlorophyll และ wax ออกจากชั้นที่ละลายในน้ำ อีกประมาณ 2 ครั้ง หรือจนกระทั่งได้ชั้นของ hexane ใส

3. เก็บชั้นที่ละลายในน้ำมารวมกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 *x* g ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

4. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นก็ระเหยแห้ง ด้วยการใช้ rotary evaporator ตามด้วย lyohpillize จนได้ผงแห้งด้วยการใช้ freeze dryer

5. นำสารสกัดที่เป็นผงแห้งจากชั้นของน้ำที่แยกส่วน (fractionate) จาก 95EE-DLP (WE-DLP) มารวมกัน ชั่งน้ำหนัก และแยกเก็บเป็น aliquot ไว้ที่ -20°C

เก็บสารสกัดที่เป็นผงแห้ง คือสารสกัด 95EE-FLP, 80EE-FLP, 95EE-DLP, 80EE-DLP, WE-FLP และ WE-DLP แยกเป็นแต่ละ aliquot และเก็บไว้ที่ -20°C สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป ในการทดลอง สารสกัดที่ได้จาก ethanol นำมาละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ส่วนสารสกัดที่ได้จากชั้นของน้ำนำมาละลายในน้ำ ยกเว้นกรณีการทดลองที่เกี่ยวกับเซลล์ ใช้ phosphate buffered saline

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(PBS) หรือ complete media เป็นตัวทำละลายแทนน้ำ และสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol ละลายใน 0.25% DMSO เมื่อใช้ในงานทดลองในเซลล์ หรือใน *in vivo* CAM model

3.9 ปริมาณของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ของสารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อก

3.9.1 ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก (Total phenolic content)

การตรวจหาปริมาณรวมของ phenolics ใช้วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งอาศัยปฏิกิริยา redox ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาอันสืบเนื่องจาก molybdotungstate ion สารละลาย Folin–Ciocalteu reagent ประกอบด้วยสาร sodium tungstate, sodium molybdate, phosphoric acid และ sodium carbonate หลักการของวิธีทดสอบคือ เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน ไอออน Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลืองใน Folin-Ciocalteu reagent จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ที่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยา และวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งอาจใช้ tannic acid, gallic acid, หรือ catechin เป็นตัวแทนของสารประกอบ phenolics (Singleton et al., 1999) ดังนั้นจึงสามารถหาค่าของปริมาณของ phenolic ในแต่ละสารสกัดด้วยวิธีการของ Folin Ciocalteu (Mariod et al., 2006) งานวิจัยนี้เลือกใช้ gallic acid ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน สำหรับขั้นตอนของการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้

1. เติมสารสกัด 100 µl ลงไปในหลอดทดลอง (glass test tube) ตามด้วย 2 ml ของ 2% $NaCO_3$ และ ผสมด้วย vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

2 เติม 100 µl ของ 50% Folin-Cioculteu reagent (เตรียมสด 1:1 ของสารละลาย Folin : DI water) และผสมด้วย vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 30 นาที

3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 750 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series spectrophotometer

4 นำไปคำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน gallic acid ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.05-0.3 mg/ml

5 รายงานผลความเข้มข้นของสารประกอบ phenolic ในสารสกัดเป็น mg ของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมของสารสกัด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.9.2 ปริมาณรวมของ flavonoid (Total flavonoid content)

ปริมาณรวมของ flavonoids สามารถหาได้โดยใช้ aluminium chloride ($AlCl_3$) colorimetric method (Liu et al., 2002) หลักการทดสอบคือ $AlCl_3$ ทำปฏิกริยากับ C-4 keto group, C3 หรือ C-5 hydroxyl group ของ flavones และ flavonols เกิดการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรต่อกรด (acid stable complex) นอกจากนั้น $AlCl_3$ สามารถทำปฏิกริยากับ ortho-dihydroxyl group ของ flavonoids ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่เสถียรในกรด (acid labile complex) flavonoid ที่ทำปฏิกริยากับ $AlCl_3$ ใน acetate buffer ได้สาร kelate ที่มีสีเหลืองซึ่งวัดได้ด้วย spectrophotometre (Constanta และ Rodica, 2010) ขั้นตอนของการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เติมน้ำกลั่น (DI Water) 1.25 ml ลงไปในหลอดทดลอง ตามด้วยตัวอย่างของสารสกัด 0.25 ml จากนั้นเติม 75 µl ของสารละลาย 5% $NaNO_2$ ลงไปในหลอดทดลอง ผสมด้วย vortex และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที

2. เติม 150 µl ของ 10% ของสารละลาย $AlCl_3{\cdot}6H_2O$ ลงไปในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3. เมื่อครบกำหนดเวลา เติม 0.5 ml ของ 1 M NaOH ลงไปในหลอดทดลอง ตามด้วย DI water จนกระทั่งมีปริมาตรรวมเป็น 2.5 ml ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วย vortex

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 510 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series spectrophotometer คำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน catechin มีค่าอยู่ระหว่าง 0.05-0.4 mg/ml

5. รายงานความเข้มข้นของสารประกอบ flavonoid ในสารสกัดเป็น mg ของ catechin equivalent (CE) ต่อกรัมของสารสกัด

3.10 ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก

เนื่องจากอนุมูลอิสระมีหลายชนิด และกลไกการต้านอนุมูลอิสระมีหลายประเภท การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก จึงใช้วิธีการทดสอบทั้งหมด 3 วิธีคือ ตรวจสอบความสามารถในการ scavenging free radical ด้วยการใช้อนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH• ตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ ด้วยวิธี FRAP ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง ส่วนวิธีที่ 3 เป็นการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่เกิดภายในเซลล์ ด้วยการใช้สาร DCFH-DA ที่สามารถให้สารเรืองแสงภายในเซลล์

3.10.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น reagent ที่ใช้คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) ซึ่งเป็น organic nitrogen radical ที่เสถียรและมีสีม่วง อยู่ในตัวทำละลาย methanol ถ้าสารตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ คือกำจัด (scavenge) free radical ได้ ความเข้มของสารละลายสีม่วงของ DPPH• จะจางลง และให้สารที่ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm (Katsube et al., 2004) ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เติม 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดลงไปในหลอดทดลอง ตามด้วย 3.9 ml ของสารละลาย DPPH (2.5×10^{-2} g/L methanol) ผสมด้วย vortex บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที

2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 517 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series spectrophotometer

3 การรายงานผลของฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระกระทำในรูปแบบ median inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายความถึงความเข้มข้นของสารตัวอย่างในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• ได้ 50% ค่า IC_{50} ของสารสกัดหาได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % การยับยั้ง DPPH• กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง DPPH• ได้ 50% คือค่า IC_{50} เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH• สามารถคำนวณได้ตามสูตร

$$\text{Percent DPPH} \bullet \text{ scavenging activity} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100$$

A_{sample} และ $A_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ของสารตัวอย่าง (หลอดทดลองมีสารสกัด และ DPPH•) และ กลุ่ม control (หลอดทดลองมีเฉพาะ DPPH•) ตามลำดับ การลดลงของค่าการดูดกลืนสารละลาย DPPH• บ่งบอกถึงการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ในการทำลาย DPPH•

3.10.2 FRAP (ferric reducing/antioxidant power) assay

FRAP assay เป็นวิธีตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ที่สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 593 nm ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารตัวอย่าง กระทำโดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value การวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดกระทำตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996) ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมส่วนประกอบของ FRAP reagent คือ 0.1 M acetate buffer (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) solution ใน 40 mM HCl และสารละลาย 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
2. นำส่วนประกอบของสารทั้ง 3 ชนิด ผสมรวมกันด้วยอัตราส่วน 10:1:1 (v/v/v)
3. เติม 3 ml FRAP reagent ลงในหลอดทดลองที่มี 0.1 ml ของ สารสกัด และผสมด้วย vortex
4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 593 nm โดยการใช้ Cecil 1000 Series spectrophotometer
5. นำไปคำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน vitamin C ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 10-90 μg/ml
6. รายงานความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัด เป็น mg ของ vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ต่อกรัมของสารสกัด

3.10.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Cellular antioxidant activity; CAA)

งานวิจัยนี้เลือกใช้ DCFH-DA assay เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือต้าน oxidative stress ภายในเซลล์ สาร DCFH-DA (2’,7’-dichlorofluorescin-diacetate) เป็นสารประกอบ non-fluorescent ที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ เมื่อเข้าสู่เซลล์ เอ็นไซม์ esterase ภายในเซลล์จะตัดหมู่ diacetate ออกจากโมเลกุลของ DCFH-DA ได้สาร DCFH ที่ขั้วสูงขึ้น ทำให้อนุมูลอิสระที่อยู่ภายในเซลล์สามารถ oxidize DCFH และให้ผลผลิตสุดท้ายเป็น DCF ซึ่งเป็นสาร fluorescent ที่เรืองแสง (Wolfe

และ Liu, 2007) สัญญาณ fluorescent ที่เกิดจาก DCF จึงเป็นค่าแปรผันตาม intracellular oxidative stress ภายในเซลล์ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของ DCFH-DA assay ดำเนินตามวิธีการของ Kim et al., 2011 โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1. เก็บเกี่ยวเซลล์ RAW264.7 ที่เลี้ยงใน petri dish ขนาด 100x15 mm โดยการใช้ cell scraper

2. เติมเซลล์ RAW264.7 ($4x10^4$ เซลล์/หลุม) ที่อยู่ใน complete media ลงไปในหลุมของ 96 well plate Costar black/clear bottom จากนั้นบ่มเซลล์เป็นเวลา 16-18 ชม ที่ 37°C และ 5% CO_2

3. ล้าง media ออกจากเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ด้วยสารสกัด บ่มเซลล์ล่วงหน้ากับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50, 150 และ 250 µg/ml) ของ 95EE-FLP และ WE-FLP หรือบ่มร่วมกับ antioxidant positive control ได้แก่ catechin (250 µM), resveratrol (20 µM) และ quercetin (10 µM) เป็นเวลา 24 ชม. สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดที่เลือกใช้ ได้จากการทดลองเบื้องต้น (preliminary study) ที่หาความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 (ดังรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.9 การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์)

4. เมื่อครบ 24 ชม. ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ตามด้วยการเติม 20 µM DCFH-DA ที่อยู่ใน HBSS ลงไปในแต่ละหลุม และบ่มในที่มืดต่ออีกเป็นระยะเวลา 30 นาที (ภายหลังการเติม DCFH-DA ห่อ plate ด้วย aluminum foil เพื่อป้องกันแสง และขั้นตอนต่อไปในการทดลองให้กระทำในห้องที่มีแสงไฟสลัว)

5. เมื่อครบ 30 นาที ล้าง DCFH-DA ออก ด้วย PBS 2 ครั้ง และขั้นสุดท้ายเติมตัวกระตุ้น 500 µM tBuOOH ลงไปในแต่ละ หลุม

6. ติดตามผลโดยวัด intensity ของ fluorescence signal แบบ time-dependent ด้วย excitation wavelength ที่ 485 nm และ emission wavelength ที่ 535 nm โดยการใช้ Gemini EM fluorescence microplate reader

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.11. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเพื่อใช้กับเซลล์ RAW264.7

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของฮว่านง็อกในการโดย DCFH-DA assay และศึกษาด้วยการยับยั้งการสร้าง NO iNOS และ COX-2 ในการทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ของสารสกัดต่อ RAW264.7 เซลล์ จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์เพื่อใช้ในงานทดลอง

3.11.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW264.7

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 คือ RPMI-1640 ที่เติม (supplement) 10% heat-inactivate fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin และ 100 μg/ml streptomycin และ 25 mM HEPES เพื่อให้เป็น complete media เลี้ยงเซลล์ในตู้ carbon dioxide incubator ภายใต้สภาวะ 37℃, 5% CO_2 และความชื้นประมาณ 95% จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโต คลอบคลุมพื้นที่ผิว flask (confluence) ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทุกครั้งประมาณ 80% ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.11.2 การ trypsinize เซลล์

ในกรณีที่การเจริญของเซลล์สายพันธุ์เป็นประเภทต้องการสิ่งเกาะยึด (adherent cell) การเก็บเกี่ยว (harvest) หรือนำเซลล์ออกจาก culture flask สามารถกระทำได้โดยใช้ trypsin ซึ่งเป็น protease ทำลายโปรตีนที่เซลล์ใช้ในการเกาะยึดพื้นที่ผิวใน flask ที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ (culture flask) เรียกวิธีการนี้ว่า การ trypsinize เซลล์ โดยทั่วไป การ trypsinize เซลล์กระทำเมื่อปริมาณเซลล์เจริญคลุมพื้นที่ผิวใน culture flask ประมาณ 80-90 % รายละเอียดของขั้นตอนในการ trypsinize เซลล์ มีดังนี้คือ

1. Pipette complete RPMI หรือ DMEM media ออกจากเซลล์ที่อยู่ใน culture flask
2. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS
3. Trypsinize เซลล์ออกด้วยการใช้สารละลาย trypsin (0.25% trypsin 1 mM EDTA ใน PBS) โดยใช้ปริมาตรของสารละลาย trypsin ให้น้อยที่สุด แต่สามารถคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดของเซลล์ ซึ่งกระทำโดยขยับ flask ไปมาอย่างนิ่มนวลให้ trypsin ไหลคลุมผิวเซลล์ให้ทั่ว เช่น ถ้าใช้ culture flask ขนาดกลาง ที่มีพื้นที่ผิว 75 m^2 ใช้ trypsin ประมาณ 50- 100 μl

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. บ่มเซลล์ร่วมกับ trypsin ที่ตู้บ่ม 37 $^{\circ}$C 5% CO_2 เป็นระยะเวลาประมาณ 5-10 นาที ในระหว่างการบ่ม นำเซลล์ออกมาตรวจดูเป็นระยะด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (invert microscope) เพื่อดูว่าเซลล์ได้หลุดจากพื้นที่ผิวเกาะยึดหมดหรือยัง ทั้งนี้สามารถเคาะ flask เบา ๆ และหมั่นกลิ้ง trypsin ให้คลุมพื้นที่ผิวให้ทั่ว flask เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดง่ายขึ้น ระยะเวลาของการบ่มเซลล์กับ trypsin ควรใช้ระยะเวลาให้สั้นที่สุดเท่าที่จะกระทำได้ และไม่ควรใช้เวลามากกว่า 15 นาที เพราะ trypsin เป็น protease ถ้าสัมผัสกับเซลล์นานเกินไปเกิดเป็นพิษต่อเซลล์ได้
5. เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นที่ผิวเรียบร้อย รีบทำการต้านฤทธิ์ (neutralize) ของ trypsin ด้วยการใส่ complete RPMI media ซึ่งมี 10% FCS
6. ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 1,500 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที
7. ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS และ resuspend เซลล์ใน media ที่ต้องการใช้ในการทดลอง

3.11.3 การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ RAw264.7

การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เริ่มต้นด้วยการบ่มสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับเซลล์ การหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการบ่ม กระทำโดย 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ MTT assay, trypan blue exclusion และ propidium iodide (PI) staining รายละเอียดของขั้นตอนการทดลองมีดังนี้คือ

3.11.3.1 การบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด

1. ในกรณีที่ใช้วิธี MTT และ trypan blue ใส่เซลล์ RAW264.7 ($5x10^4$ เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate สำหรับวิธีที่ใช้การย้อมเซลล์ด้วย PI ใส่เซลล์ ($2x10^6$ เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 6-well plate
2. นำเซลล์ที่อยู่ใน plate เข้าบ่มค้างคืน (24 ช.ม.) ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°C, 5% CO_2
3. หลังจากนั้น เติมสารสกัดลงไปในแต่ละหลุมของ culture plate โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 0.05, 0.25, 0.5, 1.00 และ 1.5

mg/ml (สำหรับ 95EE-FLP) และ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.10, 0.50, 1.50, 4.50 และ 13.50 mg/ml (สำหรับ WE-FLP) บ่มเซลล์ต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม. ตัวทำละลายควบคุม (vehicle control) ของ 95EE-FLP และ WE-FLP คือ 0.25% DMSO และ complete media ตามลำดับ

4. เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ ด้วยการใช้ 3วิธีเปรียบเทียบกัน คือ MTT assay, trypan blue exclusion และ PI staining

3.11.3.2 MTT assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ ประเภท tetrazolium salt การใช้ MTT assay ประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตนั้น อาศัยหลักการว่า เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต หรือมี metabolically active เท่านั้น ที่สามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria เปลี่ยน MTT ให้เป็น formazan product โดยปฏิกริยา reduction formazan product ที่เกิดขึ้นมีสีม่วงน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550-600 nm (Mosman 1983; Denizot และ Lang, 1986) ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ formazan product จึงแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตนั่นเอง การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่ได้จาก 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์ RAW264.7 ด้วย MTT assay ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Chun et al. (2007) โดยมีรายละเอียดตามขั้นตอนดังนี้

1. ภายหลังการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดใน 96 well plate เติม 100 µl 0.5 mg/ml ของ MTT dye solution ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate และ บ่มที่ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชม.

2. เมื่อครบ 4 ชม. นำ 96 well plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm, 4°C เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ออกจาก plate

3. เติม 100 µl DMSO ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อละลาย formazan crystal ให้อยู่ในรูปของสารละลายสีม่วง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System

5. คำนวณเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{\% เซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD กลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ย OD กลุ่มทดลอง}} \times 100$$

3.11.3.3 Trypan blue exclusion

การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการใช้สี trypan blue อาศัยหลักการว่า สี trypan blue ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตได้ ดังนั้น เมื่อส่องดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ตายได้ เพราะเซลล์ที่มีชีวิตจะใส ย้อมไม่ติดสีของ trypan blue เฉพาะเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้นที่ย้อมติดสีน้ำเงินของ trypan blue การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อกต่อเซลล์ RAW264.7 ด้วยวิธีการย้อมสีด้วย trypan blue มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัด ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS และ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการใช้ 0.25% trypsin-EDTA (รายละเอียดในหัวข้อ 3.11.2 การ trypsinize เซลล์)

2. ย้อมเซลล์ด้วย 0.4% (w/v) trypan blue (เตรียมใน PBS) โดยใช้อัตราส่วนเซลล์ ต่อ trypan blue 1:1 (v/v) เช่นนำ single cell suspension 100 µl ใส่ในหลอดทดลอง และใส่ 100 µl 0.4% trypan blue เป็นต้น

3. Pipet เซลล์ที่ผสมอยู่กับสี trypan blue ลงไปในช่องของ haemocytometer สำหรับนับเซลล์และปิดด้วย cover glass

4. นับเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์มีลักษณะใสเพราะไม่ติดสีน้ำเงิน) และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (เซลล์ติดสีน้ำเงิน) ใน haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นสว่าง (light microscope)

5. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้สมการ:

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด-จำนวนเซลล์ที่ตาย}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.11.3.4 Propidium iodide staining

หลักการของการทดสอบคือ propidium iodide (PI) เป็นโมเลกุลเรืองแสง (fluorescent molecule) ที่ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิตได้ เฉพาะเซลล์ซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสียหาย ซึ่งอาจเป็นเซลล์ซึ่งกำลังตาย หรือเซลล์ที่ตายแล้วเท่านั้น ที่ยอมให้ PI ผ่านเข้าสู่เซลล์ เมื่อเข้าสู่เซลล์ PI ซึ่งเป็น intercalating agent จะแทรกตัว (intercalate) เข้าไปในระหว่าง base pair ของ double stranded DNA สี PI มี excited wavelengths 400-600 nm และ emission wavelength ระหว่าง 600-700 nm จึงทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ตายซึ่ง DNA ย้อมติดสีเรืองแสงของ PI ด้วยการใช้ flow cytometry หรือกล้องจุลทรรศน์ fluorescence (Crowley et al., 2016) การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดใบฮว่านง็อกที่ได้จาก 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์ RAW264.7 ด้วยวิธีการย้อมสี PI ใช้วิธีการของ Düchler และ Stepnik (2008) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย และมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. หลังจากที่บ่มเซลล์ด้วยสารสกัด ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
2. เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยการใช้ 0.25% trypsin-EDTA (รายละเอียดในหัวข้อ 3.11.2) และย้ายเซลล์ที่อยู่ใน PBS ลงไปใน 5 ml ของ flow-tube
3. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่อยู่ใน flow-tube เท PBS ออก และย้อมเซลล์โดยใส่ 100 µl ของ PI solution (1 mg/ml stock solution ที่เจือจาง 1:200) บ่มเซลล์กับ PI ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที
4. หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS และนำมาวิเคราะห์ผลโดยการใช้ BD FACSCalibur flow cytometer

3.12 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การหาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดฮว่านง็อก งานวิจัยนี้ศึกษาการยับยั้งการสร้าง NO ควบคู่ไปกับการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 รวมทั้งผลต่อ proinflammatory cytokines ในระดับ protein และ gene

3.12.1 การหาปริมาณ nitric oxide

หลักของการทดสอบคือ เมื่อเซลล์ macrophage RAW264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ เกิดการสร้าง NO ซึ่งไม่เสถียร ใน culture media NO จะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วได้ nitrite ซึ่ง

เป็น product ที่มีความเสถียรของ NO ปริมาณ nitrite สามารถตรวจวัดได้ง่ายโดยใช้ Griess reagent (Green et al., 1982) ดังนั้น จึงนิยมใช้ปริมาณ nitrite ใน culture เพื่อบ่งบอกปริมาณของ NO ที่สังเคราะห์ขึ้น แทนที่จะวัดปริมาณของ NO โดยตรงซึ่งกระทำได้ยาก วิธีการหาปริมาณ NO โดยหาเป็นปริมาณ nitrite ใน culture ด้วยการใช้ Griess reagent กระทำตามวิธีของ Oliveira et al. (2012) ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้คือ

1. ใส่เซลล์ RAW264.7 cells (2x10^5 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate และบ่มเซลล์ไว้เป็นเวลา 3 ชม. เพื่อให้เซลล์ติดพื้นที่ผิวของหลุม
2. เติม antioxidant control ได้แก่ vitamin C (500 μM) และ สารสกัดฮว่านง็อก 95EE-FLP และ WE-FLP (50, 100, 150, 200 and 250 μg/ml) ลงไปในแต่ละหลุม
3. หลังจากการบ่มเป็นเวลา 1 ชม. กระตุ้นการสร้าง NO ด้วยการเติม LPS 1 μg/mL+ IFN-γ 25 U/ml และบ่มต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.
4. เมื่อครบ 24 ชม. นำ 96 well plate ไปปั่นเหวี่ยง แล้วย้าย 100 μl ของ supernatant ไป 96 well plate ใหม่
5. เติม 100 μl ของ Griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride และ 3% phosphoric acid]. ลงไปใน plate ใหม่ที่มี supernatant ผสมให้เข้ากัน และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm โดยการใช้ Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System
7. ปริมาณของ nitrite ในตัวอย่าง คำนวณได้โดยเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน sodium nitrite

3.12.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2

3.12.2.1 การเตรียม protein lysate

1. Plate เซลล์ RAW264.7 (2x10^6 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 6 well plate และบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 3 ชม เพื่อให้เซลล์ติดที่พื้นที่ผิวของแต่ละหลุม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. เติมสาร antioxidant control ได้แก่ trolox (50 μg/ml) และ vitamin C (500 μM) รวมทั้งสารสกัดด้วย 95EE-FLP และ WE-FLP (50, 100, 150, 200 และ 250 μg/ml) ลงไปในแต่ละหลุม

3. หลังจากบ่มปีนเวลา 1 ชม. กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (1 μg/ml)+ IFN-γ (25 U/ml) เป็นเวลาอีก 18 ชม

4. ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS และเติม 150 μl ของ ice-cold lysis buffer (1 ml RIPA buffer, 2 mM PMSF, 2 μM leupeptin, และ 1 μl E-64) เป็นเวลา 20 นาที.

5. เมื่อครบ 20 นาที ย้าย cell lysate ที่อยู่ในแต่ละหลุมของ 6 well plate ไปที่ microcentrifuge tubes และ ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 *x* g ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที.

6. เก็บ supernatant ไว้ใน -80°C เพื่อนำไปทำ Western blot ต่อในขั้นตอนต่อไป และอีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

3.12.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนใน lysate โดยใช้วิธีของ Lowry et al., (1951) โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังต่อไปนี้

1. เจือจาง protein lysate ใน lysis buffer (1:10)

2. เติม 20 μg ของโปรตีนที่ถูกเจือจางแล้ว ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate ตามด้วย 200 μl ของ reagent D และบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3. เติม 20 μl ของ reagent C ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plat และบ่มที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 30 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 750 nm โดยการใช้ Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดโดยใช้ calibration curve ของสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

3.12.2.3 SDS-PAGE gel electrophoresis และ Western blot

การค้นหาฤทธิ์ของสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 กระทำโดยใช้เทคนิค Western blot ซึ่งเริ่มจากการแยกโปรตีนโดย polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีการของ Laemmli (1970) และหาชนิดโปรตีน iNOS และ COX-2 โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนทั้งสอง ขั้นตอนการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้คือ

1. นำ cell lysate ไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ใน 6X sample buffer (50 mM Tris-base, pH 7.4, 4% SDS, 10% glycerol, 4% 2-mercaptoethanol, 0.05 mg/ml ของ bromophenol blue) (ใช้อัตราส่วน sample : buffer = 5: 1 v/v)

2. โหลด (load) โปรตีนโดยใช้ 30 μg ของ cellular protein lysate ลงในแต่ละ lane ของ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) กระทำการแยกโปรตีนที่ 125 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที (ใช้ 7.5% polyacrylamide สำหรับ iNOS และ 10% สำหรับ COX-2)

3. ย้ายโปรตีนที่อยู่ในแผ่นเจลไปที่ nitrocellulose membrane โดยการ blot ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

4. Block nitrocellulose membrane ด้วยการใช้ 5% nonfat milk ใน 0.1% Tween-20 PBS-buffer (TPBS) โดยทำการบ่มข้ามคืนที่ 4°C

5. บ่ม nitrocellulose membrane ด้วย 1:1000 dilution ของ primary antibody anti-iNOS mouse monoclonal หรือ 1:2000 dilution ของ primary antibody anti-COX-2 mouse polyclonal ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม

6. ตรวจสอบและ normalize โปรตีนที่ load ในแต่ละเลนว่ามีปริมาณเท่ากันจริง โดยบ่ม nitrocellulose membrane ด้วย primary antibody anti-tubulin mouse monoclonal antibody ที่ได้เจือจาง 1 : 2000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7. ภายหลังการบ่มด้วย primary antibody ล้าง nitrocellulose membrane ด้วย TPBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และบ่ม nitrocellulose membrane ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. ด้วย 1:10,000 dilution ของ secondary antibody goat-anti-mouse-HRP conjugate สำหรับ iNOS และ tubulin และ goat- anti-rabbit IgG-HRP conjugate สำหรับ COX-2

8. ภายหลังการบ่มด้วย secondary antibody ล้างแผ่น membrane ด้วย TPBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

9. ในห้องมืด เติม ECL Western Blotting Substrate (Piearce Protein Research Products) ลงไปบน nitrocellulose membrane เคลือบให้ทั่วพื้นที่ผิว โดยบ่มเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยการประกบกับฟิลม์

10. รายงานผลปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยการใช้ software imageJ และ normalize โดยใช้แบนของ tubulin เป็นเกณฑ์

3.12.3 การยับยั้ง proinflammatory cytokines ของสารสกัด

LPS เป็น endotoxin ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ macrophage ให้สร้าง proinflammatory cytokines รวมทั้ง IL-6 และ TNF-α (Guha and Mackman, 2001) ซึ่งเป็นสารสื่อกลาง (mediators) ที่มีความสำคัญยิ่งต่อกระบวนการอักเสบเพราะ proinflammatory cytokine IL-6 และ TNF-α มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดการสร้าง acute phase protein เช่น CRP และ protease inhibitors และมีความเกี่ยวข้องกับปฏิกริยาต่างๆ ในภาวะที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น การเป็นไข้ (fever) การหลั่ง corticosteroid การตอบสนองต่อภาวะติดเชื้อ และ cytokine ทั้งสองมีระดับเพิ่มสูงขึ้นในแทบทุกระยะระหว่างภาวะที่เกิดการอักเสบ จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญในการรักษาเชิงคลินิก (Xing et al., 1998; Scheller et al., 2011; Popko et al., 2010) ดังนั้น นอกเหนือจากการศึกษาผลต่อการสร้าง NO, iNOS และ COX-2 งานวิจัยนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของฮว่านง็อกเพิ่มเติม ด้วยการตรวจสอบความสามารถของสารสกัด 95EE-FLP ในการยับยั้งการสร้าง IL-6 และ TNF-α ในระดับโปรตีน และระดับการแสดงออกของ gene ใน RAW 264.7 เซลล์ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ดังมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

3.12.3.1 การบ่ม RAW264.7 เซลล์กับสารสกัด

1. Plate เซลล์ RAW264.7 ($2x10^6$ เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 6 well plate และบ่มเซลล์ค้างคืน (ประมาณ 16 ชม.) ที่ 37°C 5% CO_2 เพื่อให้เซลล์ติดที่พื้นที่ผิวของแต่ละหลุม

2. วันรุ่งขึ้น บ่มเซลล์ล่วงหน้ากับตัวทำละลาย (0.125% DMSO) หรือ สารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50, 150, และ 250 µg/ml) เป็นระยะเวลา 1 ชม

3. หลังจากการบ่ม 1 ชม. กระตุ้นเซลล์ RAW264.7 ด้วย 100 ng/ml LPS และบ่มเซลล์ต่ออีกเป็นระยะเวลา 8 ชม

4. เมื่อครบกำหนดเวลา นำ culture plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 300xg เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนที่เป็น supernatant ไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80 °C เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของ proinflammatory cytokines IL-6 และ TNF-α ต่อไป (รายละเอียดในหัวข้อ 3.12.3.2)

5. หลังจากเก็บ supernatant เก็บเกี่ยว RNA ของเซลล์ที่เหลือติดอยู่ที่ก้นหลุมใน 6 well plate ด้วยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้ 175 µl lysis buffer จาก SV Total RNA Isolation kit (Promega, Madison, WI) เก็บตัวอย่างไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80 °C เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ IL-6 และ TNF-α ในระดับ gene ต่อไป

3.12.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ TNF-α และ IL-6

ปริมาณของ TNF-α และ IL-6 ที่สร้างโดยเซลล์ RAW264.7 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS วิเคราะห์โดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเริ่มจากการเคลือบ plate ด้วย monoclonal antibody (mAb) ที่จำเพาะต่อ cytokine ที่ต้องการหาปริมาณ ตามด้วยใส่ตัวอย่างทดสอบที่มี cytokine หลังจากนั้น ใช้ mAb ชนิดที่ 2 ที่มีความจำเพาะต่อ cytokine เดียวกัน แต่จับกับ epitope ของ cytokine ที่ต่างกันกับ mAb ชนิดแรก (epitope คือตำแหน่งบน antigen ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ Ab บางครั้งเรียกว่า antigenic determinant) เมื่อติดฉลาก mAb ชนิดที่ 2 ด้วย enzyme หรือ biotin ก็จะสามารถหาปริมาณของ cytokine ได้ด้วยการใส่

substrate (ในกรณีที่ติดฉลากด้วย enzyme) หรือใส่ streptavidin ที่เชื่อมติดกับ enzyme (streptavidin-conjugated enzyme) (ในกรณีที่ติดฉลากด้วย biotin) ซึ่งในกรณีหลังต้องตามด้วย substrate ในขั้นตอนสุดท้าย ก่อให้เกิด product ที่มีสี ซึ่งสามารถวัดปริมาณได้ด้วย colorimetric method โดยสีของ product ที่เกิดขึ้น เป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณของ cytokine ที่ถูกจับโดย mAb ที่จำเพาะทั้งสอง

สำหรับโครงการนี้ หาปริมาณ TNF-α และ IL-6 โดยเทคนิค ELISA ตามวิธีของ Condie et al. (1966) ดังมีรายละเอียดของการทดสอบดังนี้

1. เคลือบ mAb ที่จำเพาะต่อ TNF-α หรือ IL-6 ลงในแต่ละหลุมของ immunolon strip plates ด้วย 50 μl ของ 1 μg/ml anti-mouse/rat TNF-α หรือ anti-mouse IL-6 ตามลำดับ บ่มข้ามคืนที่ 4°C

2. วันรุ่งขึ้น ล้าง mAb ส่วนเกิน ที่ไม่ได้จับกับหลุมออก 3 ครั้ง ด้วยการใช้ 250 μl PBST (0.02% Tween 20 ใน phosphate buffered saline, pH 7.4) ในแต่ละครั้ง

3. เพื่อไม่ให้เกิดตำแหน่งที่มีการจับอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific binding site) block ช่องว่างในแต่ละหลุมที่อาจไม่มี Ab เคลือบด้วย 300 μl 3% bovine serum albumin (BSA) ใน PBST เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

4. ล้าง BSA ส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับหลุมออกด้วย 250 μl PBST จำนวน 3 ครั้ง

5. ใส่ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 50 μl ลงในแต่ละหลุม (supernatant จากเซลล์ RAW264.7 ที่บ่มร่วมกับสารสกัดและกระตุ้นด้วย LPS (ในหัวข้อ 3.12.3.1) หรือ สารอ้างอิง (mouse TNF-α recombinant protein หรือ mouse IL-6 recombinant protein) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเตรียม standard curve สารอ้างอิง IL-6 ใช้ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1000 U/ml สำหรับ TNF-α ใช้ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ng/ml บ่ม plate เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. ล้างด้วย 250 μl PBST จำนวน 3 ครั้ง

7. ใส่ 50 μl 1 μg/ml biotinylated anti-mouse/rat TNF-α หรือ biotinylated anti-mouse IL-6 เจือจางใน 3% BSA-PBST บ่มเป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

8. ภายหลังการล้าง 3 ครั้ง ใส่ 50 μl streptavidin-peroxidase conjugate ที่ได้เจือจาง 33.3 เท่า บ่มต่ออีก 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง

9. ภายหลังการล้าง 3 ครั้ง ใส่ TMB substrate และหยุดปฏิกิริยาด้วย 100 μl 6N H_2SO_4

10. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยความยาวคลื่น 450 nm ใช้ EL-808 microplate reader

3.12.3.3 การหา gene expression ของ TNF-α และ IL-6

การหาการแสดงออกของ proinflammatory gene TNF-α และ IL-6 กระทำโดยใช้เทคนิค real-time qRT-PCR (real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาจาก PCR (polymerase chain reaction) แบบดั้งเดิม แต่ใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถติดตามดูปฏิกิริยาของ PCR ได้ทุกระยะ และติดตามปริมาณของ DNA เป้าหมายที่เพิ่มขึ้นตามความเป็นจริงในแต่ละรอบ (cycle) ของปฏิกิริยา PCR ที่กำลังเกิดขึ้นในขณะนั้น (real time) เทคนิคนี้ ช่วยให้สามารถหาค่าของ PCR product หรือ DNA เป้าหมายที่กำลังเกิดขึ้นในเชิงปริมาณได้อย่างแม่นยำในแต่ละรอบ (cycle) ของ PCR โดยไม่ต้องตรวจสอบด้วยการ run gel electrophoresis เหมือน PCR ดั้งเดิม ในปัจจุบัน การตรวจสอบทางเคมีของ real time PCR อาจใช้สีที่แทรกจับกับ DNA เช่น SYBR Green I dye หรือใช้เป็นประเภท probe (probe based) ที่เป็นสาย DNA เส้นเดี่ยวที่ติดฉลากด้วย fluorophore ซึ่งมีให้เลือกใช้งานหลากหลายรูปแบบ เช่น Taqman, Molecular Beacons, Scorpions, MGB hybridization probes, AmpliFluor proes, LUX (light upon extenstion) probe เป็นต้น (Arya et al., 2005, Mirmajlessi and Loit, 2016; Wong and Medrano, 2005) สำหรับโครงการวิจัยนี้ เลือกใช้ TaqMan probes (NCBI, www, 2012) และหาปริมาณการแสดงออกของ TNF-α และ IL-6 gene ในเชิงปริมาณแบบเทียบสัดส่วน (relative quantification) ความเปลี่ยนแปลงระหว่างกลุ่มทดลอง (เมื่อมีสารสกัด) กับกลุ่มควบคุม (ไม่มีสารสกัด)

โดยใช้ The comparative C_T Method ($\Delta\Delta C_T$ Method) ตามวิธีที่ระบุของบริษัท (AB Applied Biosystems, Foster City, CA) การทดลองในส่วนนี้ กระทำการทดลองในห้องปฏิบัติการที่ Centre of Integrative Toxicology, Michigan State University โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Norbert Kaminiski ให้ไปใช้เครื่อง real time PCR ในห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

1. นำ cell lysate ที่ได้จากการสลายเซลล์ RAW264.7 ที่บ่มร่วมกับสารสกัด และกระตุ้นด้วย LPS ในหัวข้อ..) มาสกัด total RNA ด้วยการใช้ SV total RNA isolation kit ตามวิธีที่ระบุของบริษัท

2. หาปริมาณของ RNA ที่สกัดโดยใช้ Nanodrop ND-1000 spectrophotometer

3. qRT-PCR กระทำใน Applied Biosystems 7900 PRISM Thermo-cycler โดยใช้ Taqman assay system ดังมีขั้นตอนดังนี้

   3.1 Total RNA 250 ng ในปฏิกริยาที่มีปริมาตรรวม 25 μl ถูก reverse transcribed ได้ cDNA (complementary DNA) โดยใช้ High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (AB Applied Biosystems, Foster City, CA) ด้วยวิธีที่ระบุในบริษัท

   3.2 เตรียมปฏิกริยาของ PCR (ปริมาตร 20 μl) ที่มีส่วนประกอบดังนี้

cDNA ที่เป็นtemplate	2 μl
primer ของ gene เป้าหมาย	1 μl
18S ribosomal RNA	1 μl
TaqMan Universal PCR Master Mix	10 μl
น้ำ (nuclease free)	6 μl
รวม	20 μl

   3.3 ภายหลังการทำปฏิกริยา PCR ปรับค่าปริมาณ mRNA ของ gene เป้าหมาย (TNF-α หรือ IL-6) ให้ถูกต้องด้วยการ normalize กับ endogenous reference 18S rRNA และ

เทียบกับ calibrator (กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บ่มร่วมกับสารสกัด) ซึ่งได้จากการคำนวณจากสูตร $2^{-\Delta\Delta CT}$ และรายงานผลการแสดงออกของ gene เป็นจำนวนเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เซลล์ไม่ได้บ่มร่วมกับสารสกัด ตามหลักการที่ระบุในบริษัท (Bulletin 2, PN 4303859, AB Applied Biosystems; Bustin and Nolan, 2008; Overbergh et al., 2003)

3.13 การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดฮว่านง็อก

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด ใช้ 2 แนวทางที่แตกต่างกัน แนวทางแรกเป็นการศึกษา *in vitro* เพื่อดูความเป็นพิษของสารสกัดโดยตรงต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ 4 ขนิด และคัดกรองเซลล์สายพันธุ์ที่มีความไวต่อความเป็นพิษ เพื่อศึกษากลไกการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งโดยสารสกัดว่าเกิดผ่านกระบวนการ apoptosis หรือไม่ สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในแนวทางที่ 2 ใช้ *in vivo* model เพื่อดูความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ ที่เป็นกระบวนการสำคัญในการส่งเสริมการเจริญและพัฒนาการของก้อนเนื้องอก ความก้าวร้าว และระยะความก้าวหน้าของโรคมะเร็งเกือบทุกชนิด

3.13.1 ความเป็นพิษของสารสกัดโดยตรงต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเบื้องต้นของสารสกัดฮว่านง็อก กระทำโดยตรวจสอบความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับสายพันธุ์ HepG2 (Human hepatocyte-carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากสายพันธุ์ PC-3 (Human prostate adenocarcinoma cell line) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat (Human T cell leukemia Jurkat cell line) และใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear ในกระแสโลหิต (peripheral blood mononuclear cell; PBMCs) เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติ

3.13.1.1 การสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติชนิด mononuclear ในกระแสโลหิต (PBMCs)

เซลล์ PBMCs ได้จากการสกัดเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็น mononuclear ออกจากเลือด (whole blood) บริจาคจากคนปกติ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากธนาคารเลือดของโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา (แผนงานทดลองในส่วนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งของคนและตัวอย่างเลือดมนุษย์

ได้รับการรับรองและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุร-นารี ในประเภทงานวิจัยที่มีความเสี่ยงต่ำ รหัสโครงการเลขที่ EC-57-04 ทั้งนี้การได้กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็น mononuclear หรือ PBMCs อาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในเลือด เมื่อนำเลือดมาปั่นร่วมกับพวก Ficoll-hypaque ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ Biocoll separating solution ที่มีความหนาแน่น 1.077 g/ml isoton โดยมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1. ผสมเลือดกับ PBS ในอัตราส่วน 1:1
2. ใช้ pipet ดูดเลือดขึ้นมา แล้วค่อยๆปล่อยเลือดลงบน Biocoll separating solution ที่เตรียมไว้ใน centrifuge tube ขนาด 15 mL ใช้อัตราส่วน buffy coat : Biocoll separating solution เป็น 1:1 (v/v) จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C
3. ภายหลังการปั่นเหวี่ยง สารละลายถูกแยกเป็น 4 ชั้น คือ ส่วนก้นหลอดล่างสุดเป็นชั้นของเม็ดเลือดแดงร่วมกับ polymorphonuclear cell ชั้นถัดมาเป็นส่วนที่เป็น Biocoll separating solution ทีมีส่วนบนถัดขึ้นไปเป็นชั้นบางๆสีขาวของ buffy coat ซึ่งประกอบด้วย PBMCs และ ชั้นสุดท้ายบนสุดเป็นส่วนน้ำใสของ plasma
4. ใช้ pipette ดูดส่วนของ plasma ทิ้ง แล้วจึงดูดส่วนของ PBMCs อย่างระมัดระวัง เก็บแยกไว้ โดยพยายามหลีกเลี่ยงไม่ดูดส่วนที่เป็น Biocoll separating solution ให้ติดขึ้นมาด้วย หรือให้ติดขึ้นมาน้อยที่สุด
5. นำส่วนที่เป็น buffy coat ที่มี PBMCs ไปปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และนำไปใช้ในการทดลองเพื่อใช้เป็นเซลล์ปกติของกลุ่มควบคุมต่อไป

3.13.1.2 ความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบฮว่านง็อกที่ได้จาก 95 EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์ HepG2, MCF-7, PC-3, Jurkat เทียบกับ PBMCs มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ใส่เซลล์ คือ HepG2, MCF-7 และ Jurkat (2.5x10^{4} เซลล์/หลุม), PC-3 (2 x10^{4} เซลล์/หลุม) PBMCs (3 x10^{5} เซลล์/หลุม) ที่อยู่ใน complete media ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate ในกรณีของเซลล์มะเร็ง

สายพันธุ์ที่เป็น adherent cell จำเป็นต้องบ่มเซลล์ข้ามคืนล่วงหน้าที่ $37^{\circ}C$ และ 5% CO_2 เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับ plate ก่อนได้รับสารสกัด

2. บ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด โดยเติมสารสกัดที่ได้จาก 95EE-FLP และ WE-FLP ลงไปในหลุมที่มีเซลล์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50, 250, 500, 750, 1,000, และ 1,500 μg/ml

3. นำ plate เข้าบ่มที่ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชม จึงทดสอบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT ดังรายละเอียดที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.11.3.2

3.13.1.3 กลไกการเกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์โดยฮว่านง็อก

การทดสอบว่าสารสกัดฮว่านง็อกสามารถชักนำเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ให้เกิดการตายผ่านกลไกการฆ่าตัวเองของเซลล์แบบ apoptosis หรือไม่ กระทำการทดลองในเซลล์ Jurkat ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ที่มีความไวต่อสารสกัดฮว่านง็อก ข้อบ่งชี้ที่ยืนยันการตายของเซลล์ว่าเกิดผ่านกระบวนการ apoptosis มีหลากหลายวิธี แต่งานวิจัยนี้ เลือกใช้ 4 วิธี ที่จัดเป็น hallmark ของกระบวนการ apoptosis คือ 1) วิเคราะห์การแตกหักเป็นท่อนของ DNA (DNA fragmentation) แบบขั้นบันได ใน agarose gel electrophoresis 2) ตรวจดูสัณฐานวิทยาของ nucleus ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมด้วยสี Hoechst 33258 3) การย้อมเซลล์ด้วย annexin V-PI และ 4) วิเคราะห์การหลั่งของ cytochrome c

A **การบ่มเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ Jurkat ร่วมกับสารสกัด**

ทุกการทดสอบ เริ่มต้นด้วยการบ่มเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ Jurkat กับสารสกัดฮว่านง็อกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ Jurkat ขั้นตอนของการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้คือ

1. Plate เซลล์ Jurkat ที่อยู่ใน complete media จำนวน 1.875×10^{6} เซลล์ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 100 mm^{2} สำหรับการทดลองเพื่อวิเคราะห์การแตกหักของ DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis สำหรับการทดสอบด้วยการย้อม nucleus ด้วย Hoechst 33258 และการทดสอบที่ย้อมเซลล์ที่เริ่มตายด้วยสี anexin V ให้ plate Jurkat เซลล์ จำนวน 5×10^{6} เซลล์/หลุม ใน 6 well plate บ่มเซลล์ข้ามคืนที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ และ 5% CO_2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. วันรุ่งขึ้น บ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด โดยเติมสารสกัดที่ได้จาก 95EE-FLP และ WE-FLP ลงไปในหลุม ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100, 300, และ 600 µg/mL บ่มต่อที่ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชม. สำหรับที่ความเข้มข้นสุดท้าย 300 µg/mL ให้บ่มที่ 37°C, 5% CO_2 ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 6, 12, และ 24 ชม. ในทุกๆ การทดลองบ่มเซลล์ร่วมกับสารละลาย 0.1% DMSO และ บ่มร่วมกับยาต้านมะเร็ง etoposide 40 µg/mL เพื่อใช้เป็น vehicle และ positive control ตามลำดับ

B วิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)

ลักษณะหนึ่งซึ่งจัดเป็นเอกลักษณ์ของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis คือ การกระตุ้น caspase activated DNAase (CAD) ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ขนาดของท่อน DNA ที่แตกหัก หรือ DNA fragment สามารถตรวจสอบได้จากการเคลื่อนที่ของ DNA fragment ในสนามไฟฟ้าเมื่อถูกแยกออกจากกันตามขนาดของโมเลกุลภายใต้ agarose gel electrophoresis โดย DNA fragment ที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่า DNA fragment ที่มีขนาดใหญ่กว่า เนื่องจาก activated CAD ตัด genomic DNA ตรงตำแหน่งของ nucleosome เกิดเป็น oligonucleosome fragment ที่มีขนาดแตกต่างกันขึ้นกับจำนวนของ nucleosome ในแต่ละ fragment ที่ถูกตัดออกจาก genomic DNA เนื่องจากหนึ่ง nucleosome มีขนาดประมาณ 180-200 base pair ขนาดของ DNA fragment จึงเป็นจำนวนเท่าของ 180-200 base pair โดยแปรผันตามจำนวน nucleosome ในแต่ละ fragment จึงทำให้ DNA fragment ของเซลล์ที่เกิด apoptosis มีลักษณะจำเพาะเป็นแบบขั้นบันได (DNA ladder) เมื่อ load ลงใน agarose gel electrophoresis (Koopman et al., 1994; Cohen et al., 1992; Wyllie et al., 1984) ทั้งนี้ขนาดของ DNA fragment หรือจำนวน base pair สามารถหาได้โดยเทียบกับ DNA marker ที่รู้ขนาดของโมเลกุลแน่นอน ในการทดลองนี้วิเคราะห์การแตกหักของ DNA ในเซลล์ที่เกิด apoptosis โดยใช้ genomic DNA detection kit (Kang, 2003) การทดสอบกระทำตามวิธีที่ระบุของบริษัท ดังมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. เก็บเกี่ยวเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดเป็นระยะเวลา 24 ชม (รายละเอียดในหัวข้อ 3.13.1.2) ด้วยการ trypsinize เซลล์ (รายละเอียดในหัวข้อ 3.11.2) และล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง

2. เติม PBS 200 μl ในเซลล์ จากนั้นนำเซลล์มาสกัดดีเอ็นเอ (DNA) ด้วย QIAamp® DNA Mini Kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือของชุด kit

3. หาปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง Nanodrop ND-1000 spectrophotometer

4. นำดีเอ็นเอ 5 μg มาละลายด้วย AE buffer และกำจัด RNA ในตัวอย่าง โดยเติม RNase A 100 μg/mL (ความเข้มข้นสุดท้าย) จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที

5. Load DNA ใน 1.5% agarose gel และ electrophoresis ที่ 70 โวลต์, 110 นาที ใช้ 100 bp DNA markers

6. นำแผ่น gel มาย้อมด้วย ethidium bromide 0.5 μg/mL เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที

7. อ่านผลโดยนำแผ่น gel ไปส่องและถ่ายภาพภายใต้ WEALTEC Dolphin-DOC ultraviolet analyzer

C **การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสด้วย Hoechst 33258**

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ nucleus เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการตายแบบ apoptosis โดยการย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33258 ซึ่งเป็นสีเรืองแสงประเภท bisbenzimides ที่จับกับส่วนที่เป็น minor-grooves ของ DNA จึงมีคุณสมบัติในการย้อมติดบริเวณ nucleus โดยถ้าเป็นเซลล์มีชีวิตที่มี DNA ปกติ การกระจายของสี Hoechst 33258 จะสม่ำเสมอตลอดทั้งนิวเคลียส แต่ในกรณีที่เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ลักษณะของ chromatin เกิดการหดตัวแน่น (highly condensed chromatin) Hoechst 33258 ซึ่งสามารถผ่าน membrane ของเซลล์ที่ตายได้ดีขึ้น และย้อมติด chromatin ที่หดตัวแน่นได้เข้มขึ้น ใน apoptotic cell จึงพบการติดสีของ Hoechst 33258 หนาแน่น กระจุกรวมกันกว่าปกติ โดยเฉพาะถ้าเกิดการแตกหักของ DNA การติดสีของ Hoechst 33258 จะไม่สม่ำเสมอมีลักษณะเป็นหย่อมๆ (Kasibhatla et al., 2006) ขั้นตอนการย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33258 มีรายละเอียดดังนี้คือ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. ภายหลังการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดฮว่านง็อก เป็นเวลา 24 ชม (รายละเอียดในหัวข้อ 3.13.1.2.) เก็บเกี่ยวเซลล์ Jurkat ด้วยการ trypsinize เซลล์ (รายละเอียดในหัวข้อ 3.11.2) และล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง

2. ตรึงเซลล์ (fix) ด้วยการใส่ 200 µl p-formaldehyde (4%, v/v) บ่มนาน 20 นาที

3. ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง และย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33258 ความเข้มข้น 10 µg/mL นาน 30 นาที ในที่มืด

4. ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ไปส่องและถ่ายรูปด้วยกล้อง inverted fluorescence microscope (Olympus IX51, Olympus corporation, Japan)

D การย้อม apoptotic cell ด้วย Annexin V-PI

เซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรก (early apoptosis) มีลักษณะจำเพาะที่สำคัญคือ phosphatidyl serine (PS) ที่เดิมเคยอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ จะเคลื่อนออก (translocate) สู่ผิวนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ย้อมติดสี annexin V ซึ่งเป็นสีที่มีความจำเพาะ สามารถจับกับ PS ได้มากกว่า phospholipid ชนิดอื่น เนื่องจาก annexin V จับกับประจุลบของ PS ได้สูง สำหรับสี PI ย้อมติดเฉพาะเซลล์ตายที่คุณสมบัติเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ทำให้สี PI สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปแทรกตัวระหว่าง (intercalate) base ของ nucleotide (ทั้ง DNA และ RNA) เมื่อจับกับ DNA สี PI ให้สารเรืองแสง (fluorescent) เพิ่มขึ้นอีก 20-30 เท่า ช่วยให้ตรวจสอบ DNA ได้ง่าย ดังนั้น สามารถตรวจสอบการเกิด apoptosis ของเซลล์โดยใช้ annexin V ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (annexin V-fluorescein) ร่วมกับสี PI และวิเคราะห์ด้วย flow cytometer จะสามารถจำแนกเซลล์ได้ 4 สภาวะออกจากกันได้ คือ 1) เซลล์ที่มีชีวิต (ย้อมไม่ติด annexin V และไม่ติด PI) 2) เซลล์ที่เริ่มเกิด early apoptosis (ย้อมติด annexin V และไม่ติด PI) 3) เซลล์ที่เกิด late apoptosis/necrosis (ย้อมติด annexin V และ PI) และ 4) เซลล์ที่เกิด necrosis (ย้อมไม่ติด annexin V แต่ติด PI) (Fahrmann and Hardman, 2013; Zhang *et al*., 1997; Vermes *et al*., 1995; Vermes, *et al*., 2000; Darzynkiewicz, *et al*., 1992) ขั้นตอนของวิธีตรวจสอบการเกิด apoptosis โดยใช้การย้อมด้วย annexin V- PI ตามวิธีของบริษัทที่ระบุใน Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit ดังขั้นตอนดังนี้คือ

1. หลังจากบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดฮว่านง็อก เป็นเวลา 24 ชม (รายละเอียดในหัวข้อ 3.13.1.2) เก็บเกี่ยวเซลล์ Jurkat ด้วยการ trysinize (รายละเอียดในหัวข้อ 3.11.2) และล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง

2. เตรียมเซลล์จำนวน 5×10^{5} เซลล์ ใน 1X Binding buffer 100 µl

3. เติม Annexin V-FITC และ propidium iodide (PI) อย่างละ 5 µl เพื่อย้อมเซลล์ จากนั้นบ่มไว้ในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. หลังจากการบ่ม เติม 1X Binding buffer 400 µl และนำไปวิเคราะห์ทันทีด้วยเครื่อง flow cytometer

E การหลั่งของ Cytochrome C ใน apoptotic cell

เนื่องจากการหลั่ง cytochrome c จาก mitochondrial membrane สู่ cytoplasm เป็นขั้นตอนสำคัญของกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยเฉพาะกลไกของ intrinsic pathway โดย cytochrome C สามารถจับกับ Apaf-1 ใน cytoplasm เกิด apoptosome ซึ่งสามารถกระตุ้น caspase-9 ที่ไปกระตุ้น caspase 3 อีกต่อหนึ่ง จนนำไปสู่การเกิด apoptosis ในที่สุด (ดังรายละเอียดในหน้าที่ 18) ดังนั้น การตรวจสอบการเกิด apoptosis จึงสามารถกระทำได้โดยวัดระดับการลดลงของ cytochrome C ภายใน mitochondria ที่สามารถวัดได้โดยตรงจากการจับของ anti-cytochrome c-FITC และวิเคราะห์โดยใช้ flow cytometer การทดสอบกระทำตามวิธีของบริษัทที่ระบุใน Millipore’s FlowCellectTM Cytochrome c kit ดังมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. หลังจากบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดฮว่านง็อก เป็นเวลา 24 ชม (รายละเอียดในหัวข้อ 3.13.1.2) เก็บเกี่ยวเซลล์ Jurkat ด้วยการ trypsinize (รายละเอียดในหัวข้อ 3.11.2) และล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง

2. เตรียมเซลล์จำนวน 1×10^{6} เซลล์ ใน PBS 200 µl

3. ย้อมด้วย Millipore’s FlowCellectTM Cytochrome C kit โดยใช้วิธีที่ระบุของบริษัท (รายละเอียดในภาคผนวก E; E4)

4. หลังจากบ่มในขั้นตอนสุดท้าย นำไปวิเคราะห์ทันทีด้วย flow cytometer

3.13.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดฮว่านง็อกในโมเดล CAM

ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดฮว่านง็อกใน *in vivo* เลือกศึกษาโดยใช้ CAM model ที่ปลูกถ่าย หรือ inoculate ด้วยเซลล์มะเร็งผิวหนัง B16F10 melanoma ที่ชักนำให้สร้างเส้นเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยง และตรวจสอบผลของสารสกัดฮว่านง็อกในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็งควบคู่กับผลของสารสกัดต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM ตามธรรมชาติในสภาวะที่ไม่ได้รับเซลล์มะเร็ง

3.13.2.1 การศึกษาพิษโดยตรงของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็ง B16F10

เนื่องจากในการทดลองฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็ง B16F10 มีขั้นตอนที่มีการบ่มเซลล์ B16F10 ร่วมกับสารสกัดฮว่านง็อกในโมเดล CAM จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษโดยตรงต่อเซลล์ B16F10 เพื่อให้แน่ใจว่าการลดลงของเส้นเลือดใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น เป็นผลจากการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่โดยสารสกัด ไม่ใช่ผลสืบเนื่องจากเซลล์มะเร็งตาย หรือ มีจำนวนลดลง เพราะสารสกัดมีพิษโดยตรงของต่อเซลล์ อันส่งผลทางอ้อมให้การสร้างเส้นเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็งลดลงเช่นกัน ขั้นตอนในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ B16F10 มีรายละเอียดดังนี้

1. Plate เซลล์ B16F10 1×10^4 เซลล์/หลุมใน 96-well plate บ่มเซลล์ที่ $37^{\circ}C$ 5% CO_2 เป็นเวลาข้ามคืน (ประมาณ 16 ชม.)

2. เติมสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-1500 μg/ml) บ่มร่วมกับเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชม.

3. เมื่อครบเวลา ปั่นเหวี่ยง culture ที่ 1500 rpm 10 นาที ใช้ multichannel pipette ดูด media ออก

4. หาปริมาณเซลล์ตาย ด้วยการใช้วิธี MTT ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อที่ 3.11.3.2 หน้า 51-52

3.13.2.2 การสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็ง

เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์มะเร็ง B16F10 melanoma สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM model ได้จริง จึงทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM เมื่อไม่มี และมีเซลล์มะเร็ง B16F10 โดยใช้ 100 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) เป็น positive control รายละเอียดของการทดสอบมีดังนี้คือ

1. บ่มไข่ไก่พันธุ์โคราช (ลูกผสมระหว่างแม่พันธุ์มทส. และ พ่อพันธุ์เหลืองหางขาว; จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี; มทส.) ที่ได้รับการผสม (fertilized eggs) ที่ตู้บ่มไข่ที่มีอุณหภูมิ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70% เป็นระยะเวลา 5 วัน

2. เมื่อตัวอ่อน (embryo) ในไข่มีอายุครบ 5 วัน ใช้ forcep ปลายแหลมทำการเจาะเปลือกไข่โดยเปิดเป็นหน้าต่างขนาดประมาณ 2 ตารางซม. เพื่อให้เห็นชั้นของ CAM

3. ใช้ forcep คีบ แผ่น disk ปลอดเชื้อที่ทำจากกระดาษกรอง (Whatman filter paper No. 1) เจาะเป็นรูปทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. วางบน CAM

4. ในกลุ่มทดสอบ inoculate pellet ของเซลล์มะเร็ง B16F10 ปริมาณ $1x10^{6}$, $3x10^{6}$ และ $6x10^{6}$ เซลล์ลงบน CAM ปิดตำแหน่งที่มี pellet ของเซลล์มะเร็งอยู่ด้วยแผ่น disk สำหรับกลุ่มที่เป็น positive control ใช้แผ่น disk จุ่มลงใน bFGH (100 ng/ml) ให้ชุ่ม ก่อนวางแผ่น disk ลงที่ CAM ส่วนกลุ่มที่เป็น VH control ใช้ 10 µl ของ ตัวทำละลาย (DMSO) ใส่ลงไปในแผ่น disk ที่วางบน CAM ทุกตัวอย่างในแต่ละกลุ่มใส่ยาปฏิชีวนะด้วยการ pipette 30 µl 100 U/ml penicillin ลงบนแผ่น disk

5. นับจำนวนและการแตกแขนงของเส้นเลือดที่สัมผัสกับแผ่น disk ภายใต้กล้อง stereomicroscope และสามารถถ่ายรูปบริเวณที่มีแผ่น disk ของทุกตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม ภายใต้กล้อง stereomicroscope เพื่อใช้นับเส้นเลือดภายหลังได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. การนับเส้นเลือดกระทำโดยแบ่งแผ่น disk ออกเป็น 4 ส่วน แบ่งนับทีละส่วนเพื่อป้องกันความสับสน โดยนับเส้นเลือดหลัก (major blood vessels) และเส้นเลือดรอง (minor blood vessels) ที่สัมผัสโดยตรงกับแผ่น disk อนึ่ง ใช้แผ่น disk เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ (marker) เพื่อให้นับในตำแหน่งเดิมทุกครั้ง (รูปที่ 3.3) แสดงตัวอย่างการนับเส้นเลือดรอบแผ่น disk

7. ปิดหน้าต่างเปลือกไข่ที่ถูกเจาะด้วยเทปใส นำไข่กลับเข้าสู่ตู้บ่ม บ่มเพิ่มอีก 24 และ 48 ช.ม.

8. เมื่อครบกำหนดเวลา เปิดเทปใส ถ่ายรูปบริเวณที่มี paper disk อยู่ (ในกลุ่มทดสอบตำแหน่งที่มี paper disk อยู่คือตำแหน่งที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง) นับจำนวน และการแตกแขนงของเส้นเลือดใหม่ที่สัมผัสกับแผ่น disk ภายใต้กล้อง steromicroscope ปรับกำลังขยายให้เหมาะสมต่อการนับ บันทึกรูปภาพ และนับจำนวนหลอดเลือดจากรูปที่บันทึกไว้ได้

9. การเปลี่ยนแปลงของเส้นเลือดใหม่ที่มาหล่อเลี้ยง (neovascularization) รอบแผ่น disk ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชม. คำนวณได้ตามสูตรดังนี้คือ

$$\% \text{ Neovascularization ในระยะเวลา 24 ชม.} = \frac{\left[\left(V_{24}-V_0\right)\right]\times 100}{A_{24}}$$

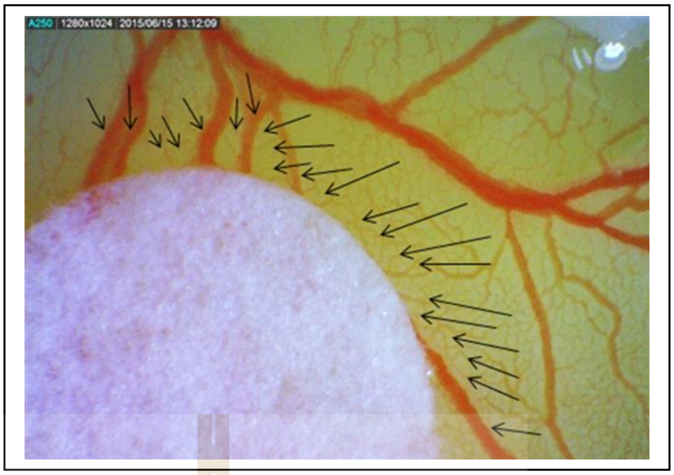
$$\% \text{ Neovascularization ในระยะเวลา 48 ชม.} = \frac{\left[\left(V_{48}-V_0\right)\right]\times 100}{A_{48}}$$

เมื่อ V_o = จำนวนเส้นเลือด (vessel number) รอบ disk ที่ 0 ชม. เมื่อเริ่มต้น inoculate B16F10 หรือใส่

V_{24} = จำนวนเส้นเลือดรอบ disk ที่ 24 ชม. ภายหลัง B16F10 inoculation

V_{48} = จำนวนเส้นเลือดรอบ disk ที่ 48 ชม.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.3 แสดงการนับเส้นเลือดที่บริเวณหนึ่งของแผ่น disk ที่วางบน CAM ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือเส้นเลือดที่ถูกนับบน CAM (กำลังขยาย 6.7X)

3.13.2.3 การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อ CAM

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อ CAM กระทำโดยทดสอบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในงานทดลองส่งผลอย่างไรต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติใน CAM (ในสภาวะเมื่อไม่มีเซลล์มะเร็ง B16F10) รายละเอียดของการทดสอบมีดังนี้คือ

1. บ่มไข่ไก่ที่ได้รับการผสมแล้วในตู้บ่มไข่เป็นระยะเวลา 5 วัน
2. เจาะเปลือกไข่โดยเปิดเป็นหน้าต่างขนาดประมาณ 2 ตารางซม. เพื่อให้เห็นชั้นของ CAM
3. จุ่มแผ่น disk ในสารละลายที่มี และ ไม่มีสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ วางแผ่น disk ลงบน CAM ตามด้วยการ pipette 30 μl 100 U/ml penicillin
4. ปิดหน้าต่างที่เจาะด้วยเทปใส นำไข่เข้าตู้บ่มต่ออีก 24 และ 48 ชม.
5. เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการประเมินจำนวนเส้นเลือดใหม่รอบแผ่น disk ตามเทคนิคที่ระบุในข้อที่ 8 หัวข้อ 3.13.2.2

3.13.2.4 การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งโดยสารสกัด

เนื่องจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญของการเจริญของก้อนเนื้องอกและพัฒนาการของโรคมะเร็งส่วนใหญ่ งานวิจัยนี้เลือกการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง B16F10 โดยใช้ *in vivo* CAM model ดังมีรายละเอียดการทดลองดังนี้

1. บ่มไข่ไก่ที่ได้รับการผสมในตู้บ่มไข่เป็นระยะเวลา 5 วัน
2. เมื่อครบ 5 วัน ทำการเจาะเปลือกไข่ เปิดเป็นรูหน้าต่างขนาด 2 ตารางซม.
3. pipette pellet ของ B16F10 $3x10^6$ เซลล์ ลงบน CAM วางแผ่น disk ที่ชุบด้วยสารละลายที่มี และ ไม่มีสารสกัดฮว่านง็อก 95EE-FLP และ WE-FLP วางบน CAM ตรงตำแหน่งที่มี pellet ของเซลล์มะเร็ง
4. Pipette ยาปฏิชีวนะ 30 μl 100 U/ml penicillin ใส่ใน CAM ทันทีก่อนปิดหน้าต่างที่เจาะด้วยเทปใส
5. นำไข่เข้าบ่มที่ตู้บ่มเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชม
6. เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม นำไข่ออกมาถ่ายรูปภายใต้กล้อง stereomicroscope และนับจำนวนเส้นเลือดรอบแผ่น disk

3.14 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดย Ames test

เพื่อศึกษาโอกาสการเกิดพิษจากการบริโภคฮว่านง็อกอย่างต่อเนื่อง โครงการวิจัยนี้จึงประเมินพิษเรื้อรังเบื้องต้นด้วยการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดโดยใช้ Ames test ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้คัดกรองได้ทั้งสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งใน *in vitro* หลักการของ Ames test คือเลือกใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน histidine ได้เอง จึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มี histidine ถ้าสารทดสอบเป็นสารก่อกลายพันธุ์ จะทำให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (reverse mutation) ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มี histidine (Ames et al., 1975; Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000) เนื่องจากสารก่อกลายพันธุ์บางชนิดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรง จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในตับเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาร (metabolize) ให้กลายเป็นสารก่อกลายพันธุ์ ดังนั้น ใน Ames test จึงมีการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีที่ใช้ สารทดสอบบ่มร่วมกับ S9 mix ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่

เตรียมจากตับหนู rat และมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการ metabolize สาร ทั้งนี้ เพื่อจำลอง metabolism ในร่างกายที่เปลี่ยนสารที่ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ให้มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

3.14.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

งานวิจัยนี้เลือกใช้แบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 ซึ่งช่วยในการตรวจวัด (detect) สารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation และ TA100 ซึ่งตรวจวัดสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution mutation (Mortlemans and Zeiger, 2000; Maron and Ames, 1983)

3.14.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Salmonella typhimurium* ในอาหารเลี้ยง Oxiod nutrient broth No. 2 เขย่าที่ 37 °C ความเร็วรอบ 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชม. วัดความขุ่นของอาหารเพื่อหาปริมาณของแบคทีเรีย โดยเจือจาง ด้วย 0.9% NaCl ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3-0.4 ที่ความยาวคลื่น 620 nm

3.14.3 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

โครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีการบ่มสารสกัดล่วงหน้ากับแบคทีเรีย (pre-incubation method) เพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ของการทดสอบ และทดสอบทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี S9 mix เพื่อให้สามารถตรวจสอบได้ทั้งกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้โดยตรง และกลุ่มสารที่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการ metabolism ของตับก่อนจึงเกิดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่อาจมีอยู่ในสารสกัดใบฮว่านง็อกที่ได้จาก 95EE-FLP และ WE-FLP ดังมีรายละเอียดของการทดสอบดังนี้

1. ผสมสารสกัดใบฮว่านง็อกที่ได้จาก 95EE-FLP และ WE-FLP ปริมาตร 100 µl กับ S9 mix (สภาวะที่มี S9 mix) หรือ phosphate buffer (สภาวะที่ไม่มี S9 mix) ปริมาตร 500 µl

2. เติม 100 µl แบคทีเรีย (TA98 หรือ TA100) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm อยู่ระหว่าง 0.3-0.4 (ภายหลังจากการ inoculate overnight) ผสมแบคทีเรียและสารสกัดให้เข้ากันด้วยการ vortex

3. นำแบคทีเรียไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shacking water bath) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที

4. เติม top agar ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงใน minimal glucose agar plate ด้วยเทคนิค poured plate

5. รอจนกระทั่ง top agar แข็งตัว จึงนำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

6. เมื่อครบระยะเวลาบ่ม นับจำนวนโคโลนีกลายพันธุ์ย้อนกลับ (revertant colonies) ที่ปรากฏในแต่ละ plate

7. การแปลผลการทดลอง สามารถทำได้โดยการหาอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยโคโลนีกลายพันธุ์ย้อนกลับของตัวอย่างที่เป็นสารสกัดต่อค่าเฉลี่ยโคโลนีกลายพันธุ์ย้อนกลับโดยธรรมชาติ (spontaneous revertant colonies) หากอัตราส่วนดังกล่าวมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 2 แสดงว่า สารมีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ (Hakura et al., 2005)

8. การทดสอบกลุ่มทดลองบวก (positive control) ในสภาวะแบบไม่มี S9 mix ใช้สารก่อกลายพันธุ์ 2-nitrofluorene (2-NF) และ sodium azide สำหรับสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ตามลำดับ ส่วนในสภาวะแบบมี S9 mix ใช้สารก่อกลายพันธุ์ 2-amino anthracene (2-AA) สำหรับทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100

3.15 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติกระทำในโปรแกรม SPSS software (Statistics Package for the Social Sciences, version 11) ชนิดของข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบเดียวกัน (homogenous data) ประเมินด้วย One-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วย post-hoc Turkey’s analysis ข้อมูลที่มีการกระจายต่างกัน (non-parametric analysis of variance) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยการใช้ Wilcoxon rank test ความแตกต่างระหว่างกลุ่มถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อมีค่า $p < 0.05$ สำหรับการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ใช้กฎเกณฑ์ของอัตราส่วนของค่าเฉลี่ย revertant colonies ต่อ spontaneous revertant colonies ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 2 ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Hakura et al., 2005)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดจากใบฮว่านง็อก

ปริมาณสุทธิ (yield) และ ร้อยละปริมาณสุทธิ (percent yield) ของสารสกัดหยาบจากใบสดและใบแห้งของฮว่านง็อกที่สกัดด้วย 95% ethanol และ 80% ethanol รวมทั้งสารสกัดที่ละลายน้ำที่เตรียมจากผงแห้งของสารที่ได้จากการสกัดด้วย 95% ethanol ตามด้วยทำการแยกส่วนเฉพาะที่ละลายน้ำ แสดงในตารางที่ 4.1 ผลการสกัดพบว่า เปอร์เซ็นต์ปริมาณสุทธิ หรือ percent yield ของสารสกัดมีค่าแตกต่างในช่วงกว้างมาก ตั้งแต่ประมาณ 3% ถึง 85% โดย percent yield ที่สกัดจากใบสดด้วยวิธีการปั่นมีค่าต่ำสุด ไม่ถึง 5% ส่วนที่สกัดจากใบแห้งโดยใช้การหมักมีค่าสูงสุดที่ประมาณ 16% และ percent yield ที่มีค่าสูงคือมากกว่า 80 % พบในสารสกัดที่ละลายน้ำซึ่งเตรียมจากผงแห้งของสารที่สกัดด้วย 95% ethanol แล้วนำมาสกัดต่ออีกทอดหนึ่งโดยแยกเอาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำได้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสุทธิและเปอร์เซ็นต์ปริมาณสุทธิของสารสกัดที่เตรียมจากใบฮว่านง็อกด้วยวิธีต่างกัน

สารสกัด	ปริมาณเริ่มต้น	Yield (g)	% Yield
95EE-FLP	1500 กรัมของใบสด	60.41	4.03
80EE-FLP	2100 กรัมของใบสด	66.65	3.17
95EE-DLP	420 กรัมของใบแห้ง	21.75	5.18
80EE-DLP	300 กรัมของใบแห้ง	46.99	15.66
WE-FLP	40 กรัมของ 95EE-FLP	32.71	81.77
WE-DLP	20 กรัมของ 95EE-DLP	16.96	84.80

95EE-FLP= 95% ethanol extract of fresh leaves of PP
80EE-FLP= 80% ethanol extract of fresh leaves of PP
95EE-DLP= 95% ethanol extract of dried leaves of PP
80EE-DLP= 80% ethanol extract of dried leaves of PP
WE-FLP= Water extract of fresh leaves of PP
WE-DLP= Water extract of dried leaves of PP

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 สารพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก

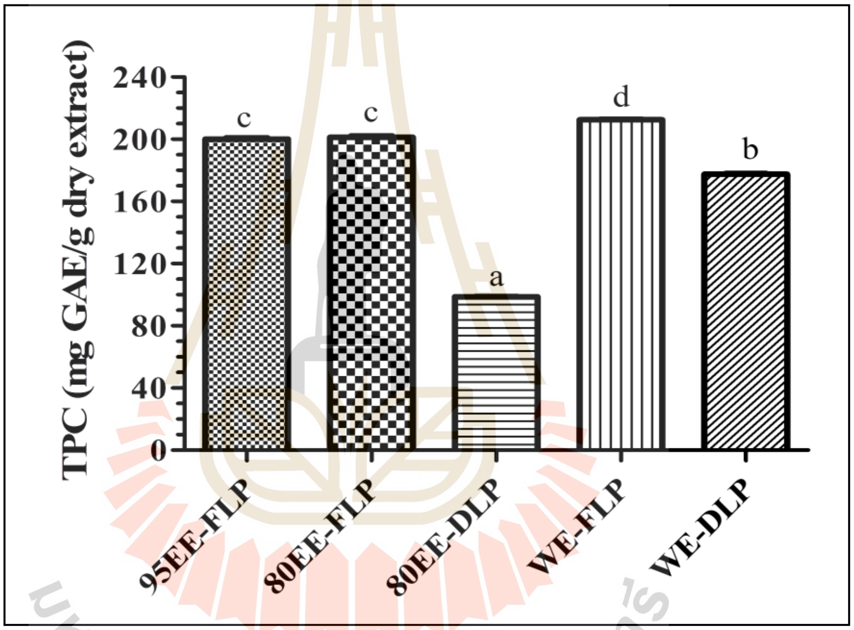
4.2.1 ปริมาณรวมของ phenolic (total phenolic content)

งานวิจัยนี้หาค่า total phenolic content (TPC) ของสารสกัดฮว่านง็อกโดยเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารมาตรฐาน gallic acid และรายงานค่า TPC เป็น mg gallic acid equivalent (GAE) ต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ผลการวิเคราะห์หา total phenolic content ของสารสกัดฮว่านง็อกแสดงในรูปที่ 4.1 ชี้ชัดว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบสดมีค่า TPC สูงกว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง และ ไม่ว่าจะใช้ 95% ethanol หรือใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร ไม่ส่งผลต่อปริมาณของ phenolic content ในสารสกัดที่ได้แต่อย่างใด ดังค่า TPC ของสารสกัดที่เตรียมจากใบสด 95EE-FLP มีค่าเท่ากับ 200.14 ± 0.77 mg GAE/g น้ำหนักแห้งของสารสกัด และ 80EE-FLP มีค่าเท่ากับ 201.32 ± 0.72 mg GAE/g น้ำหนักแห้งของสารสกัดตามลำดับ ซึ่งไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และสารสกัดทั้ง 2 ซึ่งเตรียมจากใบสดมีค่าสูงกว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง คือ 80EE-DLP ซึ่งมีค่า TPC เท่ากับ 98.63 ± 0.26 mg GAE/g น้ำหนักแห้งของสารสกัด และสูงกว่าสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำที่เตรียมจากใบแห้ง คือ WE-DLP ซึ่งมีค่าเท่ากับ 177.56 ± 0.43 mg GAE/g น้ำหนักแห้งของสารสกัด ($p < 0.001$) ในบรรดาสารสกัดทั้งหมดที่เตรียม สารสกัดที่มีค่า TPC สูงสุดคือสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งเตรียมจากใบสดที่สกัดด้วย 95% ethanol คือสารสกัด WE-FLP ซึ่งมีค่า TPC เท่ากับ 212.47 ± 0.52 mg GAE/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่า TPC สูงกว่า 95EE-FLP และ 80EE-FLP เพียงเล็กน้อยคือ 5.8 % และ 5.2 % ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่มีค่า TPC ต่ำสุดคือสารสกัดจากใบแห้งที่หมักด้วย 80% ethanol

4.2.2 ปริมาณรวมของ flavonoids

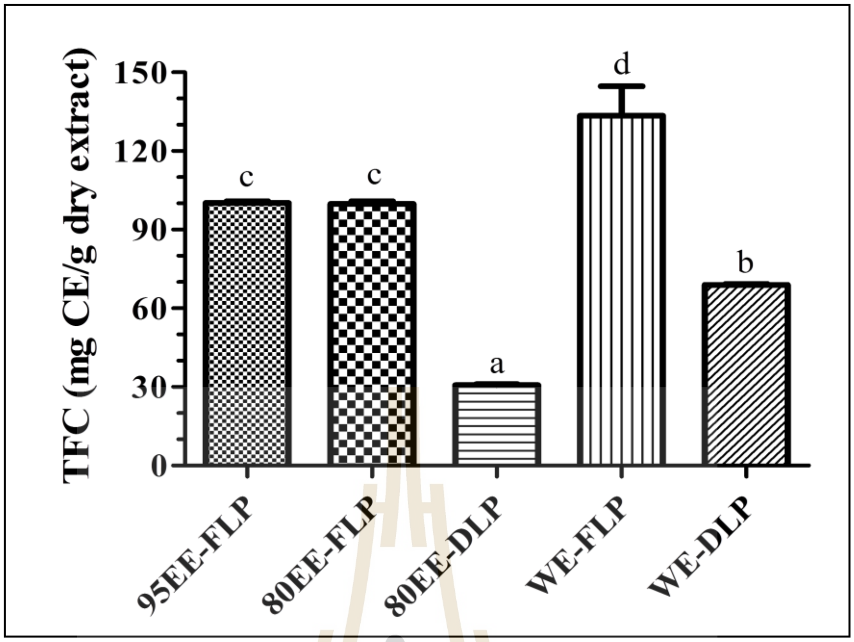
ค่า total flavonoid content (TFC) หาได้โดยเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน catechin และรายงานเป็นค่าของ mg equivalent ของ catechin ต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ค่า TFC ของสารสกัดที่สกัดด้วยเงื่อนไขต่างกันของใบฮว่านง็อกแสดงในรูปที่ 4.2 ค่า TFC ที่หาได้มีความสอดคล้องกับค่าของ TPC คือสารสกัดที่ได้จากใบสดมีค่า TFC มากกว่าสารสกัดที่ได้จากใบแห้ง และการสกัดใบสดด้วย 95% ethanol และ 80% ethanol ให้ค่า TFC ที่ไม่ต่างกัน สารสกัดส่วนที่ละลายน้ำได้ที่แยกส่วนจากใบสดที่สกัดด้วย 95% ethanol คือ WE-FLP ยังคงมีค่า TFC สูงสุด (133.43 ± 11.27 mg CE/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) รองลงมาคือสารสกัดจากใบสดที่สกัดด้วย 95% ethanol (100.19 ± 0.68 mg CE/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) ซึ่งมีค่า TFC ไม่ต่างจากใบสดที่สกัดด้วย 80% ethanol (99.80 ±1.02 mg CE/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) ($p < 0.05$) สารสกัดที่ได้จากใบสดทุกสารสกัดมีค่า

TFC สูงกว่าสารสกัดทีได้จากใบแห้งอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ โดยค่า TFC ของสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากใบแห้ง WE-DLP (68.95 0.42 mg CE/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) และสารสกัดจากใบแห้งที่หมักด้วย 80% ethanol 80EE-DLP (30.73 0.30 mg CE/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) มีค่าน้อยกว่าค่า TFC สูงสุดของ WE-FLP ถึง 48.32 % และ 76.97 % ตามลำดับ ดังนั้น การเตรียมสารจากใบแห้งและหมักด้วย 80% ethanol มีปริมาณของ flavonoid ต่ำสุด ซึ่งสอดคล้องกับค่าของ total phenolic ในสารสกัด



รูปที่ 4.1 แสดงค่า total phenolic content ของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่มีเงื่อนไขการสกัดที่แตกต่างกัน ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM (n = 3) และเป็นตัวแทนจากผลการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลองที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.2 แสดงค่า total flavonoid content ของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่มีเงื่อนไขการสกัดที่แตกต่างกัน ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM (n = 3) และเป็นตัวแทนจากผลการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลองที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

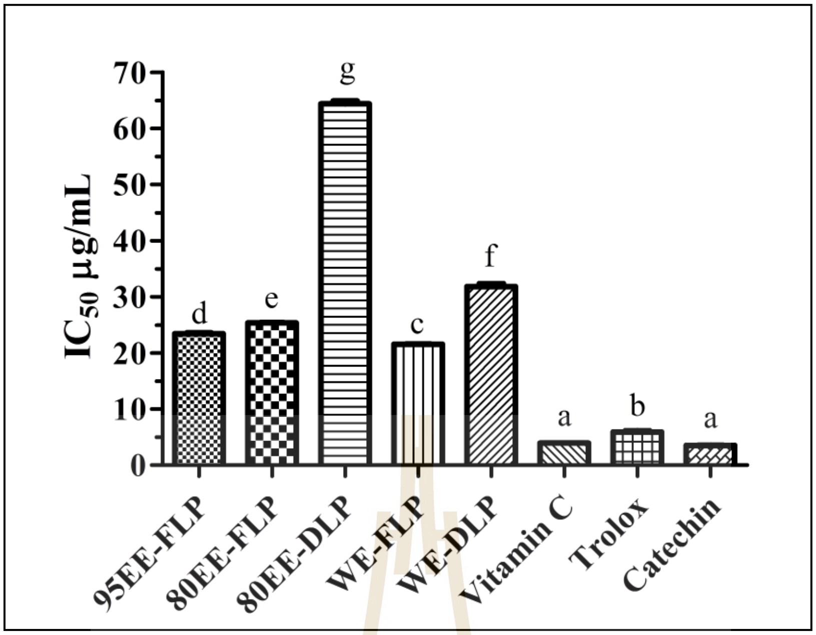
4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก

4.3.1 การทดสอบ scavenge activity ต่อ DPPH radical

DPPH assay ใช้เพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารในการกำจัด (scavenge) อนุมูลอิสระ DPPH ที่เสถียร (DPPH•) และรายงานผลการทดลองเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้ง DPPH• ได้ 50% (median inhibitory concentration; IC_{50}) สารที่มีค่า IC_{50} ต่ำ หมายถึงสารมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูง เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของสารในปริมาณน้อยก็สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% รูปที่ 4.3 แสดงผลการทดลองหาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกด้วยวิธีการกำจัด DPPH• ผลการทดสอบชี้แนะว่าทุกสารสกัดมีความสามารถในการกำจัด ด้วยความสามารถที่แตกต่างกัน ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารพฤกษเคมีของ TPC และ TFC ของแต่ละสารสกัด คือสารสกัดที่มีปริมาณ TPC และ TFC สูงมีความสามารถในการกำจัด

DPPH• ได้สูง สารสกัดที่มีค่า IC_{50} น้อยที่สุด (21.55 ± 0.06 μg/ml) หรือ มีฤทธิ์สูงที่สุดในการกำจัด DPPH• ($p < 0.01$) คือ WE-FLP ซึ่งเป็นสารสกัดที่ละลายน้ำได้ซึ่งเตรียมจากใบสดและมีปริมาณของ TPC และ TFC สูงกว่าสารสกัดอื่น ๆ (รูปที่ 4.1-4.2) ส่วนสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้งและมีปริมาณ TPC และ TFC ต่ำสุดคือ 80EE-DLP ที่มีค่า IC_{50} สูงสุด (64.38 ± 0.52 μg/ml) ซึ่งหมายถึงมีความสามารถต่ำสุดในการกำจัด DPPH• ($p < 0.01$) อันดับรองลงไป คือสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากใบแห้ง หรือ WE-DLP ที่มีค่า IC_{50} สูงเป็นอันดับสอง (31.08 ± 0.52 μg/ml) ส่วนสารสกัดจากใบสดที่สกัดด้วย 95% ethanol และ 80% ethanol ที่มีปริมาณ TPC และ TFC ไม่ต่างกันมีค่า IC_{50} ที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน คือ 23.45 ± 0.12 μg/ml และ 25.35 ± 0.03 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันเพียง 7.5% ดังนั้น สารสกัดที่เตรียมจากใบสดมีความสามารถในการกำจัด DPPH• ได้ดีกว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของสารพฤกษเคมี TPC และ TFC ที่พบในสารสกัด แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการกำจัด DPPH• ของทุกสารสกัดที่เตรียมจากใบฮว่านง็อกมีค่าต่ำกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน vitamin C, trolox และ catechin ซึ่งใช้เป็น positive control (รูปที่ 4.3) ข้อสังเกตที่น่าสนใจคือสารมาตรฐานที่พบตามธรรมชาติ vitamin C และ catechin มีความสามารถทัดเทียมกันในการกำจัด DPPH• (IC_{50} = 3.94 ± 0.01 μg/ml และ 3.55± 0.01 μg/ml ตามลำดับ) และ มี activity ดีกว่าสารมาตรฐาน trolox ซึ่งเป็น vitamin E สังเคราะห์ (IC50 = 5.90 ± 0.27 μg/ml) ประมาณ 1.6 เท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

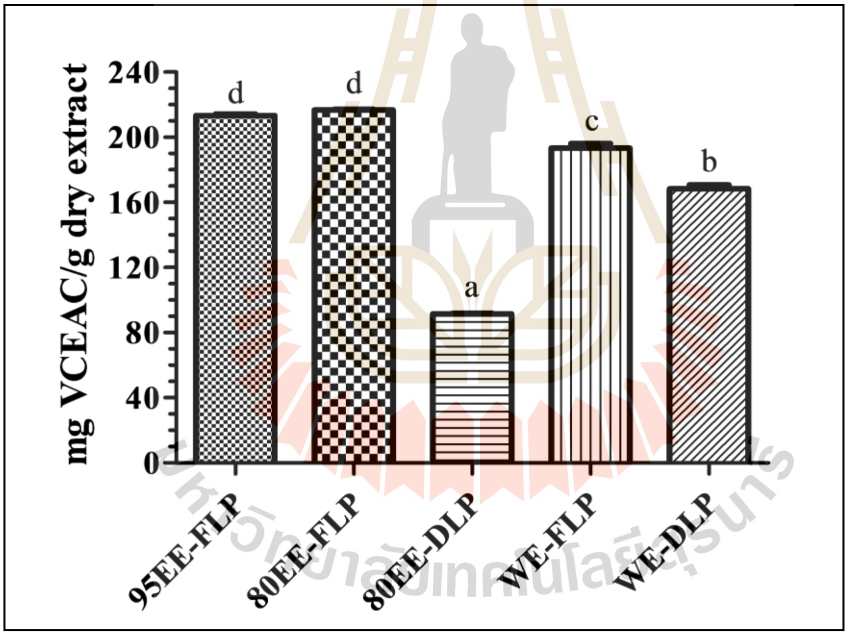


รูปที่ 4.3 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดต่าง ๆ จากใบฮว่านง็อก เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน vitamin C, trolox และ catechin ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM (n = 3) และเป็นตัวแทนจากผลการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลองที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.3.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

นอกจากการกำจัด หรือ scavenge อนุมูลอิสระ คุณสมบัติของสารในการเป็น reducing agent เป็นอีกหนึ่งกลไกที่มีความสำคัญต่อการต้านอนุมูลอิสระ เพราะสารที่มีคุณสมบัติเป็น reducing agent สามารถ reduce สาร oxidant ต่าง ๆ และล้างฤทธิ์ (inactivate) การเกิดปฏิกริยา oxidation โดยสาร oxidant ซึ่งเป็นกลไกที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย งานวิจัยนี้ประเมินความสามารถในการเป็น reducing agent ของสารสกัดต่าง ๆ จากใบฮว่านง็อกด้วย FRAP assay และรายงานผลเป็นกำลังความสามารถในการรีดิวส์ (Ferric reducing ability power values) หรือ FRAP values โดยใช้สาร vitamin C เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน ค่า FRAP values ของสารสกัดรายงานเป็นค่า mg ของ vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) ต่อ กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งชี้ชัดว่า สารสกัดจากใบสดมีคุณสมบัติในการเป็น reducing agent ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบแห้ง ดังค่าของ FRAP ที่พบสูงสุดในสารสกัดจากใบสด 95EE- FLP (212.23 ± 1.09 mg VCEAC/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) และ 80EE-FLP (216.73 ± 0.44 mg VCEAC/กรัมน้ำหนัก

แห้งของสารสกัด) ที่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และผลการทดลองนี้ ช่วยยืนยันว่า ความเข้มข้นของ ethanol ที่ใช้ไม่ว่าจะเป็น 95% หรือ 80% ethanol สามารถใช้ในการสกัดสารได้ทัดเทียมกัน เพราะได้สารสกัดที่ไม่มี reducing power ที่แตกต่างกันใน FRAP assay สารสกัดส่วนที่ละลายน้ำที่สกัดจากใบสด WE-FLP มี FRAP value เท่ากับ 193.40 ± 2.65 mg VCEAC/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำที่สกัดจากใบแห้ง WE-DLP (168.40 ± 2.63 mg VCEAC/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) 12.92 % ($p < 0.001$) ส่วนสารสกัดที่มีความสามารถในการให้ electron ต่ำสุด หรือมี FRAP value ต่ำสุดยังคงเป็นสารสกัดจากใบแห้ง 80EE-DLP (91.53 ± 0.44 mg VCEAC/กรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) ที่มี reducing power ต่ำกว่า 95EE-FLP, 80EE-FLP, WE-FLP และ WE-DLP อยู่ 57.1%, 57.76%, 52.7% และ 45.6% ตามลำดับ

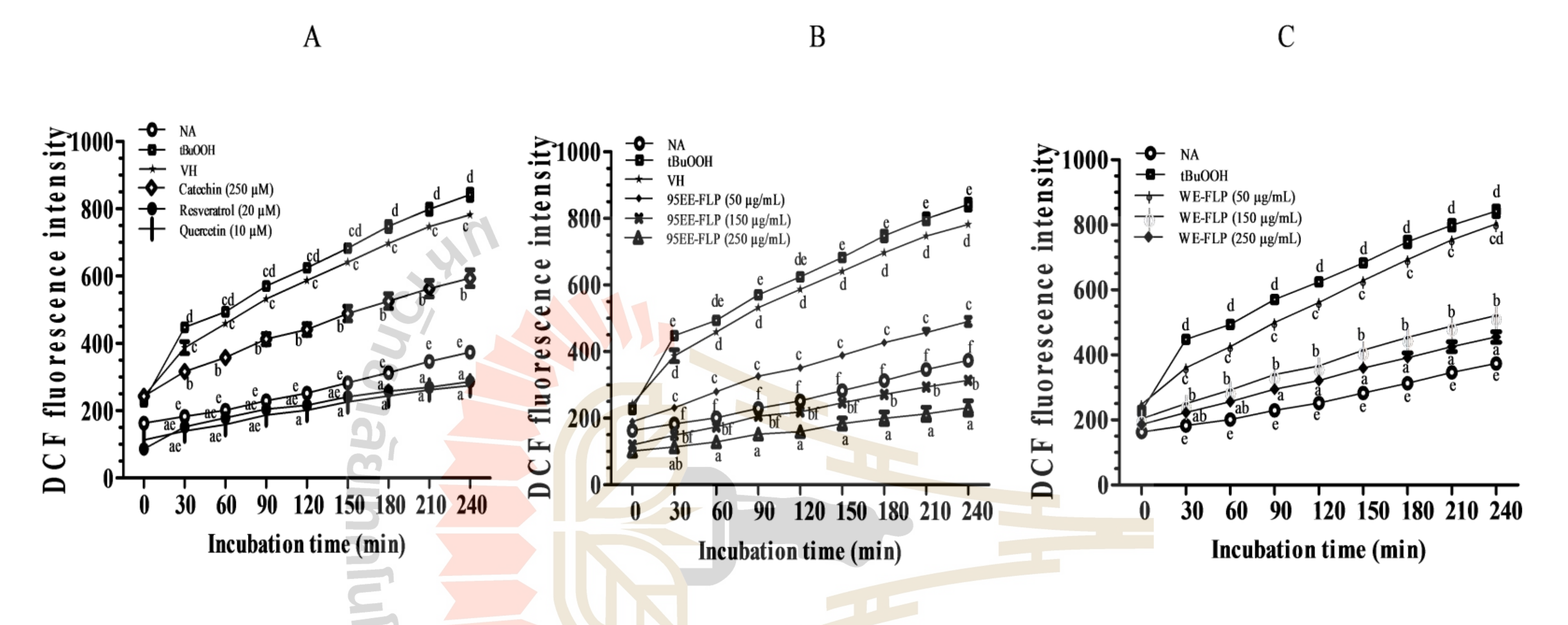


รูปที่ 4.4 การต้านออกซิเดชันของสารสกัดต่าง ๆ จากใบฮว่านง็อกเมื่อทดสอบโดย FRAP assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM ($n = 3$) และเป็นตัวแทนจากผลการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลองที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.3.3 การต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Cellular antioxidant activity)

การประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของสารสกัดฮว่านง็อกกระทำใน RAW264.7 เซลล์ โดยใช้ DCFH-DA assay ซึ่งใช้ DCFH-DA เป็น probe เพราะสามารถให้สารเรืองแสง DCF ได้ภายในเซลล์ การติดตามการเพิ่มสัญญาณ fluorescene ของ DCF (ที่เกิดจากการ oxidize DCFH โดย ROSs ที่เกิดภายในเซลล์) กระทำอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 240 นาที งานวิจัยนี้เลือกสารสกัดที่เตรียมจากใบสด 95EE-FLP และ WE-FLP มาประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์เท่านั้น เนื่องจากผลการศึกษาที่ผ่านมา (รูปที่ 4.1-4.4-) ชี้แนะว่า สารสกัดทั้งสองของฮว่านง็อกมีปริมาณสารพฤกษเคมี TPC และ TFC สูง ควบคู่กับการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใน DPPH และ FRAP assay นอกจากนั้นสารสกัดทั้งคู่ได้จากการสกัดสารจากใบสดที่สกัดเริ่มต้นด้วย 95% ethanol เหมือนกัน เพียงแต่ WE-FLP ได้จากการแยกเอาส่วนเฉพาะที่ละลายน้ำได้ออกมาเตรียมสารสกัดอีกทอดหนึ่ง (ดังรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.8.3) รูปที่ 4.5 แสดง DCF fluorescence intensity ใน RAW264 เซลล์ที่บ่มล่วงหน้ากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานต่าง ๆ ที่ใช้เป็น positive control (A) หรือบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 95EE-FLP (B) หรือสารสกัด WE-FLP (C) เป็นเวลา 24 ชม. ก่อนได้รับ DCFH-DA และตามด้วย t-BuOOH จากรูปที่ 4.5 (A-C) เมื่อ RAW264.7 เซลล์ได้รับ tBuOOH ค่า DCF fluorescence intensity เพิ่มสูงขึ้นจากค่า baseline ของสัญญาณ fluorescence จากกลุ่มที่เป็น naïve control (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใด) ในทุกช่วงเวลาที่ทำการวัด (time point) ซึ่งตรงตามทฤษฎีเพราะ tBuOOH ทำให้เกิด ROSs ภายในเซลล์ ที่สามารถ oxidize สาร DCFH เกิด DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสงให้เกิดขึ้นภายในเซลล์ การทดลองในรูปที่ 4.5 A ชี้ชัดว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็น vehicle control สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ไม่ว่าจะเป็น catechin (250 μM), resveratrol (20 μM) หรือ quercetin (10 μM) มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัด ROSs ที่เกิดภายในเซลล์ ดังทราบได้จากค่า DCF fluorescence intensity ของทุกกลุ่มที่เป็น anti-oxidant positive control มีระดับต่ำลงทุก time point อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นับตั้งแต่จุดเริ่มต้นที่ทำการวัดที่ 30 นาที จนครบ 240 นาที ทั้งนี้ 20 μM resveratrol และ 10 μM quercetin มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ROSs ภายในเซลล์ได้ดีกว่า 250 μM catechin เพราะสามารถลดระดับของ DCF fluorescence intensity ลงมาได้เทียบเท่ากับ baseline ของ naïve control โดยเฉพาะที่ระยะช่วงเวลาตั้งแต่ 180-240 นาที ทั้ง resveratrol และ quercetin สามารถลดระดับของ DCF ลงจนต่ำกว่าค่าของ baseline ใน naïve control ในขณะที่ catechin ที่ความเข้มข้น 250 μM ไม่สามารถลดระดับให้ต่ำลงเท่ากับค่าของ baseline ใน naïve control ได้แม้แต่ time point เดียว (รูปที่ 4.5 A) เมื่อเทียบกับตัวทำละลายควบคุม สารสกัดจากใบสดของฮว่านง็อก

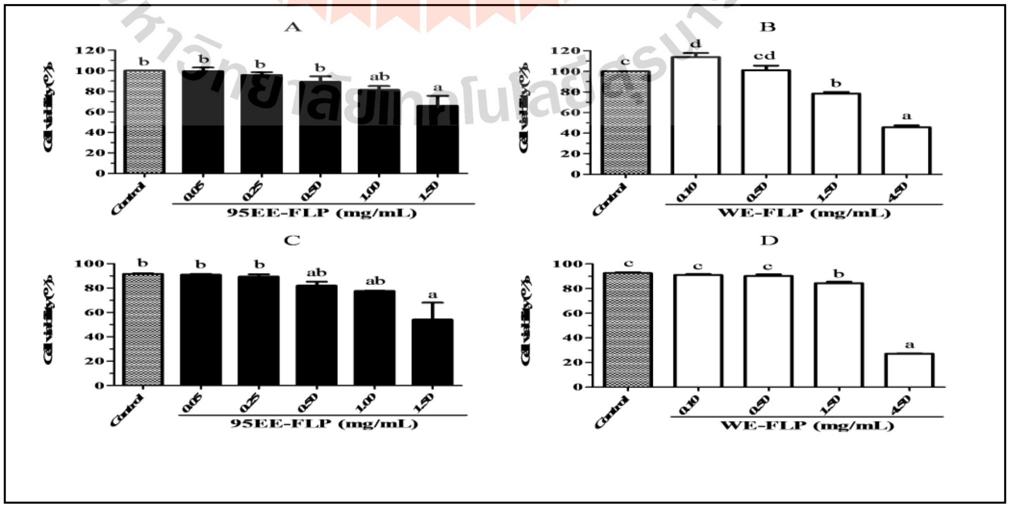
95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้นที่ใช้ (50, 150 และ 250 μg/ml) มีความสามารถในการกำจัด ROSs ภายในเซลล์ได้ (รูปที่ 4.5 B-C) นับตั้งแต่ 30 นาทีแรกที่เริ่มวัดสัญญาณ fluorescence ของ DCF จนกระทั่งถึง 240 นาที ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลานานที่สุดของการเก็บข้อมูล ผลการทดลองชี้ชัดว่าการลดลงของสารเรืองแสง DCF เป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัด และขึ้นกับช่วงเวลาหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย tBuOOH แม้สารสกัด 95EE-FLP ที่ 50 μg/ml สามารถลดระดับ DCF ได้ทุก time point เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำละลายควบคุม แต่ระดับของ DCF ที่ลดลง ยังคงสูงกว่าค่าใน baseline ของ naïve control ($p < 0.05$) แต่ในความเข้มข้นที่สูงขึ้นที่ 150 μg/ml สารสกัด 95 EE-FLP สามารถลดระดับ DCF จนมีค่าเทียบเท่าค่าใน naïve control ได้ตั้งแต่ 30 นาที ถึง 150 นาที หลังจากนั้น 95EE-FLP ที่ความเข้มข้นนี้ก็สามารถลดระดับของ DCF จนกระทั่งมีค่าต่ำกว่าใน navie control ที่ช่วงเวลา 180-240 นาที ส่วนที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ 250 μg/ml สารสกัด 95 EE-FLP สามารถลดระดับของ DCF ให้ต่ำกว่าค่าของ DCF ใน naïve control ได้ทุก time point ตั้งแต่ 30 นาทีแรกจนถึง 240 นาทีซึ่งเป็นระยะสิ้นสุดของการทดลองในการทดสอบ (รูปที่ 4.5 B) ในทำนองเดียวกัน สารสกัดฮว่านง็อกที่ละลายน้ำได้ WE-FLP ที่ 150 และ 250 μg/ml สามารถลดระดับ DCF อย่างมีนัยสำคัญได้ทุก time point เมื่อเทียบกับกลุ่ม tBuOOH ($p< 0.05$) อนึ่งในกรณีนี้ กลุ่ม tBuOOH จัดเป็นกลุ่มเดียวกับสารละลายควบคุมได้ เพราะใช้ media เป็นตัวทำละลายสารสกัด WE-FLP ข้อควรสังเกตคือที่ความเข้มข้นต่ำ 50 μg/ml WE-FLP สามารถลด DCF fluorescent emmison ได้อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 30 นาที ถึง 210 นาทีเท่านั้น หลังจากนั้น ที่ 240 นาที ค่าของ DCF ไม่แตกต่างจากกลุ่ม tBuOOH ที่เป็นกลุ่มควบคุม

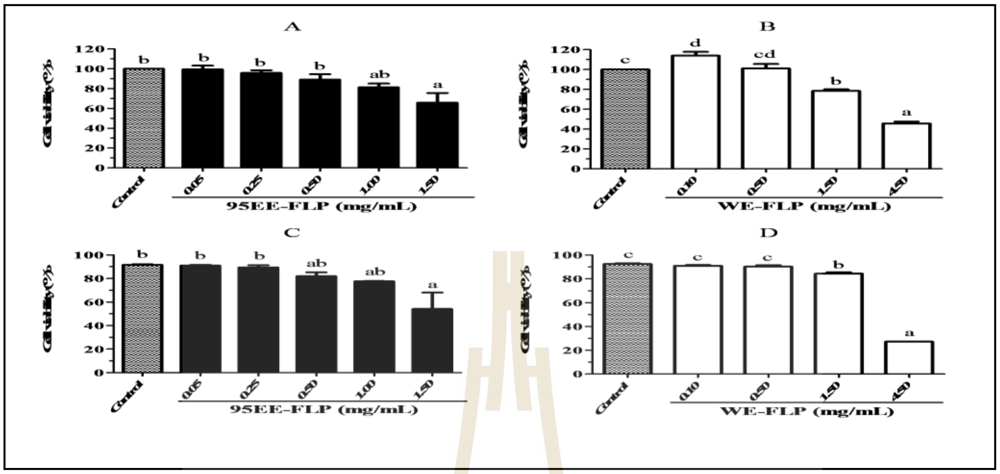


รูปที่ 4.5 แสดงการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ RAW 264.7 ของสารสกัดจากใบสดฮว่านง็อก ใน DCFH-DA assay ที่ช่วงระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 240 นาทีนับตั้งแต่การเติม tBuOOH ใน culture เซลล์ RAW264.7 บ่มล่วงหน้ากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (A) หรือบ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP (B) หรือ WE-FLP (C) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชม. ก่อนที่จะบ่มร่วมกับ 20 µM DCFH-DA probe เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการกระตุ้นด้วย 500 µM t-BuOOH ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM (n =4) ของตัวแทนการทดลองอิสระที่ให้ผลในทิศทางเดียวกันอย่างน้อย 3 ครั้ง จุดข้อมูลในกราฟของ time point เดียวกันที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดย two-way ANOVA

4.4 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

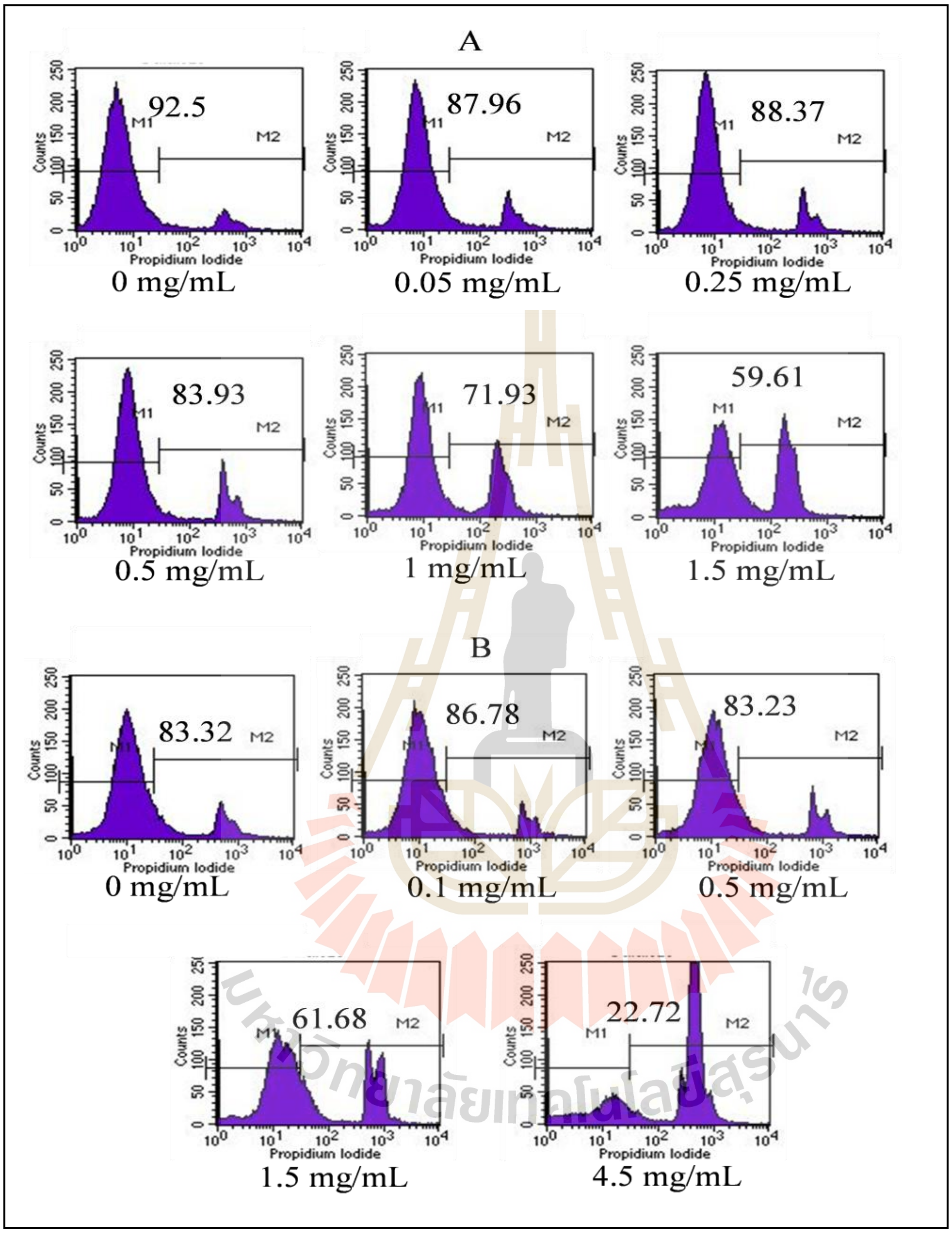
ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดฮว่านง็อกที่ทำการทดลองกับ RAW264.7 เซลล์ จำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัด เพื่อให้แน่ใจว่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ในงานทดลองไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยตรง งานวิจัยนี้ประเมินความเป็นพิษของสารสกัด 95 EE-FLP และ WE-FLP ต่อ RAW264.7 เซลล์ โดยใช้ 3 วิธีคือ MTT assay, trypan blue exclusion method และการย้อมสีด้วย propidium iodide ผลการทดลองพบว่า ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ RAW264.7 ไม่ว่าจะประเมินด้วยวิธี MTT ใน colorimetric method (รูปที่ 4.6 A-B) หรือ ใช้การนับเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วย trypan blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 4.6 , C-D) ให้ผลที่สอดคล้องกัน คือสารสกัดทั้งสองไม่แสดงความเป็นพิษต่อ RAW264.7 เซลล์เมื่อมีความเข้มข้นน้อยกว่าหรือ เท่ากับ 1 mg/ml ต่อเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.5 mg/ml สารสกัดทั้งสองจึงแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อประเมินด้วย MTT assay สารสกัด 95 EE-FLP และ WE-FLP ที่ 1.5 mg/ml ลดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) หรือทำให้เกิดการตายของเซลล์ 34.14 ± 9.69% และ 21.58 ± 1.66% ตามลำดับ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.6 A-B) และ WE-FLP ที่ความเข้มข้นสูง 4.5 mg/ml ทำให้เกิดการตายของเซลล์ 54.21 ± 1.74% เมื่อประเมินโดย trypan blue ความเข้มข้นที่ 1.5 mg/ml ของ 95 EE-FLP ทำให้เกิดการตายของเซลล์ 37.56 ± 14.37 % (รูปที่ 4.6 C) ในขณะที่ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 1.5 mg/ml และ 4.5 mg/ml ทำให้เซลล์เกิดการตาย 8.16 ± 1.79% และ 65.32 ± 0.38% ตามลำดับ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.6 D)





รูปที่ 4.6 ผลของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 เมื่อประเมินโดย MTT assay (A และ B) หรือ trypan blue exclusion method (C และ D) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SEM (n =4) ของตัวแทนการทดลองอิสระที่ให้ผลในทิศทางเดียวกันอย่างน้อย 3 ครั้ง จุดข้อมูลในกราฟของ time point เดียวกัน แท่งกราฟที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$

ส่วนผลของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการย้อมสีด้วย PI และติดตามโดยใช้ flow cytometry ในรูปที่ 4.7 ชี้แนะว่า สารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 0.05-0.25 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นที่ 0.5, 1 และ 1.5 mg/ml สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ 8.57%, 20.57% และ 32.89% ตามลำดับ (รูปที่ 4.7 A) ส่วนสารสกัด WE-FLP ที่ 0.1-0.5 mg/ml ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น 1.5 mg/ml และ 4.5 mg/ml สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ 21.64% และ 60.6% ตามลำดับ (รูปที่ 4.7 B) ดังนั้น เพื่อไม่ให้สารสกัดก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงเลือกความเข้มข้นที่ 0.25 mg/ml เป็นความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP เพื่อใช้ในการทดลองที่ต้องบ่มร่วมกับ RAW เซลล์



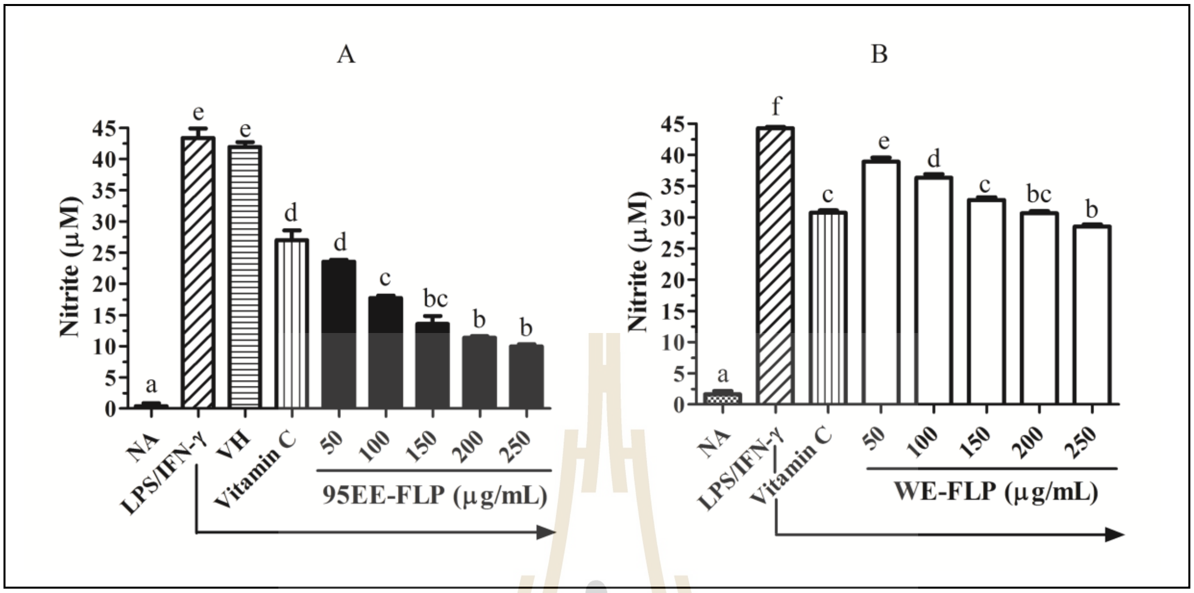
รูปที่ 4.7 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อความเป็นพิษของเซลล์ RAW 264.7 เมื่อประเมินโดยการย้อมด้วย PI ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระอย่างน้อย 2 ครั้ง

4.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดฮว่านง็อก

4.5.1 การยับยั้งการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ RAW264.7

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยดูการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของสารสกัดจากใบสดของฮว่านง็อก 95EE-FLP และ WE-FLP กระทำในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ เซลล์ RAW264.7 ถูกบ่มล่วงหน้า (pretreat) เป็นระยะเวลา 1 ชม. กับสารสกัด 95EE-FLP หรือ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 50-250 μg/mL ซึ่งเป็นช่วงของความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ RAW264.7 (รูปที่ 4.6-4.7) หรือบ่มร่วมกับ 500 μM vitamin C ซึ่งใช้เป็น antioxidant positive control ก่อนการกระตุ้นให้ RAW264.7 เซลล์สังเคราะห์ NO โดยการเติม LPS (1 μg/ml) ร่วมกับ IFN-γ (25 U/ml) ภายหลังการบ่มเซลล์ต่อเนื่องอีก 24 ชม. ระดับของ NO ถูกประเมินทางอ้อมโดยการวัด nitrite ซึ่งเป็น metabolite product ที่เสถียรของ NO โดยใช้ Griess reagent ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.8 RAW264.7 เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น มีการสร้าง NO ในระดับพื้นฐาน (basal level) ซึ่งมีปริมาณต่ำ เทียบเป็นค่า nitrite เพียงประมาณ 1.5 μM เมื่อกระตุ้นด้วย 1 μg/ml LPS และ 25 U/ml IFN-γ ปริมาณ nitrite เพิ่มขึ้นเป็น 43 μM ส่วน 500 μM vitamin C ที่เป็น antioxidant positive control สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้เพียง 35% ($p < 0.05$) สารสกัดใบสดจากฮว่านง็อก ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้น ดังค่าของปริมาณ nitrite ของ RAW265.7 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่มี และไม่มีตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.8 A-B) โดยปริมาณการยับยั้งแปรผันตามระดับของความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ผลการทดสอบในรูปที่ 4.8 A-B ยังชี้ชัดว่า สารสกัด 95EE-FLP ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัด WE-FLP ในการยับยั้งการสร้าง NO ใน RAW264.7 เซลล์ เช่น สารสกัด 95EE-FLP ที่ 50 μg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดลองก็มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ 500 μM vitamin C ในการยับยั้งการสร้าง NO ในขณะที่สารสกัด WE-FLP จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 150-200 μg/ml จึงสามารถออกฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน และที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัด 95EE-FLP 250 μg/ml สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ถึง 74.4 % ในขณะที่ความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัด WE-FLP สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ เพียง 31.8 % เป็นต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

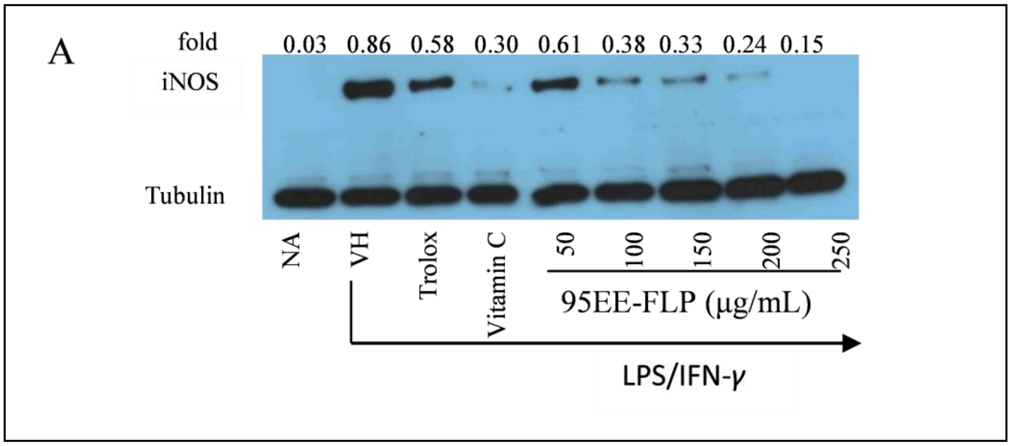


รูปที่ 4.8 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ สารสกัด WE-FLP (B) ต่อการสร้าง NO ใน RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 µg/ml) ร่วมกับ IFN-γ (25 U/ml) เป็นระยะเวลา 24 ชม หลังจากที่ได้รับการบ่มเซลล์ล่วงหน้ากับ antioxidant positive control 500 M vitamin C สารสกัด 95EE-FLP หรือ สารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 ชม. วัดปริมาณ NO ทางอ้อมโดยวัดปริมาณของ nitrite ด้วย Griess reagent ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n =3) และเป็นตัวแทนของ การทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p <0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA

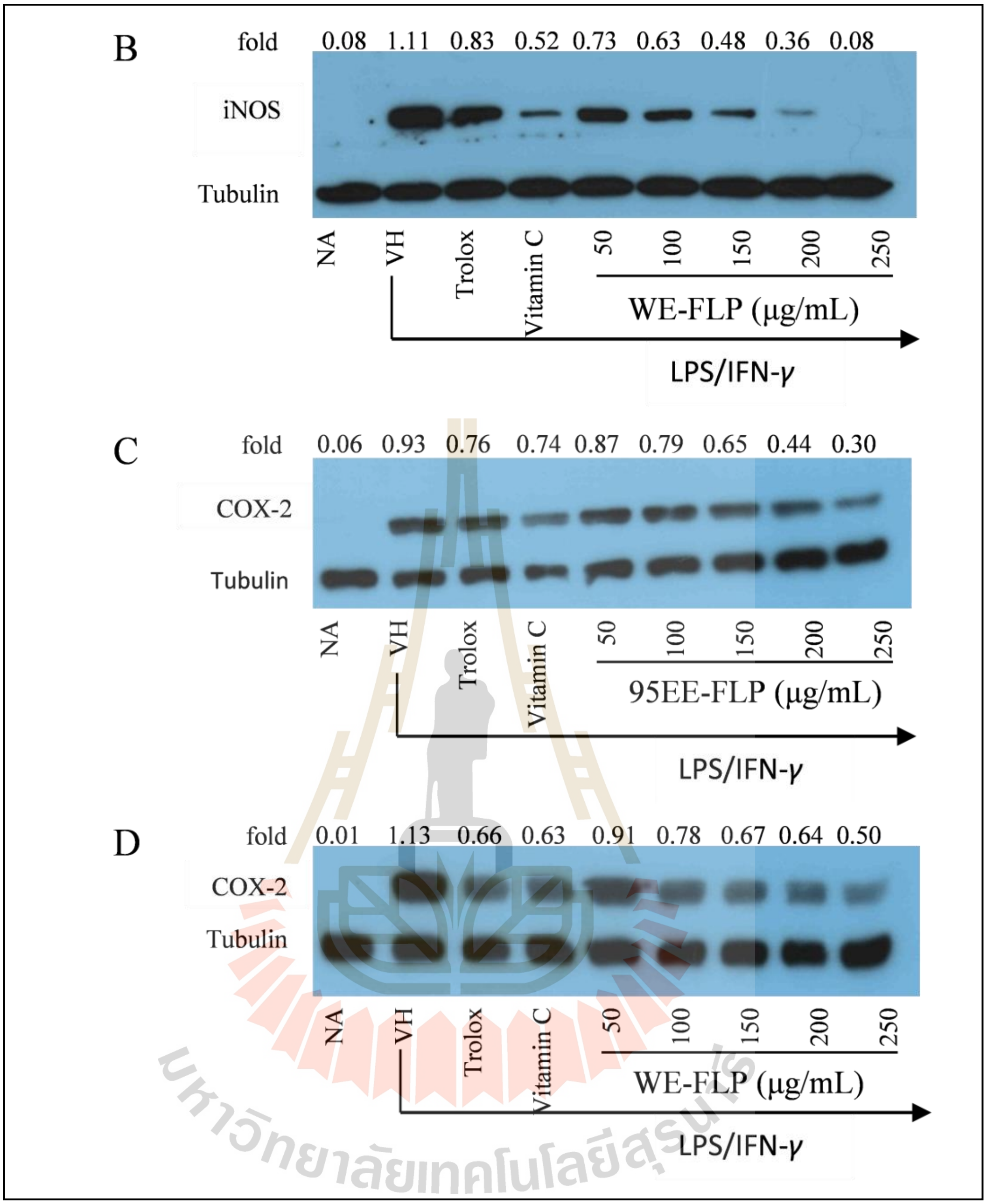
4.5.2 การยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2

เพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านการอักเสบเพิ่มเติม พร้อมทั้งค้นหากลไกการยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัด ฮว่านง็อกว่าเกิดผ่านการยับยั้ง iNOS และ COX-2 หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้ง iNOS และ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยเฉพาะ iNOS เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ induced NO โดยตรง ซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์ RAW264.7 ภายใต้สภาวะที่ถูกชักนำโดย LPS และ IFN-γ ปริมาณของ NO ในสภาวะที่ถูกชักนำ (induced NO) มีระดับสูงและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ดังนั้น สารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ induced NO น่าจะออกฤทธิ์ผ่านกลไกของการยับยั้ง iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์

induced NO โดยตรง และเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด เพิ่มเติมจากการยับยั้งการสร้าง NO งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้ง COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น prostaglandin และ thromboxane รวมทั้งสารกลุ่ม eicosanoid ของ fatty acid ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Timothy et al., 2015) การแสดงออก (expression) ของทั้ง iNOS และ COX-2 protein ถูกตรวจสอบด้วยวิธี Western blot analysis ในการทดลอง เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้า 1 ชม. กับสารสกัด 95EE-FLP หรือ WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-250 µg/ml) หรือ antioxidant positive control (50 µg/ml trolox หรือ 500 µM vitamin C) ก่อนได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ IFN-γ เป็นระยะเวลา 24 ชม. และประเมินด้วยวิธี Western blot analysis การทดลองให้ผลที่เป็นไปตามความคาดหมายคือ LPS และ IFN-γ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน iNOS ให้เพิ่มขึ้นใน RAW264.7 เซลล์ ซึ่งไม่มีการแสดงออกในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (lane VH เทียบกับ lane NA) (รูปที่ 4.9 A, B) ผลการทดลองชี้ชัดว่าทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS protein ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำละลายควบคุม โดยปริมาณการยับยั้งของสารสกัดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นจากการตรวจสอบการยับยั้งในเชิงปริมาณด้วย densitometry และ ปรับเทียบค่า (normalize) กับ tubulin ซึ่งเป็นโปรตีนของ house keeping gene พบว่า สารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 µg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS protein ได้ประมาณ 29% , 56%, 62%, 72% และ 83% ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 A) ส่วนสารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 µg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS protein ได้ประมาณ 34%, 43%, 57%, 68% และ 93% ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 B) ดังนั้น สารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 50-200 µg/ml มีประสิทธิภาพสูงกว่า WE-FLP ในการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ซึ่งสอดคล้องกับผลของการยับยั้งการสร้าง NO (รูปที่ 4.8) สำหรับ antioxidant control 500 µM vitamin C มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ได้ดีกว่า 50 µg/ml trolox โดย vitamin C สามารถยับยั้ง iNOS ได้ประมาณ 65% ในขณะที่ trolox สามารถยับยั้งได้เพียง 33% (รูปที่ 4.9 A)



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 4.9 ผลของสาสกัด 95EE-FLP ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (C) และ ผลของสารสกัด WE-FLP ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (B) และ COX-2 (D) ใน RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ การแสดงออกของโปรตีนในเชิงปริมาณวัดด้วยวิธี densitometry โดยใช้ Image J software และปรับค่า (normalize) โดยเทียบกับความเข้มของแถบ tubulin ในแต่ละ lane ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองซ้ำกันอย่างน้อย 2 ครั้ง NA = naïve; เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น, VH = vehicle; ตัวทำละลายควบคุม, 95EE-FLP และ WE-FLP เป็นสารสกัดจากใบสดของฮว่านง็อก

นอกจากความสามารถในการยับยั้ง NO และ iNOS สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ยังแสดงฤทธ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 (รูปที่ 4.9 C, D) ผลการวิเคราะห์ western blot ของ COX-2 ในเชิงปริมาณโดย densitometry และ normalize เทียบกับ tubulin ชี้ชัดว่า การยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 โดยสารสกัดทั้ง 2 แปรผันตามความเข้มข้น และประสิทธิภาพในการยับยั้ง COX-2 ของสารสกัดทั้ง 2 จะด้อยกว่าความสามารถในการยับยั้ง iNOS โดยสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 protein ได้ประมาณ 6% , 15%, 30%, 53% และ 68 % ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 C) ในขณะที่ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 protein ได้ประมาณ 20%, 31%, 41 %, 43% และ 56 % ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 D) สำหรับ antioxidant positive control 50 μg/ml trolox และ 500 μM vitamin C มีประสิทธิภาพทัดเทียมกันในการยับยั้ง COX-2 คือ 18% และ 20% ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 C)

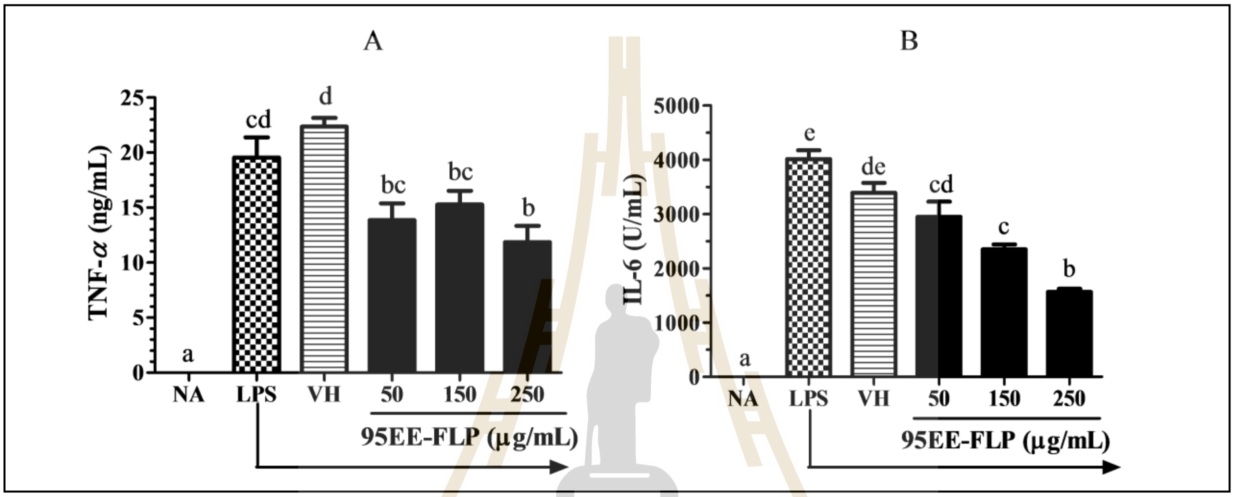
4.5.3 การยับยั้ง proinflammatory cytokine ของสารสกัด

เนื่องจากสารสกัด 95EE-FLP มีประสิทธิภาพต้านการอักเสบที่ดีกว่าสารสกัด WE-FLP ในการยับยั้งการสร้าง NO และ iNOS รวมทั้งที่ความเข้มข้นสูง 95EE-FLP (250 μg/ml) ยังสามารถลดระดับของ COX-2 ได้ดีกว่า สารสกัด WE-FLP งานวิจัยนี้จึงเลือกสารสกัด 95EE-FLP เพื่อใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเพิ่มเติมโดยผ่านกลไกการยับยั้ง proinflammatory cytokine IL-6 และ TNF-α โดยทำการศึกษาทั้งในระดับโปรตีนและ gene ในเซลล์RAW264.7 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS

4.5.3.1 การยับยั้งการหลั่ง TNF- α และ IL-6 ของ RAW264.7 เซลล์

ผลการทดสอบความสามารถของ 95EE-FLP ในการยับยั้งการหลั่ง proinflammtory cytokine TNF-α และ IL-6 จาก RAW264.7 เซลล์โดยวิธี ELISA แสดงในรูปที่ 4.10 A และ B ตามลำดับ ผลการทดลองเป็นไปตามความคาดหมายคือ ในสภาวะปกติ เซลล์ RAW264.7 มีการสร้าง pro-inflammatory cytokine TNF-α และ IL-6 ในระดับ baseline ที่มีปริมาณต่ำมากจนตรวจแทบไม่พบ แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย 100 ng/ml LPS เป็นระยะเวลา 8 ชม RAW264.7 เซลล์ถูกชักนำให้เพิ่มการสังเคราะห์ TNF-α และ IL-6 ให้อยู่ในระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) คืออยู่ที่ประมาณ 19 ng/ml และ 4000 U/ml ตามลำดับ แต่การบ่ม RAW264.7 เซลล์ล่วงหน้ากับสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 50-250 μg/ml เป็นระยะเวลา 1 ชม ก่อนการกระตุ้นด้วย LPS สามารถลดปริมาณของทั้ง TNF-α และ IL-6 ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นใน RAW264.7 เซลล์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็น vehicle control ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.10 A และ 4.10 B ตามลำดับ) อย่างไรก็ดี ผลการทดลองชี้แนะว่าสารสกัด 95EE-FLP มี

ความสามารถในการยับยั้ง IL-6 ได้ดีกว่าการยับยั้ง TNF-α โดยการยับยั้ง IL-6 ของสารสกัด 95EE-FLP เพิ่มขึ้นกับตามความเข้มข้นของสารสกัด เมื่อเทียบกับ vehicle control สารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 150 และ 250 μg/ml สามารถยับยั้ง IL-6 ได้ประมาณ 29.4 % และ 52.9% ตามลำดับ ($p < 0.05$) ส่วนการยับยั้ง TNF-α ของ 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 50-250 μg/ml มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ คืออยู่ที่ประมาณ 32-50 % เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็น vehicle control

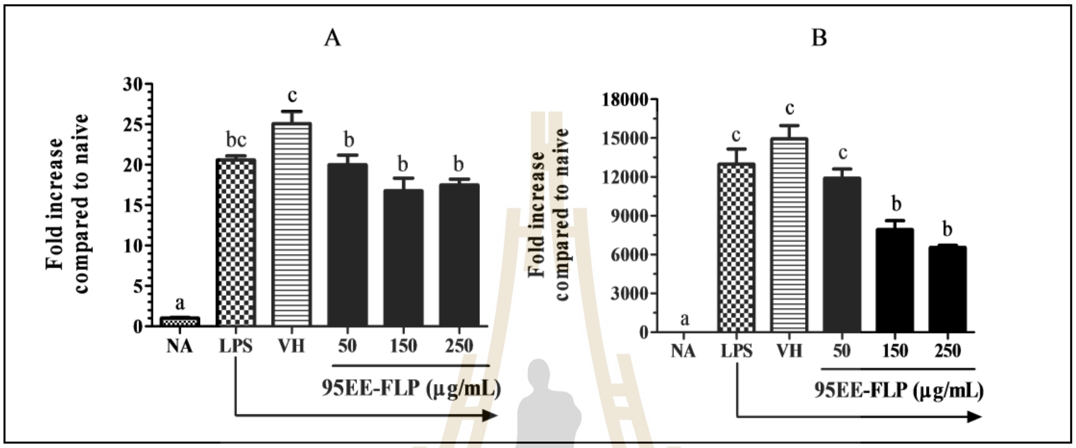


รูปที่ 4.10 การยับยั้งการหลั่งของ TNF-α (A) และ IL-6 (B) จาก RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยสารสกัดจากใบฮ่วานง็อก 95EE-FLP เซลล์ RAW264.7 ($2x10^6$ เซลล์/หลุม) บ่มล่วงหน้ากับ ตัวทำลาย หรือ สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-250 μg/ml) เป็นเวลา 1 ชม. ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/ml) เป็นเวลา 8 ชม. ส่วนที่เป็น supernantant ใน culture ถูกจัดเก็บ และวิเคราะห์ปริมาณของ TNF-α และ IL-6 ด้วยวิธี ELISA ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM (n =3) และเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.5.3.2 การยับยั้งการแสดงออกในระดับ gene ของ TNF-α และ IL-6

เพื่อศึกษาว่าการยับยั้ง proinflammatory cytokine TNF-α และ IL-6 โดยสารสกัด 95EE-FLP เกิดผ่านการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA หรือไม่ การตรวจสอบการแสดงออกของ TNF-α และ IL-6 ในระดับ gene จึงกระทำโดยใช้เทคนิค qRT-PCR ผลการทดสอบ (รูปที่ 4.11) พบว่าสารสกัด 95EE-FLP สามารถลดระดับของ mRNA ของทั้ง TNF-α และ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็น vehicle control โดยผลการทดสอบมีความสอดคล้องกับผลของสารสกัดที่พบในระดับโปรตีน (รูปที่

4.10 A-B) คือสารสกัด 95EE-FLP มีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของ mRNA ของ IL-6 ได้ดีกว่า TNF-α โดยสารสกัด 95EE-FLP ที่ 150-250 μg/ml สามารถยับยั้งระดับของ mRNA ของ IL-6 ในระดับเดียวกัน คืออยู่ที่ประมาณ 50 % เมื่อเทียบกับ vehicle control (รูปที่ 4.11 B) และ 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 50-250 μg/ml ไม่มีความแตกต่างกันในการลดระดับของ mRNA ของ TNF-α คือสามารถลดระดับของ mRNA ของ TNF-α ได้ประมาณ 27 % เมื่อเทียบกับ vehicle control (รูปที่ 4.11 A)



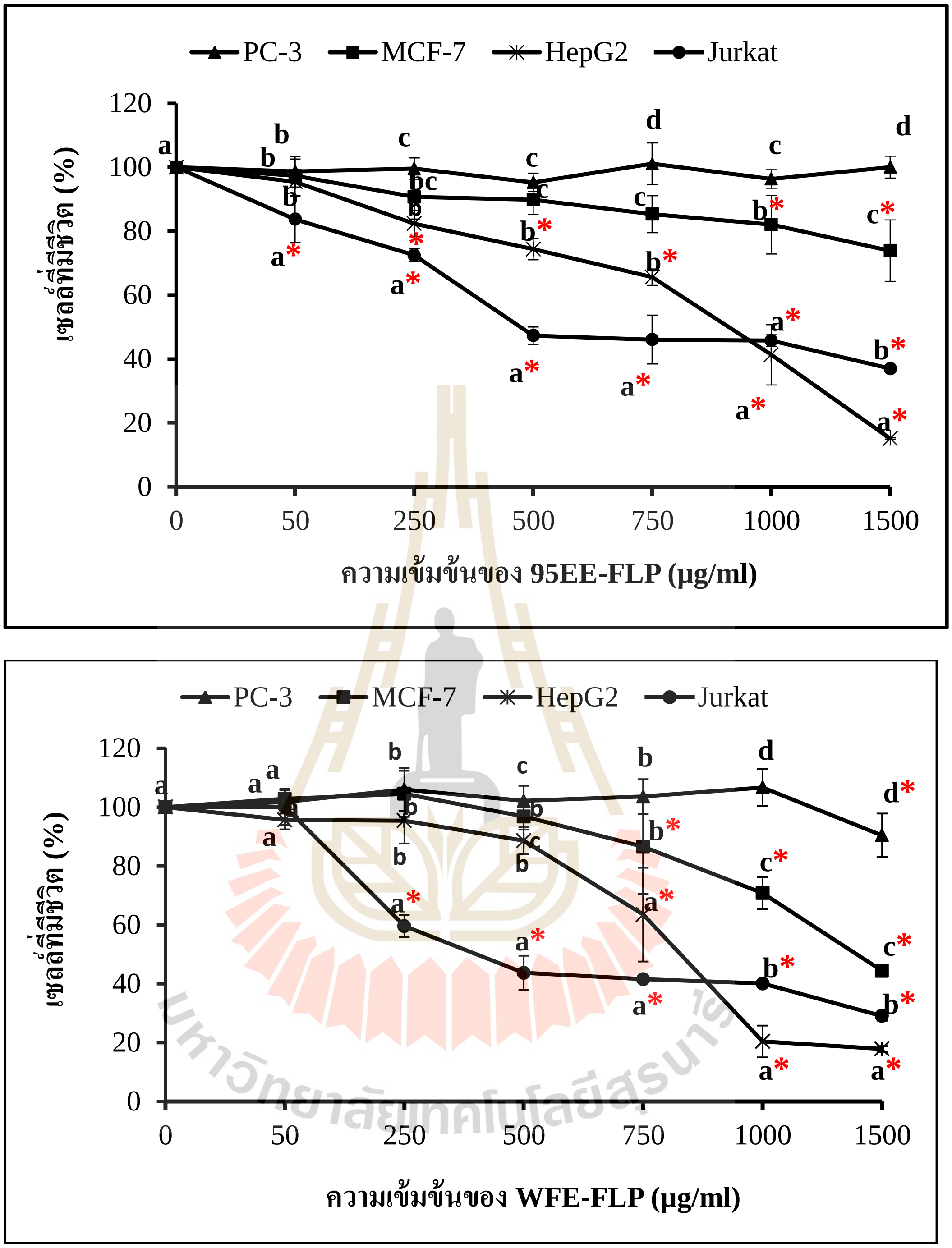
รูปที่ 4.11 การยับยั้งการแสดงออกระดับ gene ของ TNF-α (A) และ IL-6 (B) ใน RAW264.7 เซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยสารสกัด 95EE-FLP เซลล์ RAW264.7 ($2x10^6$ เซลล์/หลุม) บ่มล่วงหน้ากับตัวทำลาย หรือ สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50-250 μg/ml) เป็นเวลา 1 ชม. ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/ml) เป็นเวลา 8 ชม. total RNA ของเซลล์ถูกสกัดและหาปริมาณ mRNA ของ TNF-α และ IL-6 ด้วยเทคนิค qRT-PCR ใช้ Taqman primers และ probe normalize ค่า โดยใช้ endogenous 18S rRNA เป็นเกณฑ์และรายงานผลการแสดงออกของ gene เป็นจำนวนเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับสารสกัดใช้วิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM (n =3) และเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

4.6 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดฮว่านง็อกกระทำทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* โมเดลการศึกษา *in vitro* ตรวจสอบความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัด 95EE-FLP ต่อเซลล์มะเร็ง 4 สายพันธุ์ ส่วน *in vivo* ศึกษาโดยใช้ CAM โมเดลที่ปลูกถ่าย (inoculate) เซลล์มะเร็ง B16F10 เข้าไปที่ CAM

4.6.1 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์

เมื่อบ่มเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ 4 ชนิดคือ เซลล์ HepG2, MCF-7, PC-3 และ Jurkat ร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 50, 250, 500, 750, 1,000, และ 1,500 μg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และประเมินปริมาณเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ด้วย MTT assay พบว่าทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ Jurkat และ HepG2 ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ PC-3 และ MCF-7 สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ทุกความเข้มข้น (50-1,500 μg/ml) ทำให้เกิดการตายของ Jurkat เซลล์ได้สูงกว่า vehicle control ที่ไม่มีสารสกัด ($p< 0.05$) สารสกัด 95EE-FLP ที่ 250 μg/ml ขึ้นไป สามารถชักนำให้เกิดการตายของ MCF-7 ได้ในขณะที่ WE-FLP ต้องใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 750 μg/ml ขึ้นไป (รูปที่ 4.12 A-B) สำหรับเซลล์มะเร็ง MCF-7 และ PC-3 ไม่ค่อยมีความไว (unsusceptibility) ต่อสารสกัด ฮว่านง็อก การชักนำให้เกิดการตายของ MCF-7 เซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ต้องใช้ความเข้มข้นของ WE-FLP ที่สูงตั้งแต่ 750 μg/ml ขึ้นไป ในขณะที่สารสกัด 95EE-FLP ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1000 μg/ml ขึ้นไป ในกรณีเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 มีความทนทาน (resistance) ต่อความเป็นพิษของสารสกัดเป็นพิเศษ เพราะแม้บ่มร่วมกับ 95EE-FLP ความเข้มข้นสูงถึง 1,500 μg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม ก็ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดการตายของ PC3 ในขณะที่ WE-FLP ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1,500 μg/ml จึงสามารถชักนำให้เกิดการตายได้ 9.7% (รูปที่ 4.12 B) ตารางที่ 4.2 แสดงค่า LC_{50} ของสารสกัดฮว่านง็อกต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด สารสกัด WE-FLP มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง Jurkat และ HepG2 ได้ดีกว่า 95EE-FLP เล็กน้อยคือ ประมาณ 18% และ 8% ตามลำดับ ($p< 0.05$) (ตารางที่ 4.2) ส่วนค่า LC_{50} ของ สารสกัดทั้งสองต่อเซลล์มะเร็ง PC-3 สามารถรายงานผลแค่มากกว่า 1,500 μg/ml ขึ้นไปเท่านั้นเนื่องจากความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในงานทดลอง ไม่สามารถชักนำให้เกิดการตายของ PC-3 ให้ถึง 50% ซึ่งเป็นกรณีเดียวกันกับค่า LC_{50} ของ 95EE-FLP ต่อ MCF-7 ที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถชักนำให้เกิดการตายได้เพียง 26.1% ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความไวของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ทั้ง 4 ต่อการถูกทำลายโดยสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้นสูง (750 μg/ml, 1,500 μg/ml) เรียงลำดับจากมากสุดสู่น้อยสุดคือ Jurkat < HepG2 < MCF-7 < PC-3 และต่อการถูกทำลายโดยสารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้น 1,000 μg/ml ขึ้นไป คือ Jurkat < HepG2 < MCF-7<PC-3 (รูปที่ 4.12 A-B) จากผลการทดลองโดยรวม ข้อมูลชี้ชัดว่าทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP มีความสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งต่างชนิดแตกต่างกัน และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลาย Jurkat เซลล์ ดังนั้น เซลล์ Jurkat จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษากลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ต่อไป



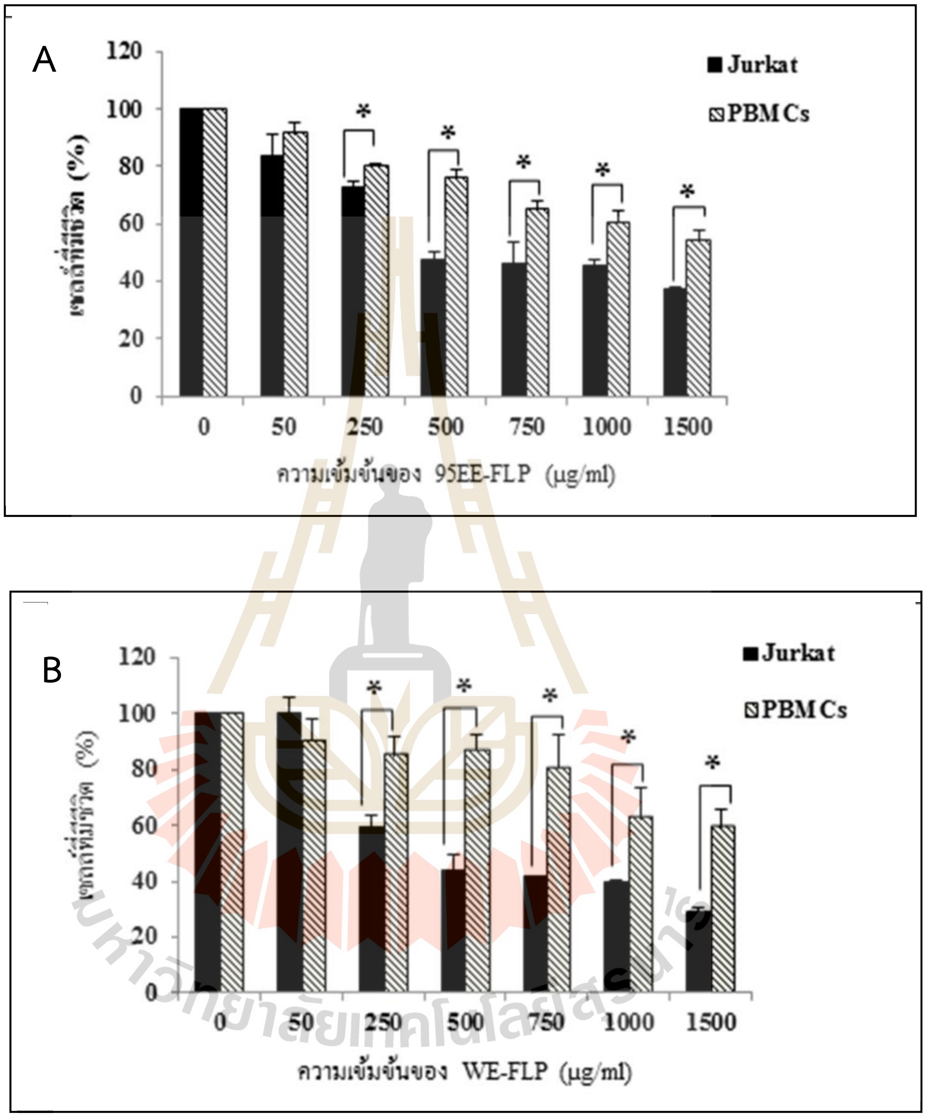
รูปที่ 4.12 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ HepG2, MCF-7, PC-3, และ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดนาน 24 ชม ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระอย่างน้อย 3 ครั้ง ค่าเฉลี่ยที่มี * ของเซลล์สายพันธุ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม vehicle control ที่ไม่ได้รับสารสกัด ($p < 0.05$) ส่วนค่าเฉลี่ยในความเข้มข้นเดียวกันของแต่ละเซลล์สายพันธุ์ที่มีอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ 4 ชนิด

ชนิดเซลล์มะเร็ง	LC_{50}(μg/ml)	
	95EE-FLP	WE-FLP
Jurkat	476.35 ± 31.51[a]	389.94 ± 13.26[b]
HepG2	927.01 ± 90.84[a]	853.16 ± 49.71[a]
MCF-7	>1,500	1,434.45 ± 85.62
PC-3	>1,500	>1,500

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$)

อย่างไรก็ดี เพื่อให้มั่นใจว่าความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดที่ก่อให้เกิดการตายต่อเซลล์ Jurkat จะไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ปกติ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 50, 250, 500, 750, 1,000, และ 1,500 μg/ml ต่อเซลล์ปกติ เพื่อให้มั่นใจว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ งานวิจัยนี้ได้เลือกเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติชนิด mononuclear ในกระแสโลหิต (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) มาใช้เพื่อเป็นตัวแทนของเซลล์ปกติศึกษาควบคู่กับเซลล์ Jurkat เนื่องจากทั้งเซลล์ Jurkat และ PBMCs เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งคู่ จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250 μg/ml -1,500 μg/ml ของ 95EE-FLP และ WE-FLP มีฤทธิ์ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง Jurkat ได้ดีกว่าเซลล์ปกติ PBMCs อย่างมีนัยสำคัญที่ $p< 0.05$ (รูปที่ 4.13) ค่า LC_{50} ของสารสกัด 95EE-FLP ที่มี ต่อ Jurkat เซลล์เท่ากับ 467.35 ± 31.51 และต่อ PBMC เซลล์มีค่ามากกว่า 1,500 μg/ml ในขณะที่ค่า LC_{50} ของสารสกัด WE-FLP ต่อ Jurkat เซลล์เท่ากับ 389.94 ± 13.26 และต่อ PBMC เซลล์มีค่ามากกว่า 1,500 μg/ml ซึ่งข้อมูลที่ชี้แนะว่าสารสกัดฮว่านง็อกมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติในกระแสโลหิต ช่วยสนับสนุนการใช้ฮว่านง็อกเป็นสมุนไพรต้านมะเร็งได้ในระดับหนึ่ง



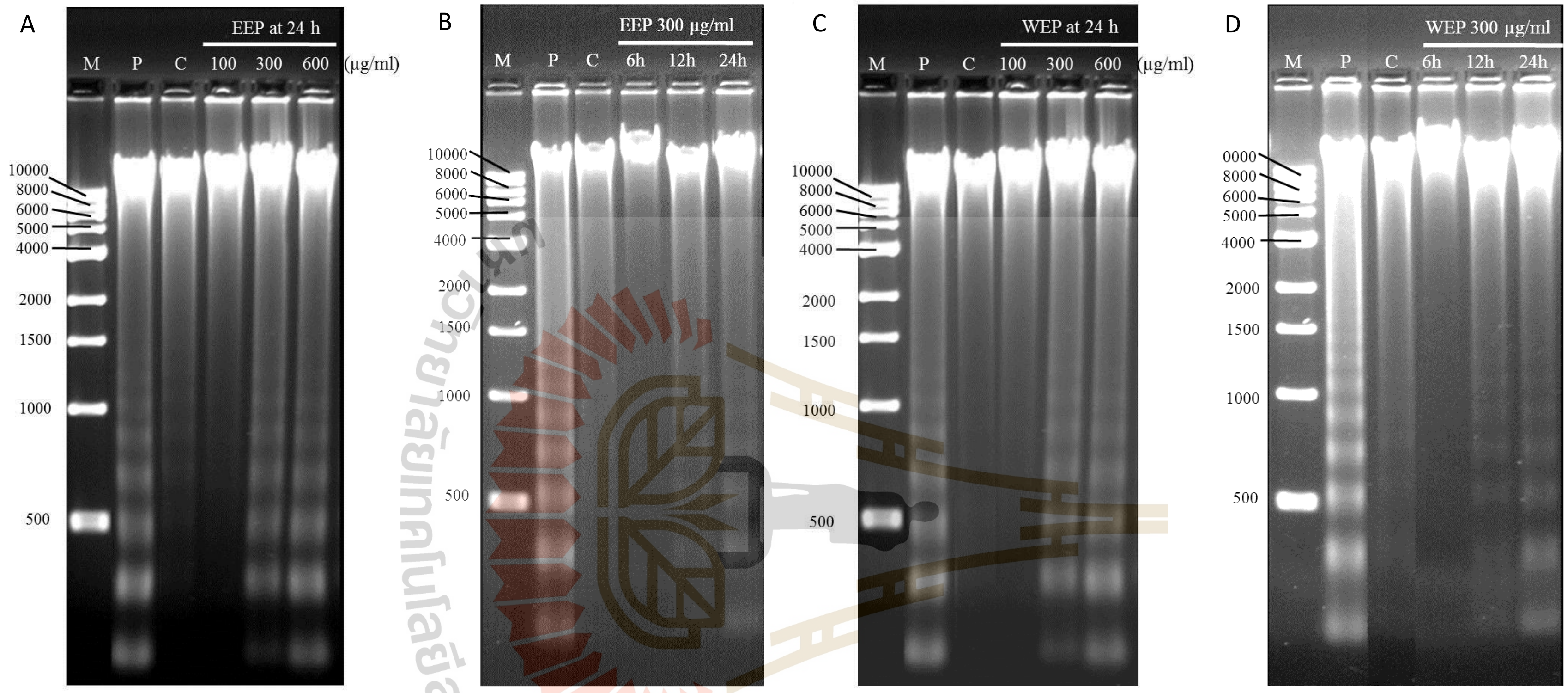
รูปที่ 4.13 การเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat และ PBMCs เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงก่อนประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n = 4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน เครื่องหมาย * แสดงค่าเฉลี่ยของแต่ละคู่ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Student's *t* test

4.6.2 การเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งผ่านกลไก apoptosis

4.6.2.1 วิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)

เทคนิค agarose gel electrophoresis ถูกนำมาวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นขั้นบันได (DNA ladder) ที่มีขนาดตามจำนวนเท่าของ 180-200 base pair อันเป็นเอกลักษณ์หนึ่งของเซลล์เมื่อเกิดการตายแบบ apoptosis ผลการทดลองใน รูปที่ 4.14 A-D แสดงว่า สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง Jurkat ผ่านกลไกของ apoptosis การชักนำให้เกิด apoptosis ของสารสกัดมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ และขึ้นกับช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม ผลการทดลองพบว่าเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับ 95EE-FLP หรือ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แสดงการแตกหักของ DNA เป็นแบบขั้นบันไดอย่างชัดเจน อันบ่งบอกถึงการตายของเซลล์แบบ apoptosis (รูปที่ 4.14 A และ C ตามลำดับ) งานวิจัยนี้ เลือกเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 300 µg/ml ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (6, 12, 24 ชม.) มาหาช่วงระยะเวลาที่เซลล์เริ่มเกิด apoptosis ผลการทดลองพบว่า ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง jurkat เกิดการตายแบบ apoptosis ที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงภายหลังการบ่ม (รูปที่ 4.14 B และ D ตามลำดับ) ทั้งนี้ กลุ่ม vehicle control (กลุ่มของเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับตัวทำละลาย ไม่ได้รับสารสกัด) ไม่เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ ในขณะที่เซลล์ Jurkat ที่บ่มกับกับยาที่เป็น positive control (40 µg/ml etoposide) เป็นระยะเวลา 24 ชม. แสดงการแตกหักของ DNA แบบขั้นบันไดอย่างชัดเจน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



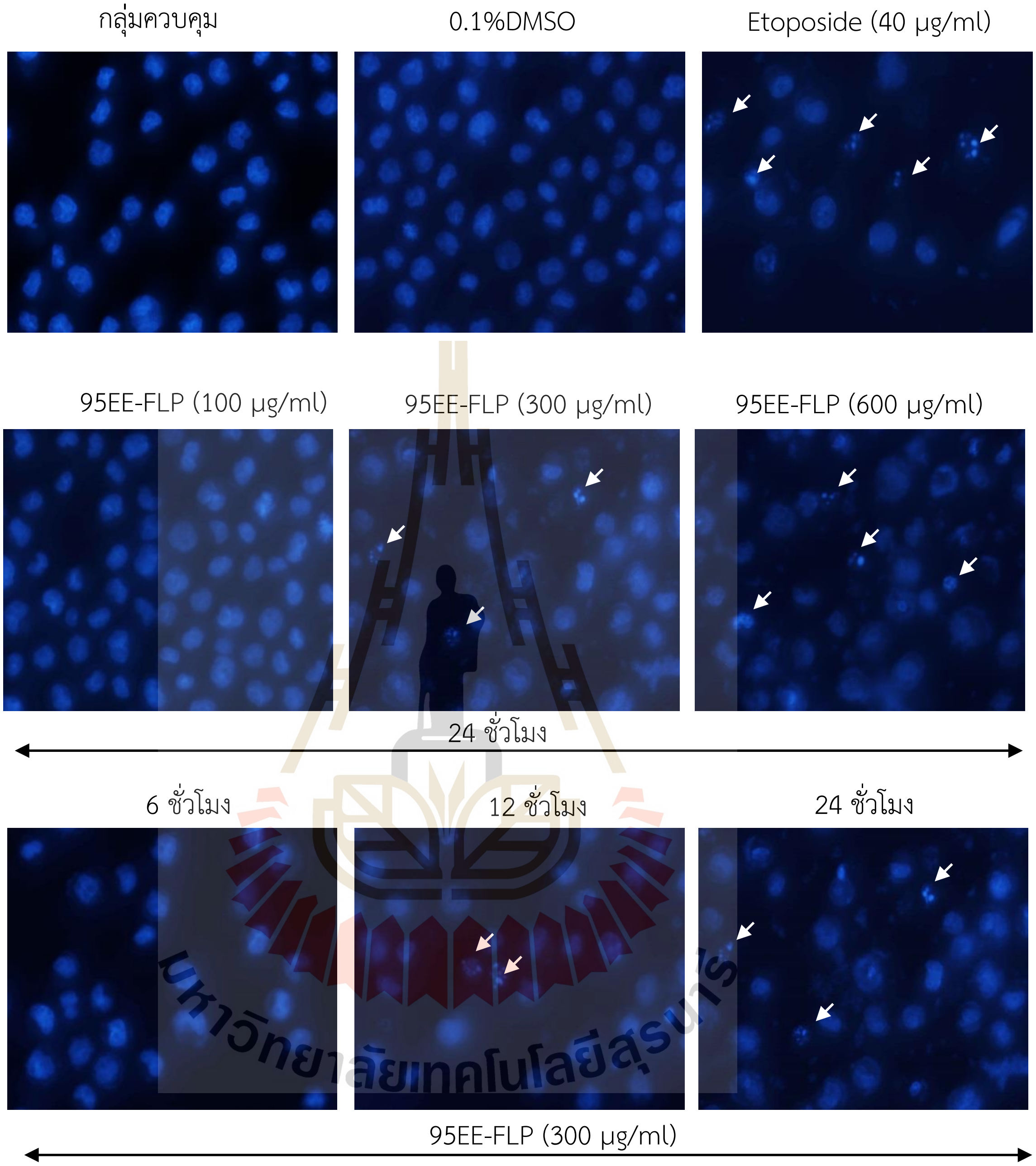
รูปที่ 4.14 แสดง DNA ที่เกิดการแตกหักแบบขั้นบันไดใน Jurkat เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (C) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชม. และจากการบ่ม Jurkat เซลล์ร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP (B) และ WE-FLP (D) ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชม. Lane M = 1 kb DNA marker, P = positive control (40 µg/ml etoposide), C = vehicle control, EEP = สารสกัด 95EE-FLP และ WEP = สารสกัด WE-FLP รูปที่แสดงเป็นตัวแทนจากผลจากการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

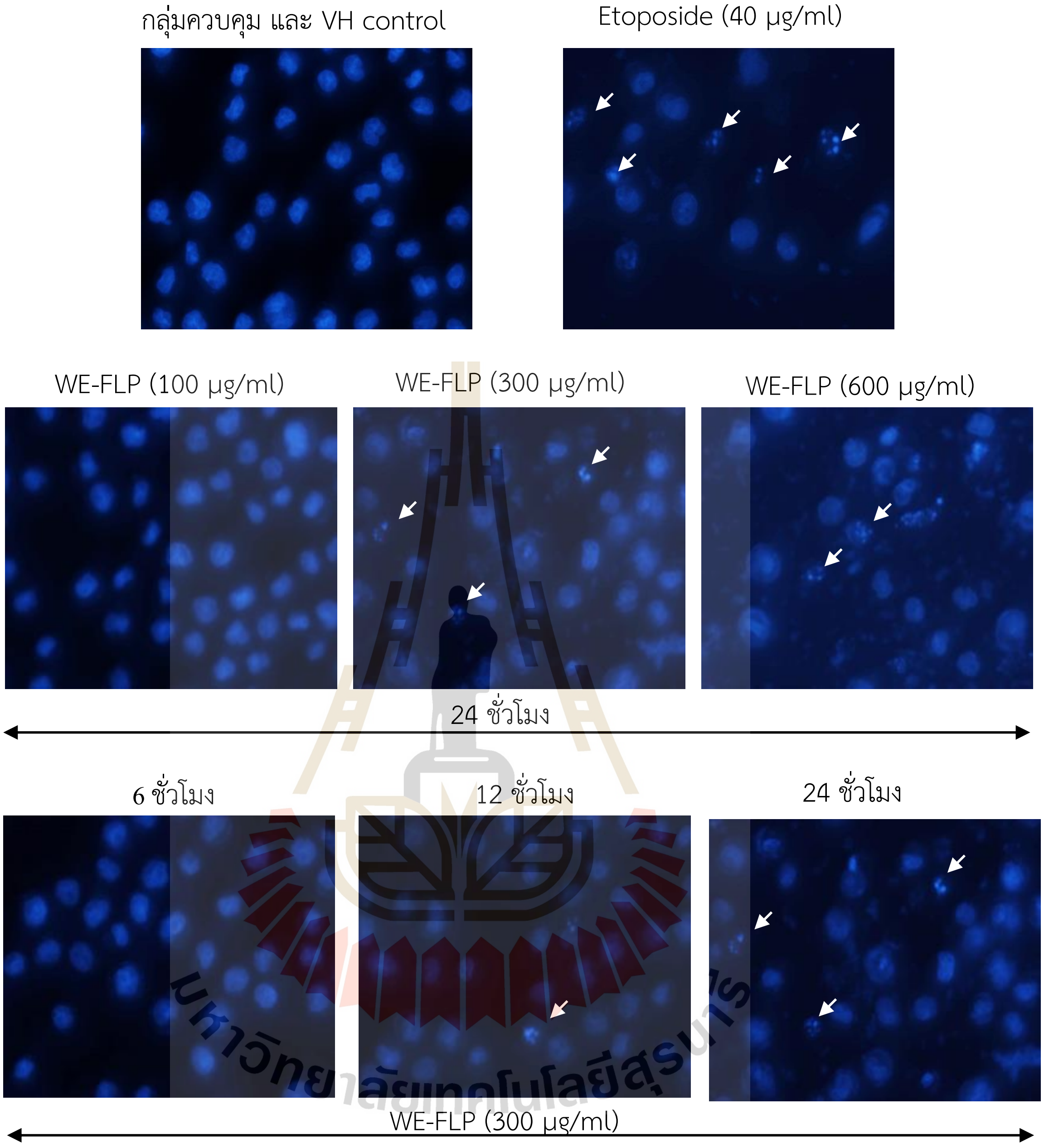
4.6.2.2 การศึกษารูปร่างของนิวเคลียสใน apoptotic cell ด้วยสี Hoechst 33258

ผลการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสของเซลล์ Jurkat หลังจากบ่มด้วย 95EE-FLP (รูปที่ 4.15) หรือ WE-FLP (รูปที่ 4.16) ด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี Hoechst 33258 พบว่าเซลล์ Jurkat ที่บ่มด้วยยา etoposide ซึ่งเป็น positive control เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ดังมีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ดังนี้ เกิดการ blebling ของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการหดตัวของเซลล์ เกิดการหดตัวและการแตกหักของนิวเคลียส (ลูกศรสีขาว) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้เช่นกัน ในเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดฮว่านง็อกทั้ง 95EE-FLP (รูปที่ 4.15) หรือ WE-FLP (รูปที่ 4.16) ที่ความเข้มข้น 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลจาก time course study พบว่า Jurkat เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดทั้งสองที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 12 ชม. ขึ้นไปถึง 24 ชม สามารถถูกชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis (การศึกษานี้ไม่ได้ติดตามวัดผลภายหลัง 24 ชม.) ดังนั้น ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สอดคล้องกับผลของ DNA ladder ที่ตรวจด้วย gel electrophoresis (รูปที่ 4.14) และช่วยยืนยันว่า apoptosis เป็นกลไกหนึ่งที่สารสกัดฮว่านง็อกทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็ง Jurkat โดยสารสกัดขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด และ ระยะเวลาของการบ่ม ดังเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP หรือ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หรือ บ่มที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไม่พบหลักฐานของลักษณะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และนิวเคลียสที่เป็นเอกลักษณ์ของเซลล์ที่เกิด apoptosis แต่อย่างใดและไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม vehicle control (รูปที่ 4.15-4.16)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสด้วยการย้อมเซลล์ Jurkat ด้วยสี Hoechst 33258 ภายหลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับตัวทำละลายควบคุม หรือ 40 µg/ml etoposide หรือสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือ ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงในการศึกษาหาระยะเวลาที่ชักนำให้เกิด apoptosis

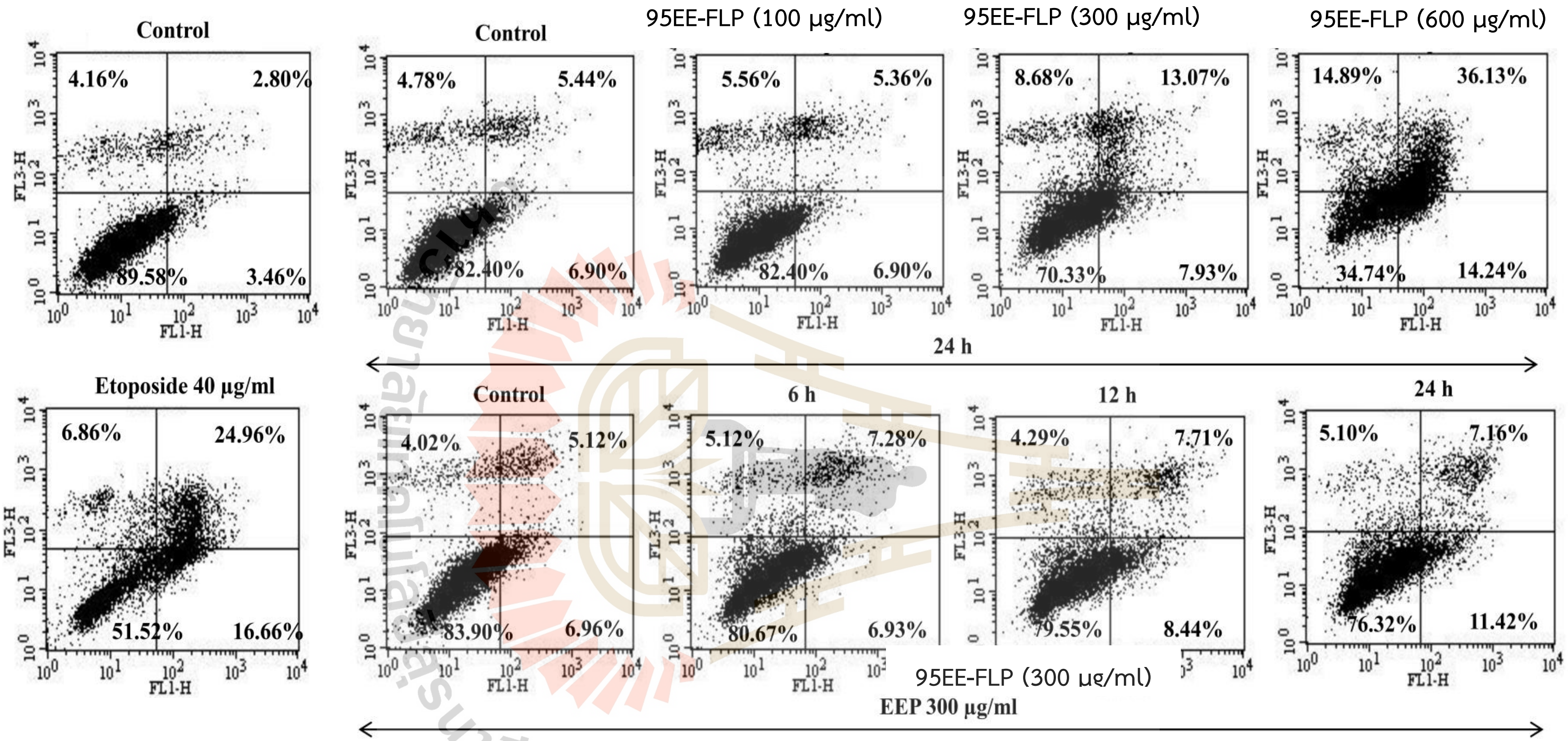


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

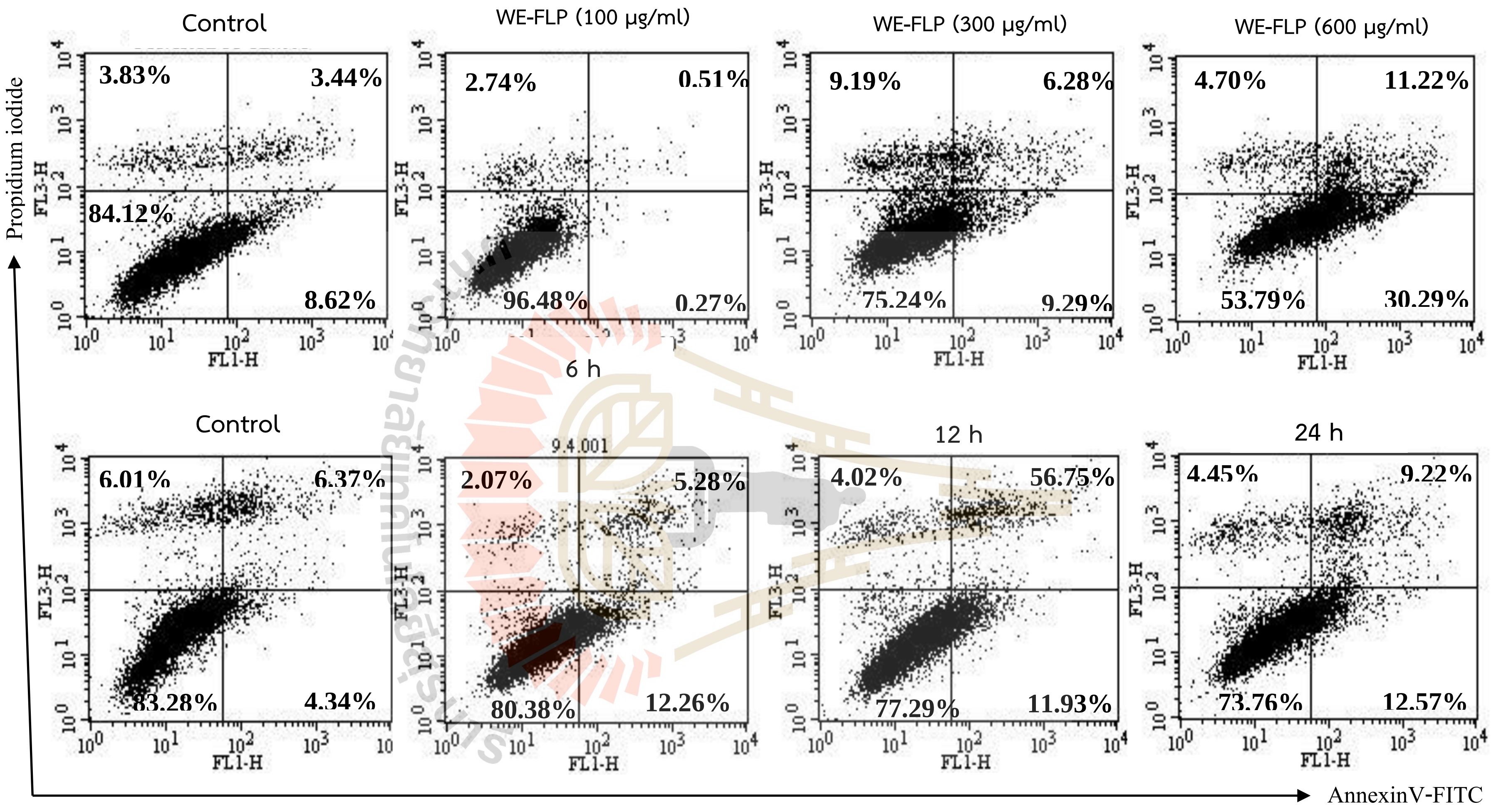
รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสด้วยการย้อมเซลล์ Jurkat ด้วยสี Hoechst 33258 ภายหลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับตัวทำละลายควบคุม หรือ 40 µg/ml etoposide หรือสารสกัดใบฮว่านง็อก WE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือ บ่มที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงในการศึกษาหาระยะเวลาที่ชักนำให้เกิด apoptosis

4.6.2.3 การย้อม early apoptotic cell ด้วย Annexin V-PI

เทคนิคการย้อม Annexin V-PI นำมาใช้เพื่อยืนยันลักษณะการตายแบบ apoptosis ในระยะเริ่มต้น ผลจากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis ของ Jurkat เซลล์ในระยะเริ่มต้นเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด 95EE-FLP และระยะเวลาของการบ่ม (รูปที่ 4.17) ผลจากการวิเคราะห์เซลล์ที่ย้อมด้วย annexin V ร่วมกับ PI ด้วยการใช้ flow cytometry พบว่า ในจตุภาคที่ 3 (กลุ่มเซลล์ที่ติดสี annexin V แต่ไม่ติดสี PI) ของรูปที่ 4.17 มี % early apoptotic cell เพิ่มขึ้นจาก 6.90% ในกลุ่มควบคุม เป็น 7.93% และ 14.24% ในกลุ่มเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และเซลล์ที่ได้รับความเข้มข้นต่ำของสารสกัด (100 µg/ml) ไม่มี % early apoptotic cell (6.9%) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เป็น vehicle control แต่อย่างใด จากการทำ time course study เพื่อหาระยะเวลาที่สารสกัดชักนำให้เกิด apoptosis พบว่า การบ่ม Jurkat เซลล์ร่วมกับ 95EE-FLP ที่ 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6 ชม. ไม่มีการชักนำให้เกิด apoptosis เพิ่มขึ้น ดังค่าของ % early apoptotic cell ที่ 6 ชม. ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่เซลล์ที่ได้รับการบ่มเป็นระยะเวลา 12 ชม. และ 24 ชม. มี % early apoptotic cell เพิ่มขึ้นจาก 6.96% ในกลุ่มควบคุม หรือจาก 6.93% ใน 6 ชม. เป็น 8.44% และ 11.42% ใน 12 ชม. และ 24 ชม. ตามลำดับ (รูปที่ 4.17) สารสกัด WE-FLP ให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกับ 95EE-FLP คือ % early apoptotic cell เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด WE-FLP ต้องมีความเข้มข้น 300 µg/ml และ 600 µg/ml จึงสามารถเพิ่ม % early apoptotic cell จาก 8.62% ในกลุ่มควบคุม เป็น 9.29% และ 30.29% ตามลำดับ ในการบ่มร่วมกับเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชม. สำหรับ time course study แสดงว่าสารสกัด WE-FLP สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ได้เมื่อได้รับสารสกัดเป็นเวลา 6 ชม. ดังการเพิ่ม % early apoptotic cell จาก 4.34% ในกลุ่มควบคุม เป็น 12.26% ที่ 6 ชม. แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของระยะเวลาการบ่มเซลล์จาก 6 ชม เป็น 12 หรือ 24 ชม ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มของ % early apoptotic cell แต่อย่างใด ดัง early apoptotic cell ที่ระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชม. มีค่าเกือบเท่ากันหมดคือใกล้เคียง 12 % (รูปที่ 4.18) ดังนั้น การทดลองในรูปที่ 4.17-4.18 ชี้แนะว่าที่ความเข้มข้น 300 µg/ml WE-FLP สามารถเพิ่ม % early apoptotic cell ได้รวดเร็วกว่าสารสกัด 95EE-FLP คือ มีผลให้เกิด early apoptosis ได้ตั้งแต่ระยะเวลา 6 ชม ในขณะที่สารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบการเพิ่มที่ระยะเวลา 12 ชม อันส่งผลให้ปริมาณ % early apoptotic cell ของ Jurkat ที่ได้รับ 300 µg/ml WE-FLP มีค่าเป็น 2.9 เท่าของกลุ่มควบคุมในขณะที่ 95EE-FLP มีค่าเป็น 1.64 เท่าของกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 24 ชม. สำหรับการบ่มเซลล์ร่วมกับ 40 µg/ml etoposide เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็น positive control เพิ่ม % early apoptotic cell จาก 3.46% ในกลุ่มควบคุมเป็น 16.66% และสามารถชักนำให้เกิด apoptosis เพิ่มขึ้น 564.86% หรือ ประมาณ 6.6 เท่าจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 14.17)



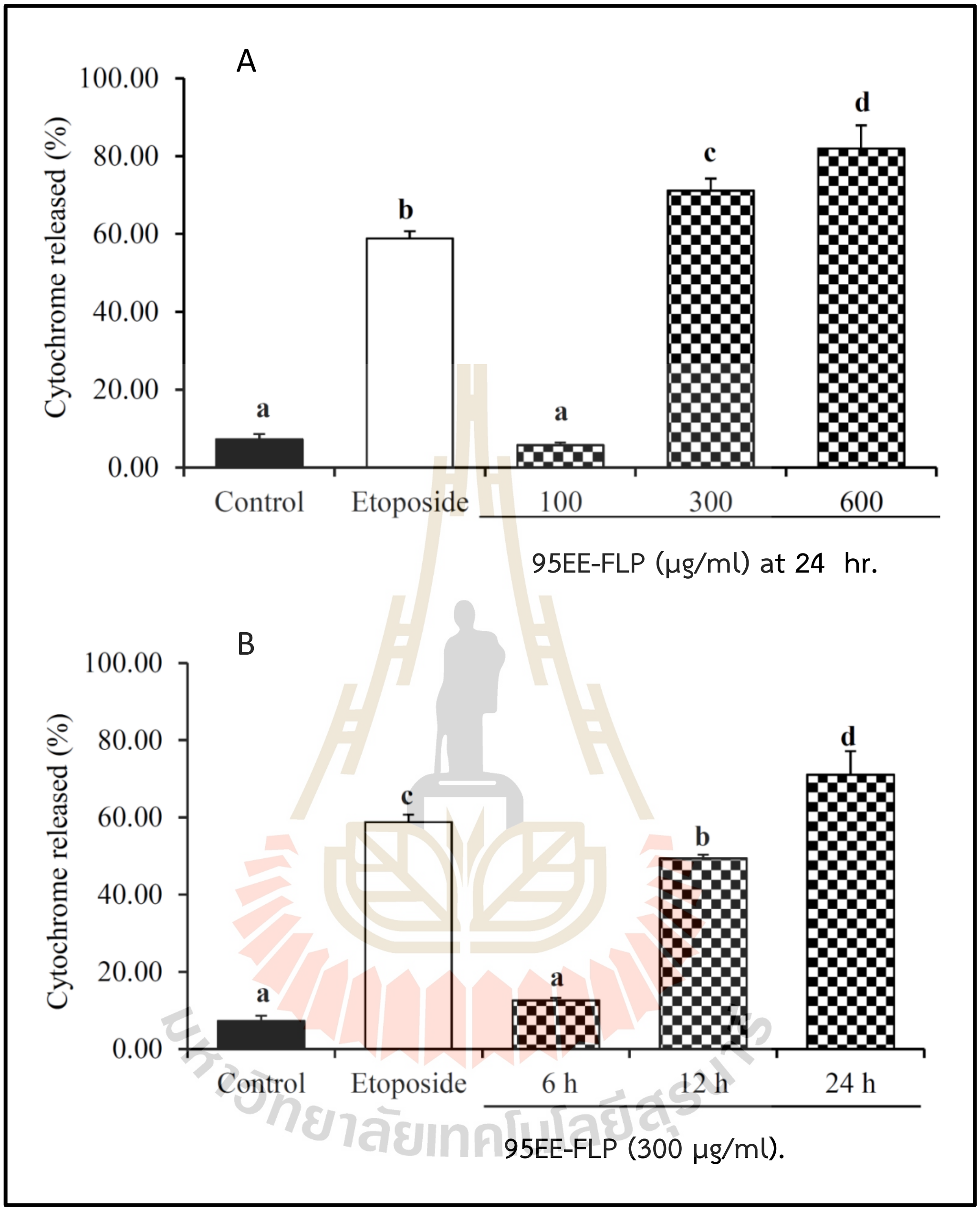
รูปที่ 4.17 การวิเคราะห์รูปแบบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ Jurkat ที่ย้อมเซลล์ด้วย annexin V ร่วมกับ PI และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry หลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 μg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือ ที่ความเข้มข้น 300 μg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน



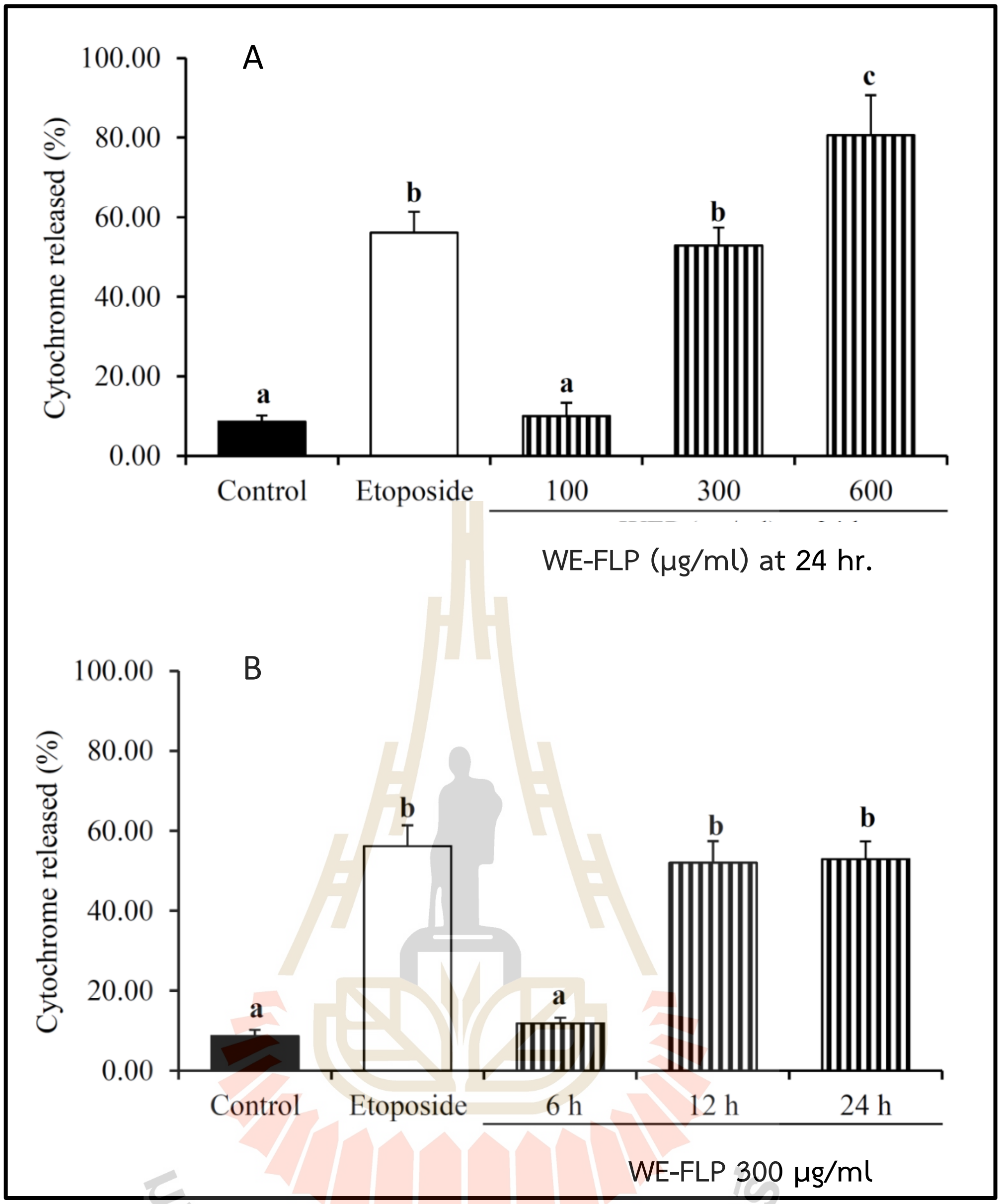
รูปที่ 4.18 การวิเคราะห์รูปแบบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ Jurkat ที่ย้อมเซลล์ด้วย annexin V ร่วมกับ PI และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry **หลังจากการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 μg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. หรือที่**ความเข้มข้น 300 μg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน

4.6.2.4 การชักนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome C

Cytochrome C คือโปรตีนที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้ม mitochondria ชั้นนอกและชั้นใน ซึ่งกลไกการเกิด apoptosis ผ่าน intrinsic pathway เกิดการเปลี่ยน mitochondrial membrane potential ส่งผลให้ cytochrome C ใน mitochondria ถูกหลั่งออกสู่ cytoplasm ดังนั้นเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการ apoptosis จึงมีปริมาณของ cytochrome C ใน mitochondria ลดลง ซึ่งปริมาณของ cytochrome C สามารถตรวจวัดได้โดยการจับของ anti-cytochrome C-FITC และวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค flow cytometer ผลการทดลองในรูปที่ 4.19-4.20 พบว่า ประสิทธิภาพของ 95EE-FLP และ WE-FLP ในการชักนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome C ในเซลล์ Jurkat ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ภายหลังการบ่ม Jurkat เซลล์ร่วมกับสารสกัดเป็นระยะเวลา 24 ชม. สารสกัด 95EE-FLP หรือ WE-FLP ที่ ความเข้มข้น 300 μg/ml และ 600 μg/ml สามารถชักนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome C จาก mitochondria ในเซลล์ Jurkat สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p< 0.05) (รูปที่ 4.19 A, 4.20 A) ทั้งนี้ ปริมาณการหลั่งของ cytochrome c เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ดังเซลล์ Jurkat ที่ได้รับ 300 μg/ml และ 600 μg/ml 95EE-FLP มีการหลั่งของ cytochrome c เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมประมาณ 65 และ 75 % ตามลำดับ (รูปที่ 4.19 A) ในขณะที่ความเข้มข้นเดียวกันของ WE-FLP สามารถชักนำให้มีการหลั่ง cytochrome c ที่ใกล้เคียงกัน คือเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมประมาณ 49% และ 76% ตามลำดับ (รูปที่ 4.20 A) ผลการทดลองในรูปที่ 4.19 B และ 4.20 B ชี้ชัดว่า ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ ความเข้มข้น 300 μg/ml สามารถชักนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม (p< 0.05) ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และไม่มีผลต่อการหลั่งของ cytochrome c เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเมื่อบ่มในช่วงระยะเวลาสั้นที่ 6 ชม. สิ่งที่น่าสนใจ คือ สารสกัดทั้งสอง 95EE-FLP หรือ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 600 μg/ml มีประสิทธิภาพสูงกว่า 40 μg/ml etoposide ซึ่งเป็น positive control ในการเหนี่ยวนำการหลั่ง cytochrome C ในเซลล์ Jurkat อย่างมีนัยสำคัญ (p< 0.05) โดยรวม ผลทดลองชี้ชัดว่า การชักนำให้เกิดการรั่วไหลของ cytochrome c จาก mitochondrial membrane เป็นกลไกหนึ่งที่สารสกัดจากใบฮว่านง็อกสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง Jurkat เกิดการตายด้วยกระบวนการ apoptosis



รูปที่ 4.19 เปอร์เซ็นต์การหลั่งของ Cytochrome c จาก mitochondrial membrane ในเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดใบฮว่านง็อก 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. (A) หรือ บ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (B) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=3) ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีตัวอักษรต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การหลั่งของ Cytochrome c จาก mitochondrial membrane ในเซลล์ Jurkat ที่บ่มร่วมกับสารสกัดใบฮว่านง็อก WE-FLP ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 600 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. (A) หรือ บ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 300 µg/ml เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (B) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=3) ข้อมูลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีตัวอักษรต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

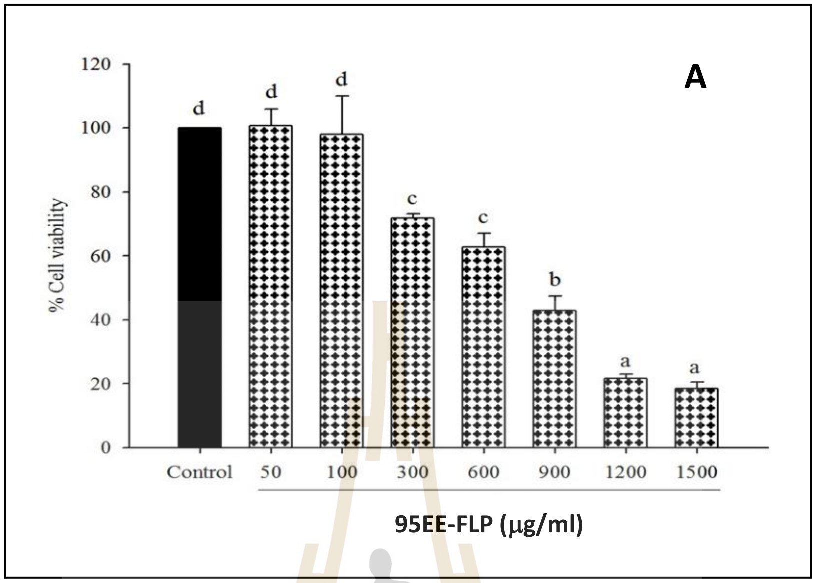
4.6.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดฮว่านง็อกใน *in vivo* CAM model

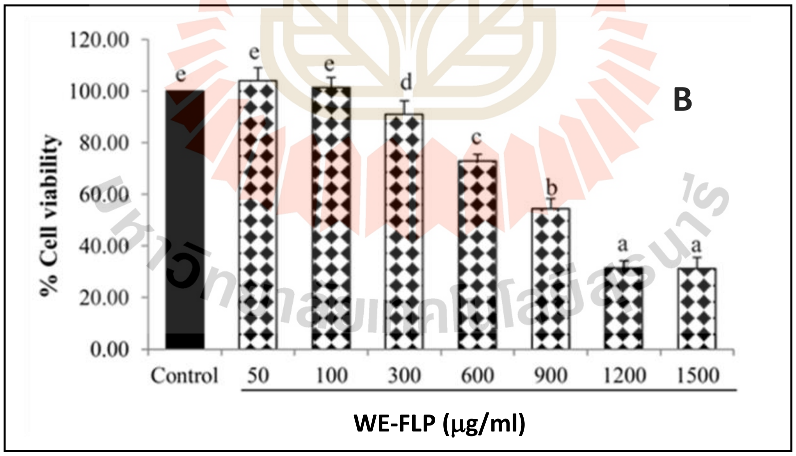
เนื่องจากทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ทั้งคู่ ด้วยประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างกันนัก งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเพิ่มเติมใน *in vivo* โดยตรวจสอบความสามารถของสารสกัดทั้งสองในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ผิวหนัง B16F10 โดยใช้ CAM model

4.6.3.1 การศึกษาความพิษโดยตรงของสารสกัดฮว่านง็อกต่อเซลล์มะเร็ง B16F10

ในการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นโดยเซลล์มะเร็งผิวหนัง B16F10 จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง B16F10 ผลการทดสอบในรูปที่ 4.21 A และ B พบว่า สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 300 µg/ml ขึ้นไป เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์ B16F10 เป็นระยะเวลา 24 ชม สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ B16F10 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และความเป็นพิษของสารสกัดทั้งสองต่อเซลล์ B16F10 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด สารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำ 50--100 µg/ml ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่สารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 300, 600, 900, 1,200 และ 1,500 µg/ml สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ B16F10 ประมาณ 26%, 36%, 57%, 78%, และ 82% ตามลำดับ (รูปที่ 4.21 A) และสารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้น 300, 600, 900, 1,200 และ 1,500 µg/ml สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ B16F10 ประมาณ 9%, 30%, 45%, 70%, และ 70% ตามลำดับ (รูปที่ 4.21 B) สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีค่า LC_{50} ต่อเซลล์ B16F10 เท่ากับ 836.56 $\pm$ 48.03 และ 995.59 $\pm$ 35.95 ตามลำดับ ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้สารสกัดทั้ง 2 ที่ความเข้มข้นสูงสุดไม่เกิน 300 µg/ml เพื่อใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์ B16F10 ใน CAM model ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

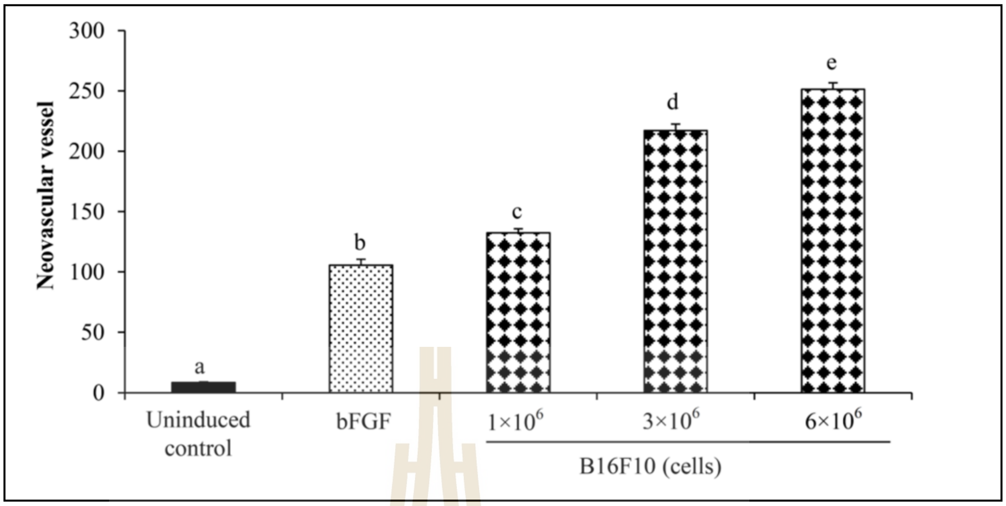




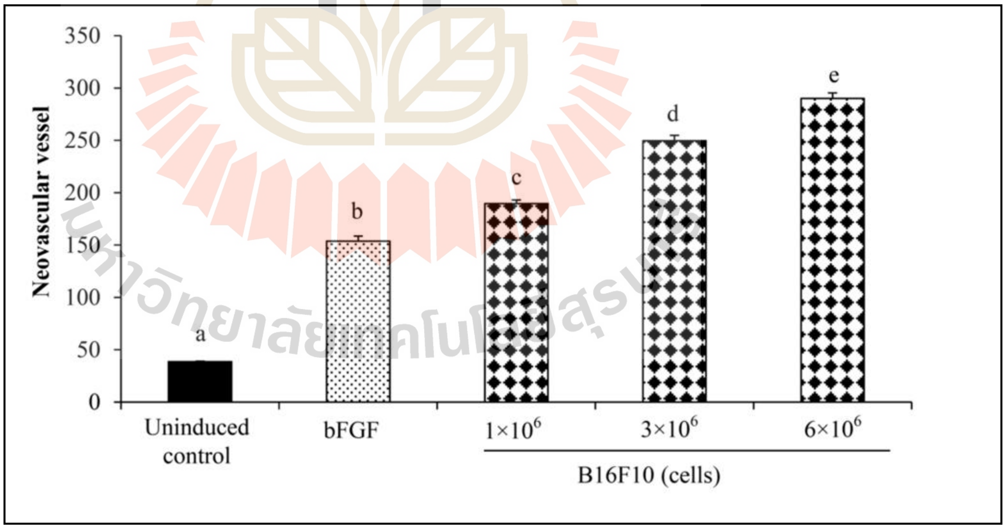
รูปที่ 4.21 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ B16F10 เมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆนาน 24 ชม ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระอย่างน้อย 3 ครั้ง กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.6.3.2 การชักนำการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM โดยเซลล์มะเร็ง B16F10

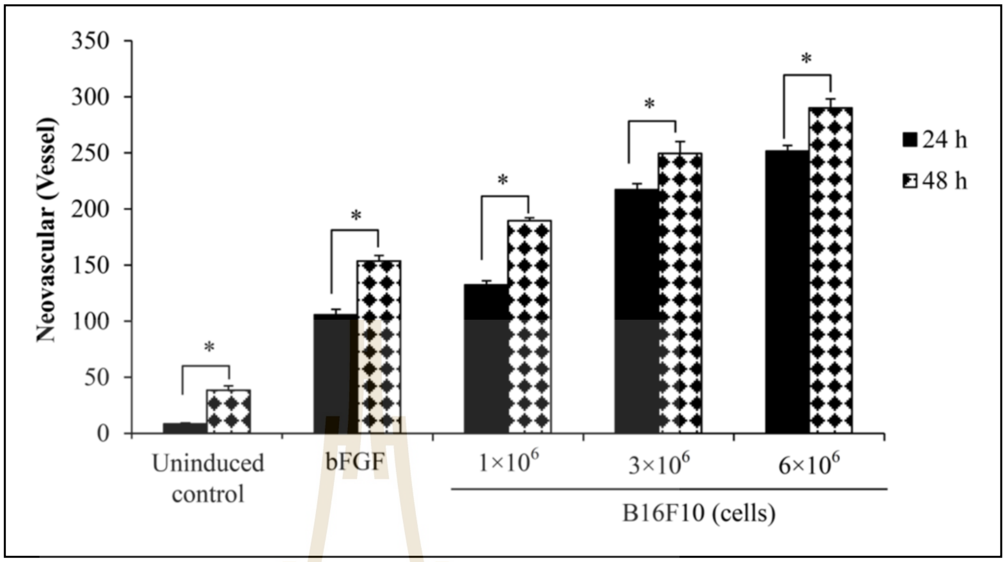
เพื่อพัฒนา CAM model ที่ใช้ในการทดลองผลของสารสกัดต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ถูกหนี่ยวนำโดยเซลล์มะเร็ง B16F10 งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความสามารถของเซลล์ B16F10 ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM การทดลองกระทำโดยปลูกถ่าย หรือ inoculate เซลล์ B16F10 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงใน CAM ก่อนทำการบ่มเป็นระยะเวลา 24 หรือ 48 ชม พร้อมนับจำนวนเส้นเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ใน CAM ภายหลังการบ่มของแต่ละช่วงเวลา เทียบกับ negative control ที่ไม่ได้ inoculate ด้วยเซลล์ B16F10 นอกจากนั้น งานวิจัยนี้ยังใช้ 100 ng/ml bFGF เป็น positive control เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่เพื่อเปรียบเทียบกับความสามารถของเซลล์มะเร็ง B16F10 ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ ผลการทดลอง (รูปที่ 4.22-4.23) แสดงว่า ภายหลังการ inoculate เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชม เซลล์มะเร็ง B16F10 สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่อย่างมากมาย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง การสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ถูกชักนำโดยเซลล์มะเร็งขึ้นกับความเข้มข้นของเซลล์ และระยะเวลาของการบ่ม จากรูปที่ 4.22 เมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle control CAM ที่ได้รับการ inoculate ด้วย B16F10 จำนวน $1x10^6$, $3x10^6$ และ $6x10^6$ เซลล์ บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชม มีการกระตุ้นให้เพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่มากถึง 16, 26 และ 30 เท่าตามลำดับ ($p< 0.05$) ในขณะที่การบ่มในระยะเวลา 48 ชม มีการกระตุ้นให้เพิ่มการสร้าง 5, 6, และ 8 เท่าตามลำดับ ($p< 0.05$) (รูปที่ 4.23) สำหรับ 100 ng/ml bFGF มีการเพิ่มของการสร้างเส้นเลือดใหม่ 12 และ 4 เท่าที่ระยะเวลา 24 ชม. และ 48 ชม. ตามลำดับ (รูปที่ 4.22-4.23) ดังนั้น เซลล์มะเร็ง B16F10 มีความสามารถสูงกว่า 100 ng/ml bFGF ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ทั้งที่ 24 และ 48 ชม.ใน CAM model อย่างไรก็ตาม แม้ปริมาณเส้นเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ที่ระยะเวลา 48 ชม มีปริมาณมากกว่าที่ 24 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ไม่ว่าเกิดจากการชักนำโดยเซลล์ B16F10 หรือ โดย bFGF (รูปที่ 4.24) แต่การใช้เซลล์มะเร็งจำนวนมาก คือเพิ่มปริมาณเซลล์ B16F10 เป็น 2 เท่าจาก $3x10^6$ เป็น $6x10^6$ เซลล์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่จาก 24 ชม. ถึง 48 ชม แต่อย่างใด ดังปริมาณ B16F10 $3x10^6$ และ $6x10^6$ เซลล์มีการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดใหม่จาก 24 ไป 48 ชม. ที่ทัดเทียมกันคือ 15.77 % และ 16.23% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ปริมาณต่ำกว่า คือ $1x10^6$ เซลล์ มีการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดใหม่จาก 24 ชม. ไป 48 ชม. 63.96 % ดังนั้น จึงเลือก $3x10^6$ เซลล์ของ B16F10 เป็นปริมาณสูงสุดพื่อใช้ในงานทดลองครั้งต่อไป



รูปที่ 4.22 การชักนำให้สร้างเส้นเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็ง B16F10 และ bFGF ใน CAM model เมื่อ ระยะเวลา 24 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA



รูปที่ 4.23 การชักนำให้สร้างเส้นเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็ง B16F10 และ bFGF ใน CAM model เมื่อ ระยะเวลา 48 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA



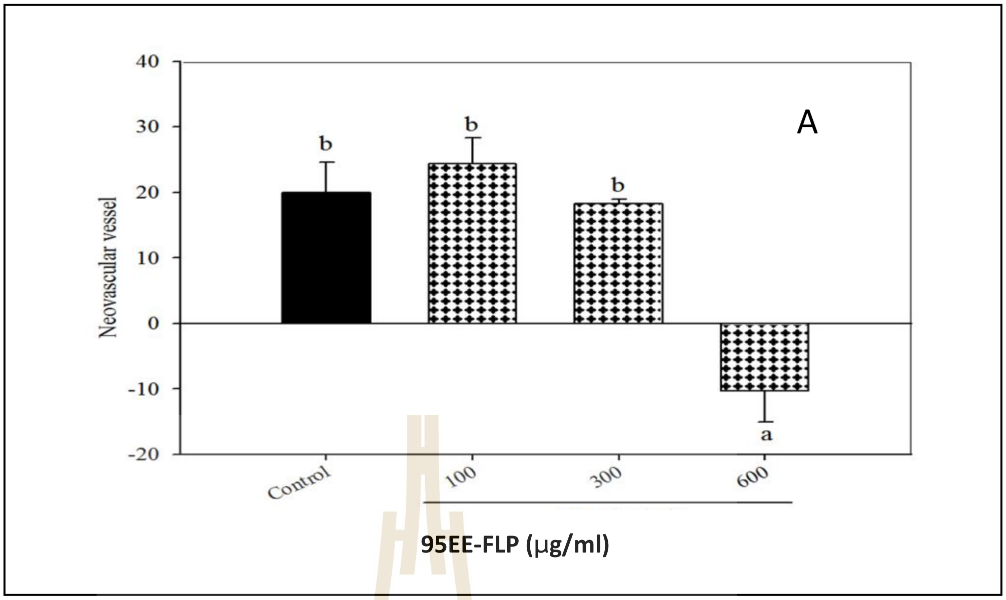
รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบการสร้างเส้นเลือดใหม่โดยเซลล์มะเร็ง B16F10 และ bFGF ใน CAM model ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน เครื่องหมาย * หมายถึงค่าที่ 24 และ 48 ชม. มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ p <0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Student's *t*-test

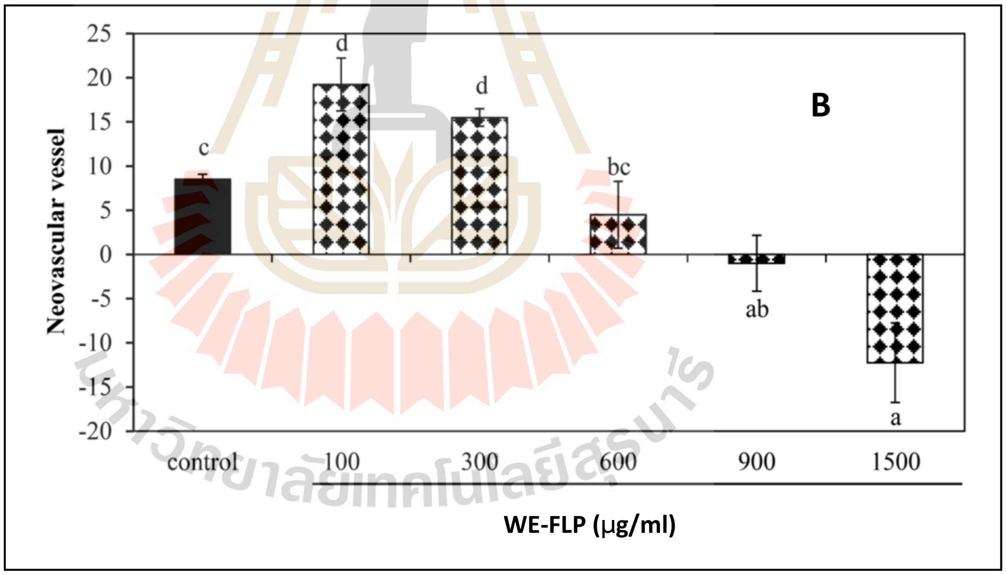
4.6.3.3 การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อ CAM

เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ใช้ใน CAM model ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติที่เกิดใน CAM (เมื่อไม่มีเซลล์มะเร็ง หรือ ไม่มี bFGF) ได้รับการประเมินที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชม. ผลการทดลองพบว่า ในระยะเวลา 24 ชม. ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติใน CAM อยู่ที่ 300 µg/ml และ 600 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ WE-FLPที่ความเข้มข้น 100-300 µg/ml สามารถเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (p< 0.05) (รูปที่ 4.25 A-B) ส่วนความเข้มข้นของสารสกัด 95EE-FLP ที่ 600 µg/ml และ WE-FLP ที่ 900 และ 1,500 µg/ml มีความเป็นพิษต่อ CAM เพราะนอกจากไม่มีการชักนำให้สร้างเส้นเลือดใหม่อย่างที่ควรเกิดขึ้นตามธรรมชาติ แต่จำนวนของเส้นเลือดใน CAM กลับมีค่าลดลง (p< 0.05) จากจำนวนเส้นเลือดเมื่อระยะเวลาเริ่มต้นของการทดลอง (ก่อนใส่สารสกัดลงใน CAM)

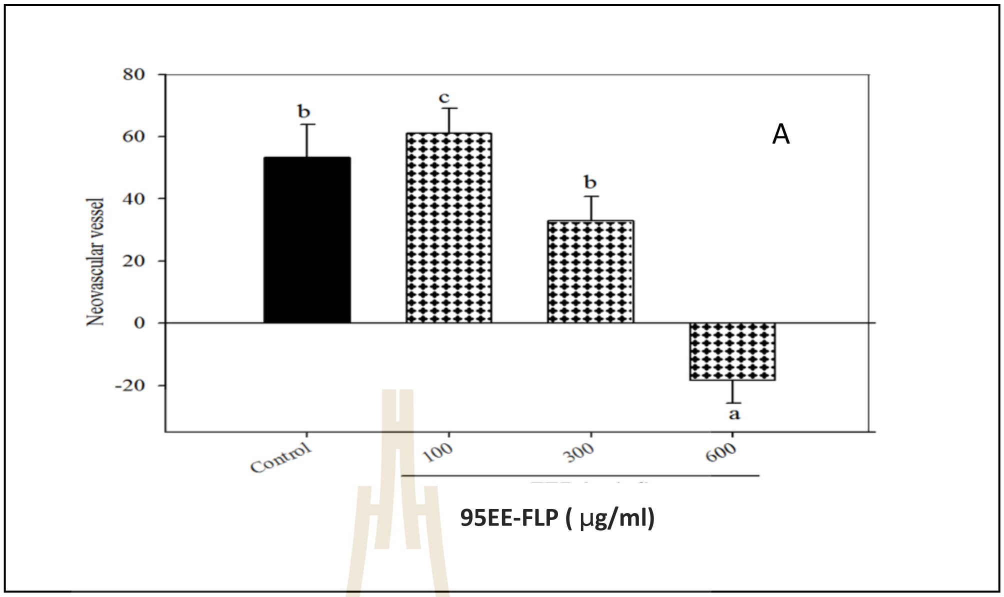
(ดังที่แสดงเป็นค่าติดลบในรูปที่ 4.25 A-B) แม้ที่ระยะเวลา 24 ชม. ความเข้มข้นที่ 100-300 µg/ml ของสารสกัด WE-FLP สามารถเพิ่มจำนวนเส้นเลือดที่เกิดขึ้นใหม่จากกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเวลาผ่านไปครบ 48 ชม. สารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบใด ๆ ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM เพราะจำนวนเส้นเลือดที่เกิดใหม่ในระยะเวลา 48 ชม. ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 600 µg/ml ของ WE-FLP มีจำนวนเส้นเลือดที่เกิดใหม่น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม 79.49% ส่วนสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ที่ระยะเวลา 48 ชม. สามารถเพิ่มปริมาณเส้นเลือดใหม่สูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 21% ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นที่สูงของสารสกัดทั้งสอง (600 µg/ml 95EE-FLP และ 900 และ 1,500 µg/ml WE-FLP) ยังคงแสดงความเป็นพิษต่อ CAM (รูปที่ 4.26 A-B) สิ่งที่น่าสังเกตคือ จำนวนเส้นเลือดใหม่ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทั้งสองที่ความเข้มข้น 100-300 µg/ml ที่ 48 ชม. มีปริมาณสูงกว่าที่ 24 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่ 48 ชม. มีการเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่ประมาณ 1.9-2.3 เท่า สำหรับ 95EE-FLP และประมาณ 2.5-3.0 เท่าสำหรับ WE-FLP จากที่ 24 ชม.ซึ่งใกล้เคียงกับการเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติที่พบในกลุ่มควบคุมซึ่งมีการสร้างเส้นเลือดใหม่เพิ่มขึ้นจากที่ 24 ชม. ประมาณ 2.6-4 เท่า (รูปที่ 4.27 A-B) ถึงแม้การได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นสูง (600 µg/ml 95EE-FLP, 900 และ 1,500 µg/ml WE-FLP) จะมีความเป็นพิษต่อ CAM โดยเส้นเลือดที่สร้างขึ้นใหม่มีปริมาณลดลงจากระยะเวลาเริ่มต้น ทั้งที่ 24 และ 48 ชม. แต่ก็ไม่ส่งผลให้เกิดการตายของตัวอ่อนในไข่ไก่แต่อย่างใด ดังนั้น จากผลการทดลองทั้งหมดในส่วนนี้ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นไม่เกิน 300 µg/ml เพื่อใช้ในงานทดลองต่อไป เพราะเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM model สำหรับสารสกัดทั้งสองทั้งที่ 24 และ 48 ชม.

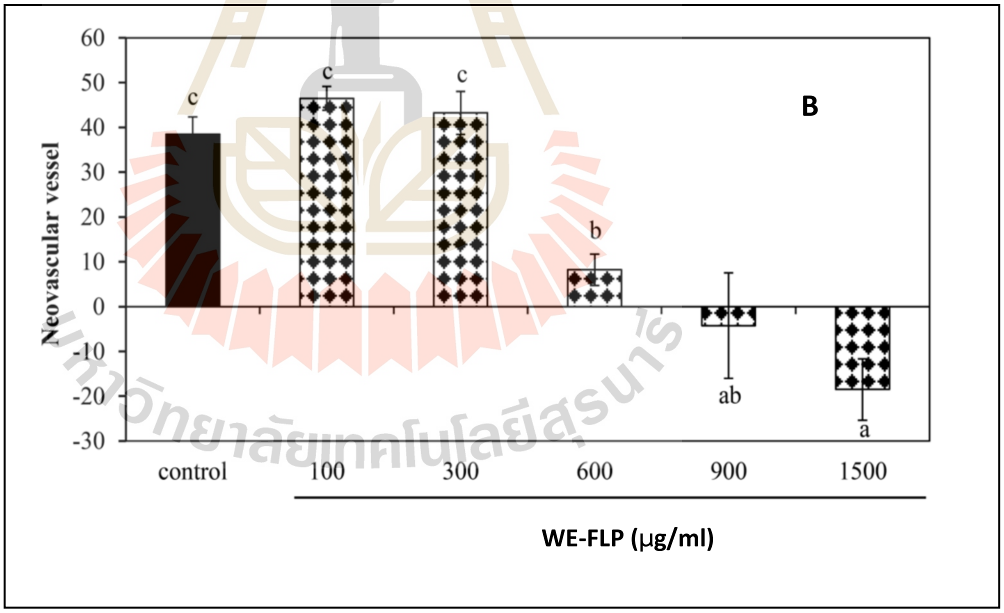
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี





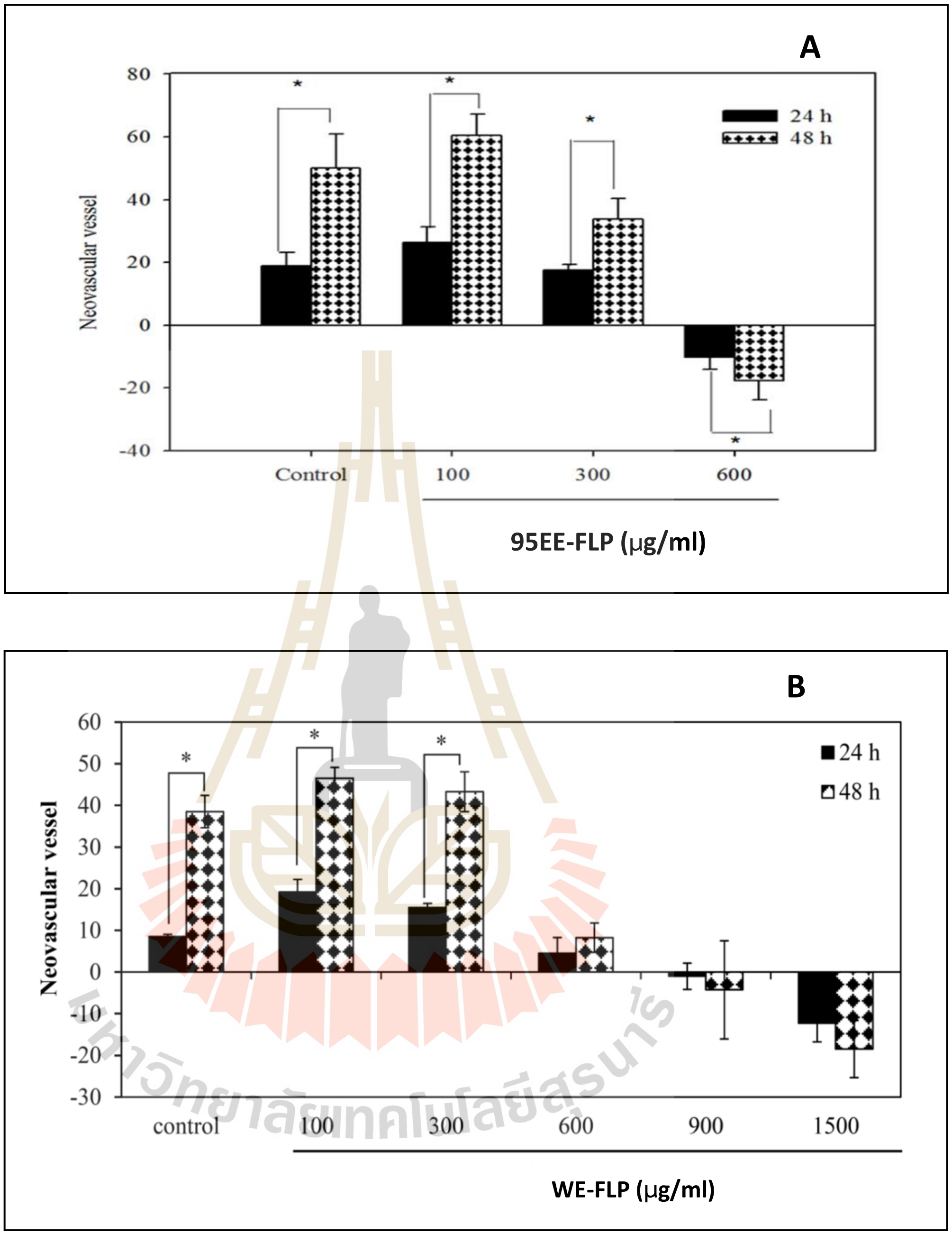
รูปที่ 4.25 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM ที่ 24 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$





มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 4.26 ผลของสารสกัด 95EE-F:P (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM ที่ 48 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

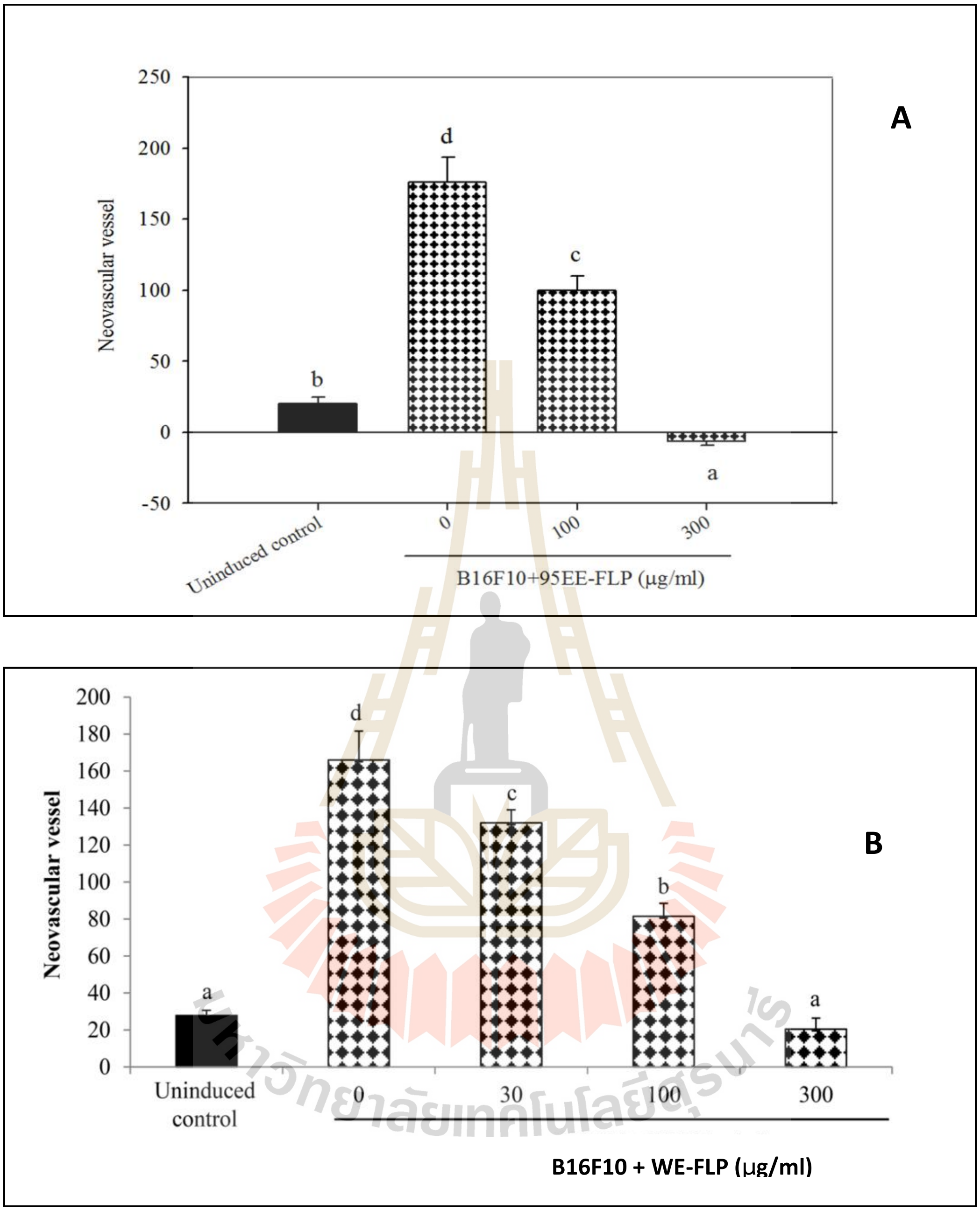


รูปที่ 4.27 เปรียบเทียบผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM ระหว่าง 24 และ 48 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=4) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน เครื่องหมาย * หมายถึงค่าที่ 24 และ 48 ชม. มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ด้วย Student’s *t*-test

4.6.3.4 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งโดยสารสกัดฮว่านง็อก

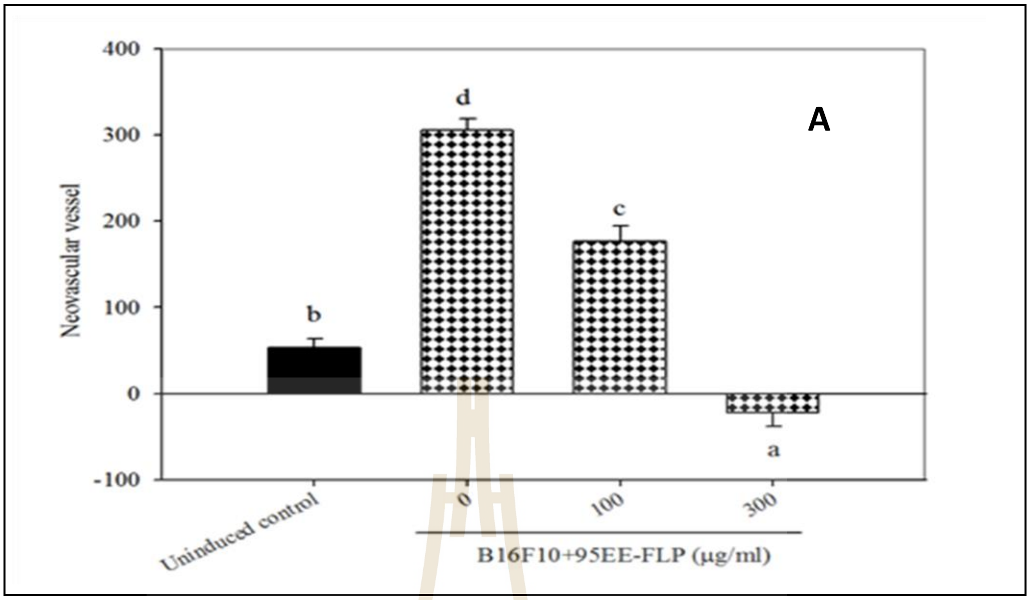
การตรวจสอบความสามารถของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง กระทำโดยบ่มเซลล์มะเร็ง B16F10 ใน CAM เมื่อมี หรือ ไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และประเมินการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM ภายหลังการบ่มที่ระยะเวลา 24 หรือ 48 ชม. ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดฮว่านง็อก ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP มีฤทธ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 ได้อย่างมีนัยสำคัญใน CAM ทั้งที่ 24 และ 48 ชม. เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีเซลล์ B16F10 แต่ไม่ได้บ่มร่วมกับสารสกัด ($p < 0.05$) และการยับยั้งแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด (รูปที่ 4.28 -4.29) จากรูปที่ 4.28 เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็ง B16F10 เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชม สารสกัด 95EE-FLP ที่ 100 µg/ml ลดการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำโดยเซลล์ B16F10 ได้ 40.55% และ 42.85% ตามลำดับ ส่วนสารสกัด WE-FLP เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชม. สามารถลด ได้ 20.5%, 50.9% และ 87.9% ที่ความเข้มข้น 30, 100 และ 300 µg/ml ตามลำดับ และเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 48 ชม. สารสกัด WE-FLP สามารถลดการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งได้ 14.7%, 49.8% และ 90.8% ที่ความเข้มข้น 30, 100 และ 300 µg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 4.29) ทั้งนี้ ที่ระยะเวลา 48 ชม. เซลล์ B16F10 ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 30 และ 100 µg/ml ยังคงความสามารถในการสร้างเส้นเลือดใหม่ให้เพิ่มขึ้นจาก 24 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เซลล์ B16F10 ไม่ได้รับสารสกัด และสิ่งที่น่าสนใจคือ สารสกัดที่ความเข้มข้น 300 µg/ml ของสารสกัดทั้งสอง สามารถยับยั้งอิทธิพลการชักนำให้สร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งได้มากกว่าหรือเท่ากับ 100% ดังการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์ B16F10 ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 300 µg/ml มีค่าเทียบเท่า (WE-FLP ใน 24 ชม. รูปที่ 4.28 B) หรือ แม้แต่มีค่าต่ำกว่า (WE-FLP ใน 48 ชม. รูปที่ 4.29 B และ 95EE-FLP ที่ 24 และ 48 ชม. รูปที่ 4.28 A, 4.29 A) การสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติที่เกิดใน CAM ที่ไม่ได้ถูกชักนำโดยเซลล์มะเร็ง (uninduced control ที่ไม่ได้ inoculate ด้วยเซลล์มะเร็ง B16F10) (รูปที่ 4.28-4.29) อีกประเด็นที่น่าสนใจคือ เปอร์เซ็นต์การเพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ 48 ชม. จาก 24 ชม.มีปริมาณผกผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ดังสารสกัด WE-FLPที่ความเข้มข้น 100 และ 300 µg/ml สามารถยับยั้งเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดใหม่จาก 24 ไป 48 ชม 50%, และ 97.5% ตามลำดับ ($p< 0.05$) (รูปที่ 4.31 B) ส่วนสารสกัด 95EE-FLP ที่ 300 µg/ml นอกจากไม่มีการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ 48 ชมเพิ่มขึ้นจากเดิมที่ 24 ชม. แล้วยังลดปริมาณเส้นเลือดให้ต่ำกว่าระยะเวลาที่จุดเริ่มต้นในการทดลอง (รูปที่ 4.31 A)

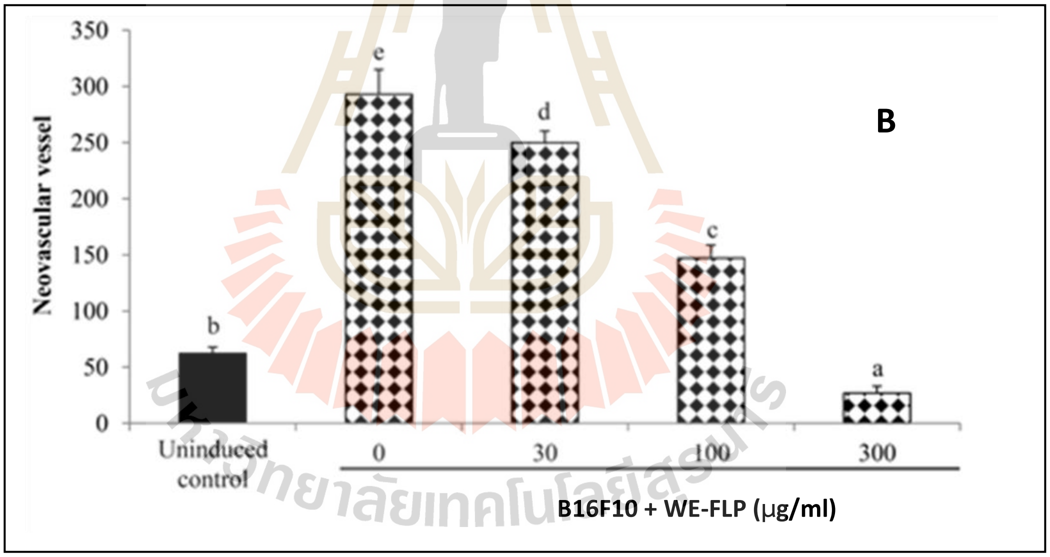
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



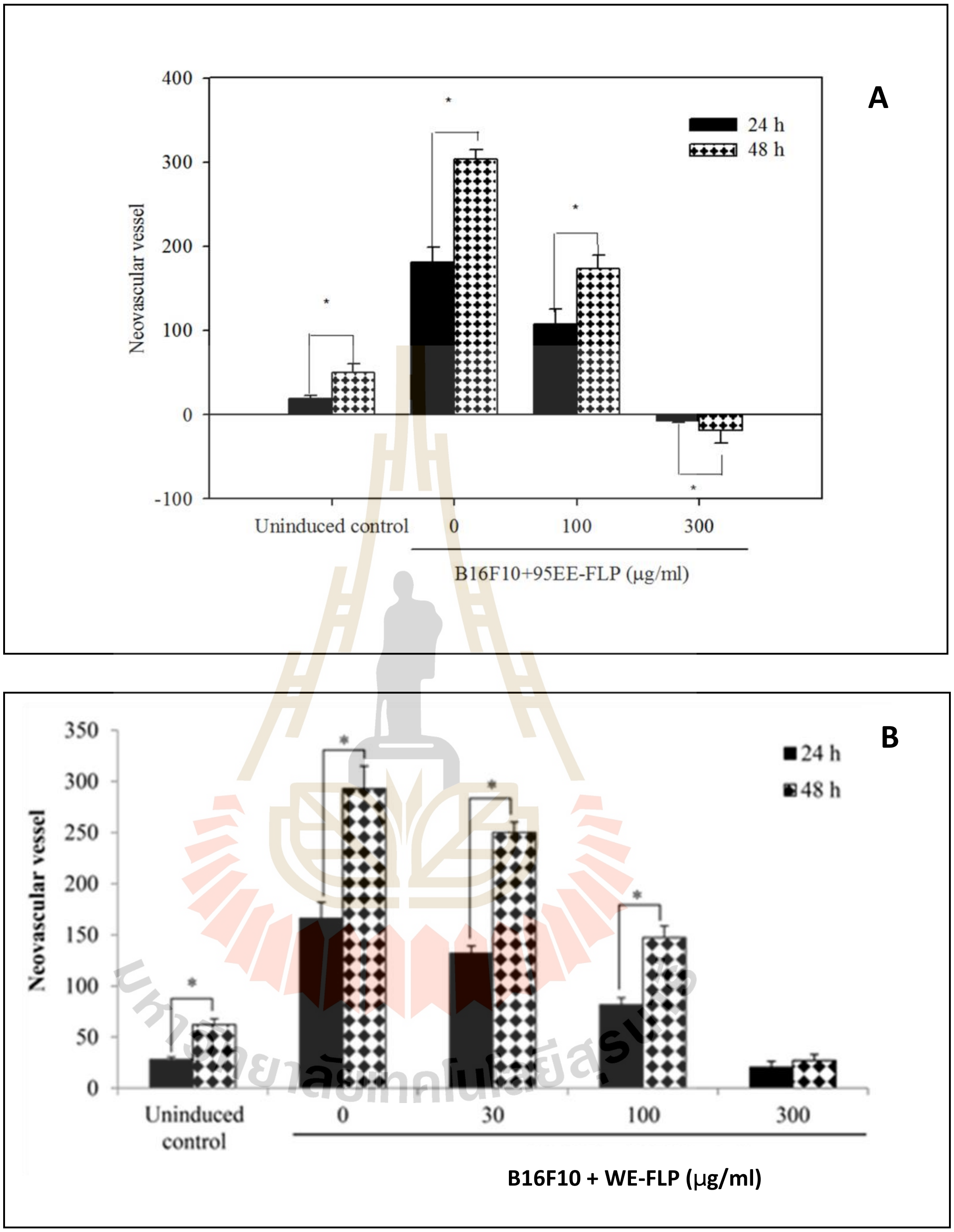
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 4.28 การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 โดยสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ใน CAM model ที่ระยะเวลา 24 ชม. . ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=6) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

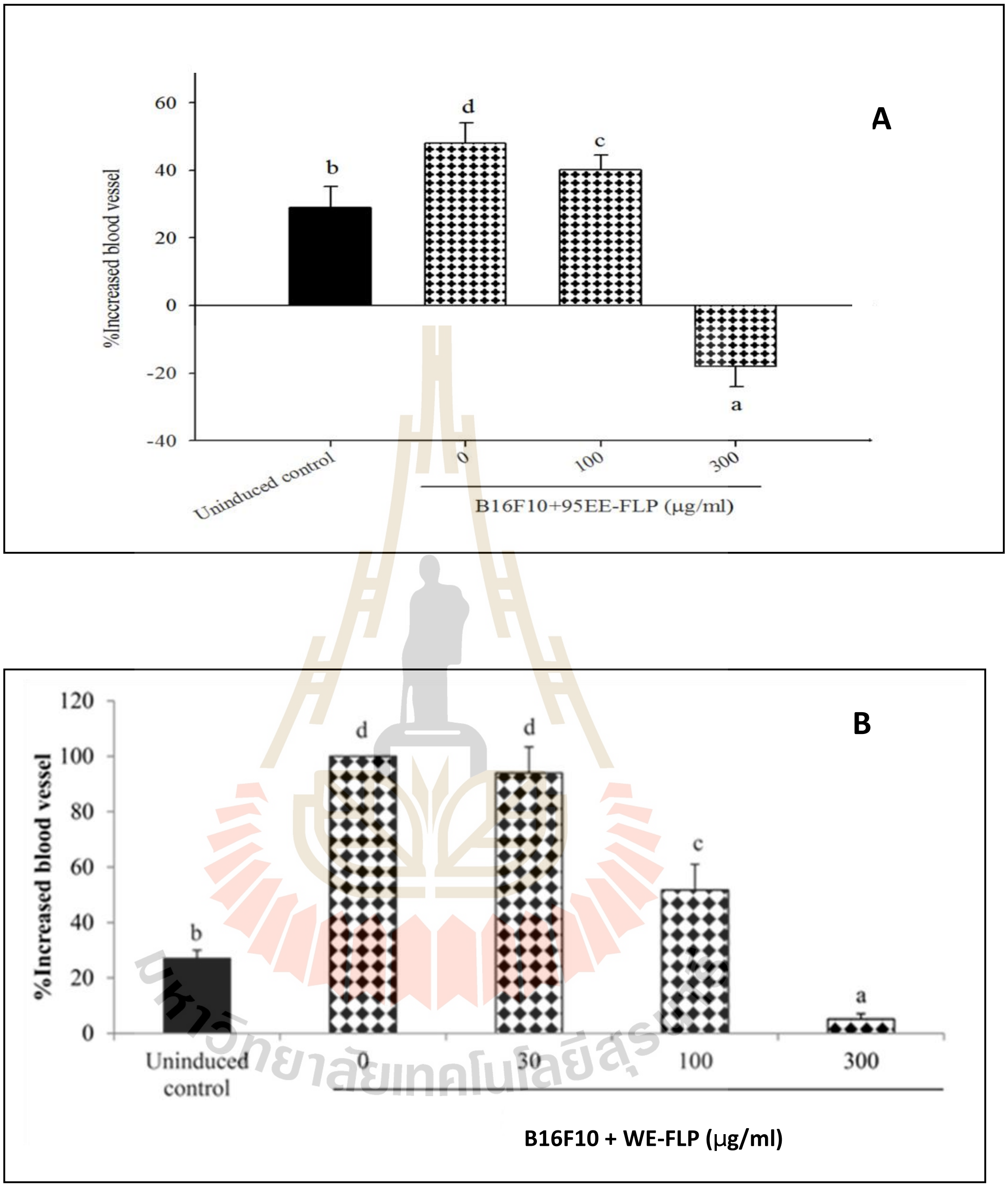




รูปที่ 4.29 การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 โดยสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ใน CAM model ที่ระยะเวลา 48 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=6) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.30 เปรียบเทียบผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 ใน CAM ระหว่าง 24 และ 48 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=6) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน เครื่องหมาย * หมายถึงค่าที่ 24 และ 48 ชม. มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ด้วย Student’s *t*-test



รูปที่ 4.31 ผลของสารสกัด 95EE-FLP (A) และ WE-FLP (B) ต่อการเพิ่มของจำนวนเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการชักนำของเซลล์มะเร็ง B16F10 จากระยะเวลา 24 ถึง 48 ชม ใน CAM model ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n=6) และเป็นตัวแทนของการทดลองอิสระจำนวน 2 ครั้งที่ให้ผลในทิศทางเดียวกัน กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

4.6.3.5 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดฮว่านง็อก

ปัญหาหนึ่งสำหรับผู้ใช้สมุนไพร คือความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยของการใช้พืชสมุนไพรต่อเนื่องเป็นระยะยาว โดยเฉพาะความกังวลเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดมะเร็ง เนื่องจากสารก่อมะเร็งส่วนใหญ่มักเป็นสารก่อกลายพันธุ์ด้วย งานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีทดสอบพิษระยะยาวเบื้องต้น โดยทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดฮว่านง็อกด้วยวิธีของ Ames โดยเลือกใช้แบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่มี และ ไม่มี S9 mix ในการแปลผลฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ใช้ค่าตัวชี้วัดการก่อกลายพันธุ์ (mutagenic index; MI) ซึ่งหากตัวชี้วัดการก่อกลายพันธุ์ หรือ MI มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 2 แสดงว่าสารนั้นมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Hakura et al., 2005) ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดฮว่านว็อกในตารางที่ 4.3 ชี้ชัดว่า ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 150, 300 และ 600 µg/plate ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในการทดสอบ ทั้งในสภาวะที่ไม่มี หรือ มี S9 mix เนื่องจากทุกความเข้มข้นของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP และ metabolite product ของสารสกัดทั้งสองไม่มีค่า MI เท่ากับหรือมากกว่า 2 จากตารางที่ 4.3 สารสกัด 95EE-FLP มีค่า MI อยู่ที่ 0.73-1.2 ในขณะที่ WE-FLP มีค่า MI อยู่ที่ 0.74-1.15 ซึ่งต่างจากกลุ่มสารที่ใช้เป็น positive control แสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์อย่างชัดเจนด้วยค่า MI ที่สูงอย่างที่ควรจะเป็น คือ ในสภาวะที่ไม่มี S-9 mix, 2-NF (10 µg/plate) มีค่า MI ต่อ TA98 สูงถึง 50.6, sodium azide (10 µg/plate) มีค่า MI 13.56 ใน TA100 ส่วนในสภาวะที่มี S9 mix 2-AA (2.5 µg/plate) ให้ค่า MI สูงถึง 37.74 และ 41.88 ใน TA98 และ TA 100 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ภายใต้สภาวะที่มี หรือ ไม่มี S9 mix

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยโคโลนีกลายพันธุ์ย้อนกลับ (ค่าเฉลี่ย±SD), (MI=Mutagenic Index)			
	S.typhimurium สายพันธุ์ TA98		*S.typhimurium* สายพันธุ์ TA100	
	ไม่มี S9 mix	มี S9 mix	ไม่มี S9 mix	มี S9 mix
2-NF(10μg/plate)[PC]	1,012±225,(50.6)	-	-	-
Sodium azide (10μg/plate)[PC]	-	-	1,587±7,(13.56)	-
2-AA(2.5μg/plate)[PC]	-	903±28,(34.74)	-	4,691±473,(41.88)
กลุ่มควบคุม[NC]	20±5	26±8	121±10	112±9
95%EFL (150μg/plate)	24±2, (1.20)	25±5, (0.96)	131±29, (1.08)	115±11, (1.03)
95%EFL (300μg/plate)	20±4, (1.00)	26±4, (1.00)	105±10, (0.87)	92±7, (0.82)
95%EFL (600μg/plate)	20±3, (1.00)	22±1, (0.85)	108±23, (0.89)	82±20, (0.73)
กลุ่มควบคุม[NC]	22±2	24±5	117±6	111±5
WF95%EFL (150μg/plate)	18±3, (0.82)	25±3, (1.04)	86±16, (0.74)	98±16, (0.88)
WF95%EFL (300μg/plate)	20±4, (0.90)	20±3, (0.83)	111.00±30.05, (0.95)	117±8, (1.05)
WF95%EFL (600μg/plate)	21±4, (0.95)	24±4, (1.00)	134.67±43.82, (1.15)	126±30, (1.14)

PC = positive control, NC = negative control

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

การวิจารณ์

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk หรือ ฮว่านง็อก เป็นพืชในประเทศสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนามที่ถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยกว่า 30 ปี และถูกจัดเป็นพืชสมุนไพรรุ่นใหม่ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทั้งในประชาชนชาวไทยและชาวเวียดนาม โดยเฉพาะชาวเวียดนามจัดฮว่านง็อกเป็นพืชมหัศจรรย์ที่ปลูกตามบ้านเรือน นอกเหนือจากการปลูกฮว่านง็อกเพื่อใช้เป็นพืชประดับ ใบสดของฮว่านง็อกถูกนำมาใช้ประกอบอาหาร หรือเคี้ยวกินเพื่อใช้รักษาโรคต่าง ๆ ทั้งในคนและในสัตว์ เนื่องจากสรรพคุณของฮว่านง็อกมีมากมายที่เป็นที่โจษจันในหมู่ผู้บริโภค จึงมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับส่วนประกอบของสารพฤกษเคมี และคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในด้านต่าง ๆ ของใบฮว่านง็อก เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเบาหวาน ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยลดความดัน รวมทั้งการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ (Dieu et al., 2005; Dieu et al., 2008; Giang et al., 2005; Chayarop et al., 2011; Khonsung et al., 2011, Pamok et al., 2012) แต่อย่างไรก็ดี งานวิจัยที่สนับสนุนฤทธิ์ทางชีวภาพของฮว่านง็อกยังมีปริมาณน้อยมากในแต่ละด้าน โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งเป็นสรรพคุณที่ถูกกล่าวอ้างถึงมากที่สุดโดยผู้ขาย และผู้บริโภคในประเทศไทย ในปัจจุบัน ฤทธิ์ทางชีวภาพของฮว่านง็อกมีการศึกษาในปริมาณจำกัด ไม่เกิน 1-2 รายงานในแต่ละด้าน นอกจากนั้น ยังไม่มีงานวิจัยเชิงลึกเกี่ยวข้องกับกลไกของการออกฤทธิ์แต่อย่างใด โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของฮว่านง็อกเพิ่มเติมเพื่อต่อยอด โดยการเปรียบเทียบส่วนประกอบสารพฤกษเคมีของใบฮว่านง็อกที่สกัดจากใบสด และใบแห้ง สารสกัดที่ละลายใน ethanol เทียบกับสารสกัดที่ละลายได้ในน้ำ ทั้งนี้ งานวิจัยนี้หลีกเลี่ยงการใช้สารละลายที่มีปัญหาเกี่ยวกับความปลอดภัยเช่น methanol, chloroform, ethyl acetate ในการเตรียมสารสกัดเหมือนงานวิจัยอื่น (Ngyen and Eun, 2011; Giang et al., 2005; Nam, 2003) เพื่อพยายามให้ใกล้เคียงกับสภาวะความเป็นจริงของการใช้พืชสมุนไพรไทยทั่วไปที่นิยมบริโภคสด หรือ ต้มกับน้ำเคี่ยวให้เข้ม หรือในบางกรณีเป็นยาดองกับเหล้า (ethanol) สารสกัดที่เตรียมได้ถูกทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามที่เคยมีการรายงานมา พร้อมทั้งขยายการทดสอบเพิ่มเติมถึงความสามารถของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์ที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด ศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ *in vitro* ผ่านการยับยั้ง NO, iNOS, COX-2 และ pro-inflammatory cytokine TNF-α และ IL-6 โดยใช้โมเดล ของ RAW264.7 เซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ส่วนฤทธิ์ต้านมะเร็งศึกษาความสามารถของฮว่านง็อกในการทำลายมะเร็งสายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ *in vitro* พร้อมทั้งตรวจสอบกลไกการทำลายเซลล์มะเร็งของสารสกัดฮว่านง็อกว่าเกิดผ่านกระบวนการ apoptosis หรือไม่ในเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ที่มีความไวต่อการถูกทำลายมากที่สุด นอกจากนั้น

ยังใช้ *in vivo* CAM model เพื่อตรวจสอบกลไกการทำลายเซลล์มะเร็งของฮว่านง็อกว่าสามารถเกิดผ่านการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ ซึ่งล้วนแต่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อกใช้ทั้งการเตรียมจากใบสด นำมาปั่นให้ละเอียดใน blender เพื่อเป็นการเลียนแบบการบริโภคฮว่านง็อกตามธรรมชาติ ที่นำมาเคี้ยวรับประทานสด เปรียบเทียบกับการเตรียมสารสกัดจากใบที่ตากแห้งที่นำมาป่นให้ละเอียดก่อนหมักกับตัวทำละลาย ซึ่งเป็นการเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยตามขั้นตอนมาตรฐานที่นิยมทำกันทั่วไป เพราะพืชสมุนไพรที่ตากแห้งสามารถเก็บได้นาน นำมาแปรรูปเพื่อบรรจุแคปซูล หรือนำมาสกัดให้เข้มข้นได้ต่อไป สำหรับโครงการวิจัยนี้ ไม่ว่าจะเตรียมสารสกัดจากใบสด หรือ ใบแห้งของฮว่านง็อก ในขั้นตอนสุดท้าย ทำสารสกัดให้เข้มข้นขึ้นด้วยการระเหยภายใต้สุญญากาศ ด้วยเครื่อง rotary evaporator. และทำให้เป็นผงด้วยวิธีการแช่แข็งและทำให้แห้งด้วยการใช้ lyophilizer สำหรับสารละลายที่ใช้ในการสกัด เลือกใช้ 95%ethanol เป็นตัวทำละลาย เพราะ 95% ethanol เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารจากพืชสมุนไพรได้หลากหลายชนิด ในเชิงปฏิบัติ ethanol จัดเป็น “ตัวทำละลายสากล (universal solvent)” เพราะสามารถสกัดสารออกได้แทบทุกชนิด ทั้งสารที่มีขั้ว (polar) และ ไม่มีขั้ว (non-polar) โดยเฉพาะสกัดกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี คือมี polar สูง (very polar) polar ปานกลาง (neutral) สารที่มีฤทธิ์เป็นกรด เป็นด่าง กรดอมิโน nucleotides น้ำตาล และ polysaccharides ต่าง ๆ สืบเนื่องจากโครงสร้างของ ethanol มีทั้งหมู่ polar และ non-polar หมู่ polar ที่เป็น hydroxyl ในโมเลกุลของ ethanol สามารถสร้างพันธะ hydrogen (hydrogen bond) ในขณะที่มีหมู่ alkyl ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น non-polar ใน ethanol ช่วยดึงสารที่มีลักษณะเป็นหยดน้ำมัน (grease) และกลุ่มสารอื่นที่เป็น non-polar ออกจากพืชสมุนไพรได้ดี (http://www.researchgate.net/profile/ying_li58; http://www.easychem.com. au/production. of materials/renewable.ethanol/ethanol.as a solvent; http://community. baredofstudies. org/870/ chemistry/228126/why do some chemicals-dissolve-ethanol.html) เพื่อการพัฒนาวิธีการสกัดสารที่เหมาะสม นอกจากการสกัดด้วย 95% ethanol งานวิจัยนี้ยังทดลองสกัดด้วย 80% ethanol ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติของ 95% ethanol ที่สามารถดึงกลุ่มสารต่าง ๆ ออกมาได้สูง รวมทั้งดึงพวก wax และไขมันในพืช จึงส่งผลให้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อผ่านขั้นตอนของ rotary evaporation สารสกัดมีลักษณะเหนียวหนืด และติดกับขวดภาชนะที่ใช้ในเครื่อง มีความลำบากในการขูดสารออกมาได้หมด งานวิจัยนี้ จึงได้ทดลองการสกัดโดยเพิ่มปริมาณน้ำอีก 15% ใน ethanol คือสกัดด้วย 80% ethanol ควบคู่กับการสกัดด้วย 95% ethanol ทั้งนี้เพื่อช่วยลดความหนืดเหนียวของสารสกัดเมื่อทำให้เข้มข้น ช่วยลดปัญหาการติดกับขวดที่ใช้กับเครื่อง rotary evaporator ด้วยเหตุผลเดียวกัน การสกัดจากใบแห้ง ใช้วิธีการหมัก (maceration) ล่วงหน้าในสารละลาย 95% ethanol หรือ 80% ethanol เป็นเวลา 24 ชม ก่อนเทสารสกัดออก และเติม

สารละลายใหม่เพื่อทำการสกัดต่อรวมกันทั้งหมด 3 รอบ ซึ่งสามารถทราบว่าการสกัดด้วยวิธี maceration พอเพียง โดยสังเกตได้จากสีของสารละลายที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น อันเป็นแนวปฏิบัติตามปกติทั่วไปของ maceration สำหรับการเตรียมสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่ละลายน้ำได้ ในการทดลองเบื้องต้น (preliminary study) พบว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบสด หรือ ใบแห้งของฮว่านง็อกที่ใช้น้ำในการสกัด เมื่อทำให้เข้มข้นขึ้นและทำให้เป็นผงหลังผ่านขั้นตอนของ vacuum rotary evaporation และ lyophilization ตามลำดับ สารสกัดที่ได้ มีปัญหาในการละลายน้ำ ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหาเรื่องการละลาย งานวิจัยนี้จึงได้เพิ่มขั้นตอนของการสกัดด้วยการกำจัดกลุ่มสารที่ไม่ละลายน้ำออกด้วยการแยกส่วน (fraction) โดยเริ่มต้นจากสารสกัดที่ได้จาก 95% ethanol (ทั้งที่สกัดจากใบสด หรือ ใบแห้ง) นำมากำจัดกลุ่มสารประเภท wax ไขมัน และ chlorophyll ซึ่งไม่ละลายน้ำออกก่อน โดยสกัดกลุ่มสารเหล่านี้แยกออกจากชั้นน้ำให้อยู่ในชั้นของ hexane ด้วยการใช้ separatory funnel ซึ่งมี hexane : น้ำในอัตราส่วน 1:1 และแยกเอาเฉพาะชั้นที่เป็นน้ำออกมา (ที่ขจัดกลุ่มสารที่ไม่ละลายน้ำออกแล้ว) เพื่อเตรียมสารสกัดที่สามารถละลายน้ำได้ต่อไป ซึ่งผลของการสกัดใบฮว่านง็อกด้วยวิธีการต่าง ๆ แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณสุทธิ หรือ % yield ในตารางที่ 3.1 แสดงว่าสารสกัดจากใบสดไม่ว่าจะใช้ 95% หรือ 80% ethanol มี % yield ที่ค่อนข้างต่ำ ไม่ถึง 5% ถึงแม้การใช้ 80% ethanol ช่วยบรรเทาความหนืดเหนียวและการติดของสารกับขวดได้บ้างเมื่อเทียบกับ 95% ethanol แต่ไม่ได้ปรับปรุงในการเพิ่ม % yield แต่อย่างใด ซึ่งแตกต่างจากการสกัดจากใบแห้งด้วยวิธีการ maceration ที่การหมักด้วยการใช้ 80% ethanol ช่วยเพิ่ม % yield เมื่อเทียบกับการหมักด้วย 95% ethanol สาเหตุของความแตกต่างที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของ % yield ในกรณีของการใช้ใบสด เมื่อใช้ 80% ethanol ยังไม่ทราบแน่ชัด เพราะสารสกัดที่ได้จาก evaporation เมื่อใช้สารละลาย 80% ethanol ไม่มีความเหนียวหนืดมากเหมือนกรณีของการสกัดด้วย 95% ethanol และยังคงมีปริมาณน้ำเหลืออยู่ซึ่งสามารถเทออกจากขวดได้ง่ายกว่า เมื่อทำให้เป็นผงแห้งด้วยกระบวนการ lyophylization ลักษณะของสารสกัดก็มีความร่วนมากกว่าผงที่ได้จากการสกัดด้วย 95% ethanol ดังนั้น ในกรณีที่สกัดด้วยใบสด % yield ที่ได้โดยใช้ 80% ethanol จึงควรสูงกว่าการสกัดด้วย 95% ethanol เหมือนดังในกรณีของใบแห้ง อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยคิดว่า % yield ที่ได้ อาจเกิดจากความผิดพลาดของการชั่งน้ำหนักของสารสกัด ที่ไม่สามารถหาน้ำหนักที่ถูกต้องได้ เพราะลักษณะเหนียวหนืดของสารสกัด และมีคุณสมบัติคล้ายสามารถดูดความชื้นจากอากาศได้อย่างรวดเร็วในขณะที่ชั่งน้ำหนัก จึงทำให้ % yield ที่คำนวณได้คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง สำหรับการเตรียมสารสกัดที่สามารถละลายน้ำไม่ว่าจะเตรียมจากใบสด หรือ ใบแห้ง มี % yield สูงกว่ามาก คือมีค่ามากกว่า 80% ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะการเตรียมสารสกัดที่ละลายน้ำได้นี้ เริ่มต้นจากการนำผงแห้งของสารที่สกัดเรียบร้อยแล้วจาก 95% ethanol มาทำการแยกส่วนอีกทอดหนึ่งเท่านั้นด้วยการใช้ separatory funnel มิได้ตั้งต้นจากการใช้ใบตั้งแต่แรก

จึงไม่เกิดการสูญเสียในขั้นตอนต่าง ๆ มากนัก โดยเฉพาะลักษณะสารสกัดที่ละลายน้ำได้ไม่ได้มีลักษณะเหนียวหนืด ทำให้ไม่ติดในภาชนะต่าง ๆ มากนัก

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีในสารสกัดที่เตรียมด้วยวิธีการแตกต่างกันพบว่า 1) ทุกสารสกัดมีกลุ่มสาร phenolics และ flavonoids 2) สารสกัดที่เตรียมจากใบสดมีปริมาณ TPC และ TFC สูงกว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดที่ละลายได้ใน ethanol หรือ สารสกัดที่ละลายได้ในน้ำ 3) การใช้ 95% ethanol หรือ 80% ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร ไม่มีผลต่อความแตกต่างของปริมาณ phenolics และ flavonoids .ในสารที่สกัดได้ 4) สารสกัดส่วนที่ละลายน้ำที่เตรียมจากใบสด (WE-FLP) มีปริมาณ phenolics และ flavonoids สูงสุด ส่วนสารสกัดที่มีปริมาณ phenolics และ flavonoids ต่ำสุดได้จากสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง และใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลาย (80EE-DLP) (รูปที่ 4.1-4.2) อนึ่ง ในงานวิจัยนี้ ไม่ได้มีข้อมูลของสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้งและใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากใช้สารในส่วนนี้ทั้งหมดในการเตรียมสารสกัด WE-DLP ซึ่งเป็นสารสกัดที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากใบแห้งและมี 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย ผลวิจัยส่วนนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ (Ngyen และ Eun , 2011;Giang et al., 2005) ซึ่งรายงานว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดคือ methanol, ethanol, acetone, น้ำ, ethyl acetate และ butanol ล้วนแต่อุดมไปด้วยสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids ดังนั้น งานวิจัยนี้นอกจากช่วยยืนยันว่าใบฮว่านง็อกอุดมด้วยสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids แล้ว ยังแสดงว่า สารสกัดที่เตรียมจากใบสดมีปริมาณของสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids สูงกว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง ซึ่งสนับสนุนรูปแบบการบริโภคของพืชสมุนไพรนี้ ที่แนะนำให้เคี้ยวใบฮว่านง็อกสด ๆ ที่เด็ดจากต้น

เป็นที่ทราบกันดีว่า สารกลุ่ม phenolics โดยเฉพาะ flavonoids เป็นกลุ่มสารพฤกษเคมีสำคัญที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร โครงการวิจัยนี้เลือกศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 3 วิธี คือ ใช้ DPPH assay, FRAP assay และ DCFH-DA assay ซึ่งมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระแตกต่างกัน เนื่องจากในร่างกายมีอนุมูลอิสระหลากหลายชนิด และร่างกายมีกลไกแตกต่างกันในการกำจัดสาร oxidant และอนุมูลอิสระต่าง ๆ ภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยทั่วไปการศึกษาเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร จึงไม่ควรใช้การตรวจสอบเพียงวิธีเดียว และนอกจากแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองแล้ว ควรตรวจสอบด้วยว่า พืชสมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต หรืออย่างน้อยแสดงความสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ DCFH-DA assay ซึ่งเป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ควบคู่กับ DPPH และ FRAP assay ซึ่งเป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นเคมีในหลอดทดลอง ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นิยมใช้สารทุตยภูมิ (secondary metabolite) ในพืช เช่น ไวตามินซี catechin,

quercetin หรือแม้แต่ trolox สารสังเคราะห์ของไวตามินอีที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น เพื่อเป็น antioxidant positive control เพราะโดยปกติ สารเหล่านี้ได้ถูกใช้เพื่อเปรียบเทียบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทางด้านอาหาร โครงการวิจัยนี้ จึงใช้ catechin, quercetin และ trolox เป็น antioxidant positive control ผลการทดสอบด้วย DPPH assay ในรูปที่ 4.3 ชี้ชัดว่าความสามารถของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกในการกำจัด DPPH• แปรผันตามปริมาณของสาร phenolics และ flavonoids ในแต่ละสารสกัด ดังที่สารสกัดที่เตรียมจากใบสดมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง ซึ่งหมายถึงสารสกัดจากใบสดมีความสามารถในการกำจัด DPPH• ได้ดีกว่าสารที่สกัดจากใบแห้ง เพราะใช้ความเข้มข้นของสารในปริมาณน้อยกว่าในการกำจัด DPPH• ได้ 50% เท่ากัน สารสกัดจากใบสดที่มีตัวทำละลายเป็น 95% ethanol หรือ 80% ethanol ซึ่งมีปริมาณ phenolics และ flavonoids ใกล้เคียงกันมีความสามารถทัดเทียมกันในการกำจัด DPPH• (ต่างกันเพียง 7.5%) สารสกัดที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากใบสด WE-FLP ซึ่งมีค่า phenolics และ flavonoids มากสุดมีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลาย DPPH• ในทำนองเดียวกัน สารสกัดจากใบแห้งที่ใช้ตัวทำละลาย 80% ethanol (80EE-DLP) ที่มีปริมาณ phenolics และ flavonoids น้อยสุดมีประสิทธิภาพต่ำสุดในการกำจัด DPPH• ดังที่สารสกัด 80EE-DLP มีค่า IC_{50} สูงสุด ส่วนผลการทดสอบใน FRAP assay (รูปที่ 4.4) ให้ผลที่สอดคล้องกัน คือสารสกัดที่เตรียมจากใบสดที่มีปริมาณ phenolics และ flavonoids สูงกว่าใบแห้งมีความสามารถในการเป็น reducing agent ที่ดีกว่า และไม่มีความแตกต่างของ ferric reducing power ใน FRAP assay ระหว่างสารสกัดที่เตรียมจาก 95% ethanol หรือ 80% ethanol ที่มีสาร phenolics และ flavonoids ทัดเทียมกัน ส่วนสารสกัดที่มีค่าของ FRAP ต่ำสุดยังคงเป็น 80EE-DLP ที่มีปริมาณ phenolics และ flavonoids ต่ำสุดนั่นเอง ข้อที่ควรสังเกตคือ สารสกัด WE-FLP ที่มีค่า phenolics และ flavonoids สูงสุด และสามารถกำจัด DPPH• ได้สูงสุด กลับมีค่า FRAP ต่ำกว่าสารสกัด 95EE-FLP และ 80EE-FLP เล็กน้อย ($p< 0.05$) ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่า กลุ่มสารใน phenolics และ flavonoids ที่ออกฤทธิ์ใน DPPH และ FRAP assay มีความแตกต่างกันได้ เพราะแม้การทดสอบทั้ง DPPH และ FRAP จะเกี่ยวข้องกับการส่งผ่าน electron เพียงตัวเดียว (Bunea et al., 2011) แต่คุณลักษณะ ความไว และ กลไกของปฏิกิริยา และ ผลลัพท์ (endpoints) มีความแตกต่างกัน วิธี DPPH ขึ้นกับความสามารถของสารในการกำจัด (scavenging) activity อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH•) ในขณะที่ FRAP วัดกำลังความสามารถของสารในการรีดิวซ์ Fe^{+3} เป็น Fe^{+2} (Benzie และ Strain, 1996) นอกจากนั้น FRAP assay ยังสามารถทดสอบศักยภาพของการทำลาย

ปฏิกิริยาลูกโซ่ของปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (chain-breaking antioxidant potential) (Ghiselli et al., 1995) อย่างไรก็ดี ข้อมูลจากการทดลองชี้ชัดว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งใน DPPH และ FRAP assay ซึ่งมีกลไกต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน และงานวิจัยนี้แสดงว่าปริมาณสารกลุ่ม phenolics และ กลุ่ม flavonoids มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย DPPH และ FRAP assay ซึ่งสอดคล้องกับ Nguyen และ Eun (2011) ที่พบว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่ประกอบด้วยกลุ่มสาร phenolics และ flavonoids มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อประเมินด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay Giang et al., (2003) และ Giang et al., (2005) ระบุว่าสารกลุ่ม flavonoids เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบฮว่านง็อก ใน DPPH assay นอกจากนั้น มีงานวิจัยอื่นที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น Saeed et al. (2012) พบสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids ใน *Torilis leptophylla* สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ Fernandes de Oliveira et al. (2012) แสดงความสัมพันธ์ที่เด่นชัดระหว่างปริมาณรวมสาร phenolics และ flavonoids กับฤทธิ์ต้าน oxidation ของสารสกัดหยาบ *Sidastrum micranthum* และ *Wissadula periplocifolia* Bunea et al. (2011) แสดงความสัมพันธ์ที่แน่ชัดระหว่างปริมาณ phenolics และ flavonoids กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ blueberry สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนั้น กลุ่มสาร phenolics และ flavonoids ที่มีอยู่ปริมาณสูงในสารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย DPPH และ FRAP assay อนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฮว่านง็อกกับสารมาตรฐานที่เป็น positive control ค่า IC_{50} ในการกำจัด DPPH• ของทุกสารสกัดของฮว่านง็อก มีค่าสูงกว่าสารมาตรฐาน vitamin C, trolox, และ catechin สารสกัดของฮว่านง็อกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ WE-FLP มีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.55±0.06 μg/ml ซึ่งมีความสามารถกำจัด DPPH• น้อยกว่า vitamin C (IC_{50} = 3.94 ± 0.01 μg/ml), catechin (IC_{50} = 3.55 ± 0.01 μg/ml) และ trolox (IC_{50} = 5.90 ± 0.27 μg/ml) ประมาณ 5.5, 6.1 และ 3.7 เท่าตามลำดับ ส่วนค่าของ FRAP ของสารสกัด 95EE-FLP ที่มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 213.23 ± 1.09 mg VCEAC/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งหมายความว่าสารสกัดน้ำหนักแห้ง 1 กรัมมีความสามารถในการรีดิวซ์ TPTZ-Fe (III) ไปเป็น TPTZ-Fe(II) เทียบเท่า vitamin C บริสุทธิ์หนัก 0.213 กรัม หรือมีความสามารถน้อยกว่าไวตามินซีในการ reduce สาร ประมาณ 4.7 เท่า อย่างไรก็ตาม ผลทดสอบได้มาจากการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเทียบเคียงกับความสามารถของสารมาตรฐานซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ จึงไม่ได้หมายความว่าใบของฮว่านง็อกสามารถต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เป็น positive control เนื่องจากเป็นการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดหยาบของฮว่านง็อก และสารบริสุทธิ์ของ

สารมาตรฐาน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพโดยตรงได้ โดยรวม ข้อมูลจากการทดลองชี้ชัดว่า สารสกัดจากใบฮว่านง็อกสามารถต้านอนุมูลอิสระได้อย่างน้อย 2 กลไก และความสามารถในการออกฤทธิ์มีความสัมพันธ์กับปริมาณของกลุ่มสาร phenolics และ flavonoids

แม้ทั้ง DPPH และ FRAP assay เป็นวิธียอดนิยมที่ใช้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต่าง ๆ เพราะเป็นวิธีตรวจสอบที่ง่าย ราคาถูก แต่ก็มีข้อจำกัดในการแปลผล เพราะว่าอนุมูลอิสระ DPPH• ไม่ได้เกิดขึ้นจริงในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ส่วน FRAP assay แม้สารที่มีศักยภาพต่ำในการรีดิวซ์ (low redox potential) ก็สามารถรีดิวซ์ Fe^{+3} เป็น Fe^{+2} ได้ และวิธีการทดสอบ FRAP ไม่ได้กระทำใน pH ที่ใกล้เคียงกับสภาวะของร่างกาย (physiological pH) นอกจากนั้น ทั้ง 2 วิธีทดสอบอาจจะมีการรบกวนจากสารอื่นที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันที่ใช้ในการทดสอบ ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน และข้อจำกัดที่สำคัญสุดอีกข้อหนึ่งคือ พืชสมุนไพรหลายชนิดแม้สามารถต้านอนุมูลอิสระในวิธีทดสอบ DPPH และ FRAP แต่กลับไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย (Pérez-Jiménez et al., 2008) ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จึงเพิ่มวิธีการทดสอบฤทธ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฮว่านง็อกภายในเซลล์ (cell-based assay) ที่ยังไม่เคยมีการศึกษาในฮว่านง็อกมาก่อน โดยใช้สาร DCFH-DA ที่สามารถตรวจวัดการเรืองแสงของสารภายในเซลล์ (intracellular fluorescent probe) เมื่อสารถูก oxidize ภายในเซลล์ โดยทั่วไป การศึกษาเกี่ยวกับอนุมูลอิสระ หรือ ROSs ต่าง ๆ ภายในเซลล์ มักนิยมใช้เซลล์ macrophage เป็นโมเดล เนื่องจากการกระตุ้นเซลล์ macrophage ก่อให้เกิดการสร้าง ROSs ขึ้นมากมาย เพราะโดยธรรมชาติ เซลล์ macrophage เมื่อกลืนกิน (phagocytize) จุลินทรีย์ หรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ จะเกิดปฏิกริยาออกซิเดชัน สร้างสารอนุมูลอิสระ หรือ ROSs ต่าง ๆ เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่กลืนกินเข้าไป ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ model ของ RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์ macrophage ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เพราะสามารถถูกกระตุ้นให้สร้าง ROSs ภายในเซลล์ได้ง่ายในปริมาณสูง สารที่ใช้เป็น antioxidant poisitive control ใน cell-based assay นี้คือ catechin, resveratrol และ quercetin โดยงานวิจัยนี้ เลือกใช้ความเข้มข้นของสารที่เป็น positive control ตามรายงานวิจัยอื่นที่แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ (Kim et al., 2011; Okawara et al., 2007 และ Nishikawa et al., 2007) ผลของการทดสอบในรูปที่ 4.5 A ช่วยยืนยันว่า ความเข้มข้นที่เลือกใช้ใน antioxidant positive control ทุกชนิดคือ 250 µM catechin, 2-µM resveratrol และ 10 µM quercetin สามารถยับยั้งการออกซิไดซ์ DCFH หรือลดการเกิด ROSs ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นภายในเซลล์ RAW264.7 โดย tBOOH ได้ตั้งแต่ 30 นาทีแรกที่เก็บข้อมูล จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 240 นาที โดยเฉพาะ resveratrol และ quercetin ในความเข้มข้นที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงกว่า catechin ในการยับยั้งการเกิด DCF เพราะสามารถลดการเกิด ROSs ภายในเซลล์จนกระทั่งมีค่าเทียบเท่ากับค่าของ baseline

ใน naïve control ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย tBOOH ในขณะที่ catechin ที่ความเข้มข้น 250 μM แม้จะสามารถยับยั้งการเกิด DCF อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ก็ไม่สามารถลดปริมาณอง DCF จนมีค่าใกล้เคียงกับค่าของ baseline ใน naïve control ได้ สิ่งที่น่าสังเกตคือตั้งแต่ 180 นาทีขึ้นไป ทั้ง resveratrol และ quercetin สามารถลดปริมาณ ROSs ให้ต่ำกว่าค่าของ naïve control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สารสกัดฮว่านง็อก 95EE-FLP และ WE-FLP นอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน DPPH และ FRAP assay ซึ่งทดสอบภายนอกเซลล์ ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบภายในเซลล์ได้เช่นกัน จากรูปที่ 4.5 B-C การลดลงของ DCF หรือ ROSs ที่เกิดภายในเซลล์แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดฮว่านง็อกที่เพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองที่ 50-250 μg/ml สามารถยับยั้งการเกิด DCF เมื่อเทียบกับ vehicle control ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และถึงแม้อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ แต่ประสิทธิภาพของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ใน DCFH-DA assay ไม่ได้ด้อยกว่าสารมาตรฐาน positive control ที่อยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์แต่อย่างใด ดังค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองของ 95EE-FLP คือ 250 μg/ml สามารถลดค่า DCF ลงให้ต่ำกว่าค่า navie control ตลอดช่วงระยะเวลาการทดลอง ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดเดียวกันที่ 150 μg/ml ก็สามารถลดค่า DCF ลงเทียบเท่ากับค่า baseline ใน naïve control ตั้งแต่ 30 นาทีแรกถึง 150 นาที และหลังจากนั้น ยังสามารถลด fluorescent signal จาก DCF ลงได้อย่างต่อเนื่องจนมีค่าต่ำกว่า naïve control จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 4.5 B) ซึ่งความสามารถในการลดค่าความเข้มของ DCF ให้ต่ำกว่าค่าที่พบใน naïve control สามารถพบได้ในกรณีของ resveratrol และquercetin ที่เป็น antioxidant positive control เช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.5 A) แม้สารสกัดที่ละลายน้ำได้ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 150-250 μg/ml สามารถลดระดับของ DCF อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตั้งแต่ 30 นาทีแรกถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 240 นาที เมื่อเทียบกับกลุ่ม tBuOOH (ซึ่งเทียบเท่ากลุ่มที่เป็น vehicle control สำหรับสารสกัด WE-FLP เนื่องจาก WE-FLP ละลายได้ใน media ในขณะที่กลุ่มที่เป็น vehicle control ของสารสกัด 95EE-FLP คือ 0.25% DMSO) แต่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยยับยั้งการเกิด DCF ยังด้อยกว่า 95EE-FLP เพราะแม้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 250 μg/ml WE-FLP ก็ยังไม่สามารถลดระดับของ DCF ให้ต่ำเทียบเท่ากับค่าใน naïve control เหมือนสารสกัด 95EE-FLP (รูปที่ 4.5 B -C) อนึ่ง การลดต่ำของปริมาณ DCF ไม่ได้เป็นผลทางอ้อม ที่เกิดจากความเป็นพิษของสารสกัด 95EE-FLP หรือ WE-FLP ต่อ RAW264.7 เซลล์ ที่มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ และพลอยทำให้ค่าของ DCF ลดลงตามไปด้วย ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง ได้จากการศึกษาเบื้องต้นที่แสดงว่าช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลกระทบต่อ % การอยู่รอดของ RAW264.7 เซลล์แต่อย่างใด (รูปที่ 4.6-4.7) ดังนั้น สารสกัดฮว่านง็อกนอกจากสามารถต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธีทางเคมีได้แล้ว ยังสามารถผ่านเข้าสู่ RAW264.7 เซลล์ และออกฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์ ผลการทดลองนี้

สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่รายงานว่าสารสกัดน้ำ หรือ สารสกัด ethanol ของพืชและผลไม้หลากหลายชนิดที่มีสารประกอบ phenolic สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์โดยใช้ DCFH-DA assay (Aiyegoro และ Okoh, 2009, 2010; Shi, et al., 2011; Shukla et al., 2012; Serra et al., 2011) ดังนั้น ความสามารถต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของฮว่านง็อก น่าจะเกี่ยวข้องกับสารประกอบ phenolics และกลุ่ม flavonoids ที่พบเป็นปริมาณสูงในสารสกัด เป็นที่น่าสังเกตว่า สารสกัดที่ละลายน้ำได้ WE-FLP มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน DPPH assay สูงสุด แต่สารสกัด 95EE-FLP มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า WE-FLP ทั้งใน FRAP assay และ DCFH-DA assay ซึ่งสนับสนุนแนวคิดว่าสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids ที่ออกฤทธิ์ในแต่ละการทดสอบน่าจะมีความแตกต่างกันได้ เพราะว่ากลไกของการต้านอนุมูลอิสระในวิธีทดสอบทั้ง 3 วิธีนั้นแตกต่างกันคือ ในวิธีทดสอบ DPPH การออกฤทธิ์ของสารขึ้นกับความสามารถในการทำลายอนุมูลไนโตรเจนของ DPPH ที่เสถียร (stable DPPH nitrogen radical), FRAP assay วัดค่า reducing power ในการ reduce Fe^{+3} เป็น Fe^{+2} ส่วนกรณี DCFH-DA assay นั้น DCFH-DA ต้องผ่านเข้าสู่เซลล์ก่อนหมู่ diacetate ถูกตัดออกโดย esterase ภายใน RAW264.7 เซลล์ ได้สาร DCFH ซึ่งถูกออกซิไดซ์ต่อภายในเซลล์ด้วย oxidant ต่าง ๆ เกิดสารเรืองแสง DCF งานวิจัยนี้ใช้ tBuOOH เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ ช่วย oxidize DCFH เพิ่มปริมาณสารเรืองแสง DCF ให้มีค่าสูงขึ้นแตกต่างจากค่า baseline ใน naïve control (เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย tBuOOH) อย่างชัดเจน ใน DCFH-DA assay ความเข้มของสารเรืองแสงที่วัดได้เป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณของ ROS (DCF) ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ (Yen et al., 2003) และสารที่สามารถลดความเข้มของสารเรืองแสง DCF คือสารที่ลดการเกิด DCF หรือสารที่สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้นั่นเอง คุณสมบัติของสารที่ออกฤทธิ์ใน DCFH-DA assay ได้นั้น ต้องสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์และสามารถยับยั้งการทำงานของสารกลุ่ม peroxide ในการ oxidize DCFH ได้ จึงเป็นไปได้ว่า สารสกัด WE-FLP ที่ละลายน้ำได้ดีอาจจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยกว่า 95EE-FLP เพราะคุณสมบัติทั่วไปของ cell membrane จะยอมให้สารที่ละลายได้ดีในไขมันผ่านเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าสารที่ละลายได้ดีในน้ำ นอกจากนั้น กลไกของการลดปริมาณ DCF ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์น่าจะแตกต่างจากกลไกของการยับยั้ง DPPH• และการ reduce F^{+3} ใน DPPHและ FRAP assay ตามลำดับ จึงมีความเป็นไปได้สูงว่า สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฮว่านง็อกในวิธีทดสอบ DPPH, FRAP และ DCFH-DA นั้นน่าจะมีความแตกต่างกัน อันที่จริง สารต้านอนุมูลอิสระในพฤกษเคมีรวมทั้ง flavonoid และ phenolics มีอยู่หลายกลุ่ม ซึ่งมีคุณสมบัติและกลไกในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกันได้ เช่น Kumar และ Pandey (2013) ได้รายงานว่า flavonoid ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติมากมายหลายกลุ่ม ที่มีโครงสร้างทางเคมี และมีกลไกในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน อาทิ เช่น หมู่ hydroxyl หลายหมู่ใน flavan nucleus ของ flavonoid ช่วยต้านออกซิเดชัน และช่วยในการ chelate สารออกซิ

แดนซ์ หมู่ methoxy รบกวนการออกฤทธิ์และเพิ่มการอยู่ร่วมกับไขมัน (lipophilicity) พันธะคู่ (double bond) และ หมู่ carbonyl ในวงแหวนหลาย ๆ วง ของโครงสร้างหลัก (heterocycle of the nuclear ring) ใน flavonoid เกี่ยวข้องกับความเสถียรของอนุมูลอิสระ และเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ ส่วนสารประกอบ phenolics มีทั้งหมู่ hydroxyl หรือ methoxyl ในขณะที่ flavones มีหมู่ hydroxyl, keto, และ carboxylic อิสระ และ flavonoids มี flavan nucleus ซึ่งมีหลาย อนุพันธุ์ (different types of substitution) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (Heim et al., 2002) ดังนั้น โครงสร้างที่แตกต่างกันตามธรรมชาติของสารพฤกษเคมีเหล่านี้ในสารสกัดหยาบต่าง ๆ ของฮว่านง็อกจึงอาจมีคุณสมบัติที่แตกต่าง และ กลไกที่ต่างกันได้บ้างในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบใน 3 วิธีที่แตกต่างกัน

แม้ว่า NO เป็นสารสื่อกลาง (mediator) สำคัญซึ่งเซลล์ macrophage ใช้ในการกำจัดเซลล์เนื้องอก (Manthey et al., 1994) แต่การสร้างปริมาณ NO ที่สูงเกินไปก่อให้เกิดการตายของเซลล์ หรือความเสียหายของเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะในสภาวะความผิดปกติที่เกิดในระหว่างกระบวนการอักเสบ มีการสร้างอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากมาย ทั้ง reactive oxygen/nitrogen species, pro-inflammatory enzymes, pro-inflammatory cytokines รวมทั้ง signaling proteins ต่าง ๆ ในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบ (Mineo et al., 1997., Reuter et al., 2010; Pan et al., 2011) NO ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นในปริมาณสูงสามารถรวมตัวกับ superoxide เกิด peroxynitrite ion ($OONO^-$) ซึ่งเป็นโมเลกุลหนึ่งที่ทำความเสียหายให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อในระหว่างที่เกิดการอักเสบ (Fang et al., 2009) งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดฮว่านง็อกโดยเลือกเฉพาะสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ซึ่งมีปริมาณ phenolics และ flavonoids สูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดทั้งภายในและภายนอกเซลล์สูงมาตรวจสอบศักยภาพในการยับยั้งการสร้าง NO โดยเลือก RAW264.7 เซลล์เป็นโมเดลในการศึกษาเพราะ RAW264.7 เป็นเซลล์สายพันธุ์ของหนูเม้าส์ ซึ่งสามารถสังเคราะห์ NO ในปริมาณสูงเมื่อได้รับการกระตุ้นโดย LPS และ IFN-γ จึงเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโมเดลลอกเลียนแบบเมื่อเซลล์ macrophage ในร่างกายเมื่อถูกกระตุ้นในสภาวะที่เกิดการอักเสบ เช่น กระตุ้นโดย endotoxin จากแบคทีเรีย (งานวิจัยนี้ใช้ LPS ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ cell wall ในแบคทีเรียแกรมลบ) หรือ จาก proinflammatory cytokine (งานวิจัยนี้ใช้ IFN-γ) ซึ่งไปชักนำให้เกิดการเพิ่มของเอนไซม์ iNOS isoform ทำให้เกิดการสร้าง NO ในปริมาณสูง (Alessandro et al., 1994) การสังเคราะห์ NO อาศัย 2 สัญญาณ (signal) คือ สัญญาณแรกโดย IFN-γ เป็น priming signal ช่วยเตรียมเซลล์เบื้องต้น (prime) เพื่อให้ตอบสนองต่อสัญญาณที่ 2 จาก LPS ที่เป็น triggering signal ได้ดีขึ้น การใช้ทั้ง IFN-γ และ LPS จึงกระตุ้น RAW264.7 เซลล์ได้ดีกว่าการใช้สารใดสารหนึ่งเพียงสารเดียว งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ทั้ง LPS และ IFN-γ ในการกระตุ้น RAW264.7 เซลล์เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อชักนำให้สร้าง NO และเนื่องจากการวัดปริมาณ NO โดยตรงกระทำได้ยาก เพราะ

ความไม่เสถียรของ NO โดยเฉพาะถ้าปริมาณของ NO ที่เกิดขึ้นไม่สูงมาก ในปัจจุบัน การวัดปริมาณ NO จึงมักนิยมวัดทางอ้อมโดยใช้วิธีทาง spectroscopic เช่น ultraviolet visible spectroscopic method โดยใช้ Griess reagent ที่เป็นส่วนผสมของ sulfanilamide, HCl, และ N-(1-napthyl)-ethylenediamine (NED) เพื่อวัด nitrite ที่เป็น metabolite product ที่เสถียรของ NO ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 548 nm โดยถือว่า ปริมาณของ nitrite เป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณของ NO ที่สร้างขึ้น (Kelm and Schauer, 1997) สำหรับอีกวิธีหนึ่งของการวัด NO โดยทาง UV visible spectroscopic ใช้ปฏิกิริยาระหว่าง oxyhemoglobin กับ NO ได้ methemoglobin และ nitrate ดังนั้น จึงสามารถวัดอัตราการสังเคราะห์ NO ในสารละลายได้ เพราะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงของ absorption spectrum ของ HbO_2 (Gow et al., 1999) สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ Griess reagent ในการวัดปริมาณของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน RAW264.7 เซลล์เมื่อได้รับ LPS และ IFN-γ ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ช่วงความเข้มข้น 50-250 µg/ml เมื่อบ่มล่วงหน้าร่วมกับเซลล์ RAW264.7 เป็นเวลา 24 ชม. สามารถยับยั้งการสร้าง NO ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยปริมาณของการยับยั้งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น และสารสกัด 95EE-FLP มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัด WE-FLP ในการยับยั้งการสร้าง NO (รูปที่ 4.8 A-B) ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ 95EE-FLP ที่เหนือกว่า WE-FLP (รูปที่ 4.4-4.5) เนื่องจากการสร้าง NO ของ RAW254.7 เซลล์ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นจาก LPS และ IFN-γ เกิดผ่านเอนไซม์ iNOS เป็นหลัก งานวิจัยนี้จึงตรวจสอบกลไกการยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดฮว่านง็อกว่าเกิดผ่านการยับยั้งเอนไซม์ iNOS หรือไม่ จากการศึกษาพบว่า ในสภาวะเดียวกันที่สารสกัดสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS โปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle control ($p< 0.05$) (รูปที่ 4.9 A-B) โดยปริมาณการยับยั้งมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารสกัด และสารสกัด 95EE-FLP มีประสิทธิภาพสูงกว่า WE-FLP ในการยับยั้ง iNOS ซึ่งสอดคล้องกับผลของการยับยั้งการสร้าง NO ดังนั้น กลไกหนึ่งของสารสกัดฮว่านง็อกที่ยับยั้งการสังเคราะห์ NO ใน RAW264.6 เซลล์เมื่อถูกกระตุ้นโดย LPS และ IFN-γ เกิดผ่านการลดลงของโปรตีน iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่รับผิดชอบในการสังเคราะห์ NO ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้น (induced NO) โดยการกระตุ้นของ proinflammatory cytokine หรือสารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังเช่น LPS เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารสกัดฮว่านง็อกมีหลายกลไกในการต้านอนุมูลอิสระ จึงอาจเป็นไปได้ว่า การลดลงของ NO อาจเป็นผลจากคุณสมบัติของสารสกัดที่สามารถทำลาย (scavenge) NO ได้โดยตรง ซึ่งอาจจะเป็นอีกหนึ่งกลไกที่ควรได้รับการศึกษาต่อไป

นอกจากสามารถชักนำเซลล์ RAW264.7 ให้สร้าง NO และ iNOS เพิ่มขึ้น ทั้ง LPS และ IFN-γ ยังสามารถชักนำการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ใน RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้น (Jang et al.,

2005; Karpuzoglu and Ahmed, 2006) การเพิ่มการแสดงออกของ COX-2 พบได้ในเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด และพบได้ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบ การเพิ่มขึ้นของ COX-2 ทำให้ปริมาณ PGE2 เพิ่มขึ้นอย่างมากมาย ซึ่งเกิดกับเซลล์และเนื้อเยื่อทุกชนิดเมื่อเกิดการอักเสบ (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003) งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารสกัดต่ออีกหนึ่งตัวกลางของการอักเสบ (inflammatory mediator) โดยศึกษาความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ผลการทดสอบพบว่า ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 50-250 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 และเฉกเช่นเดียวกับการยับยั้งการสร้าง NO, และ iNOS ฤทธิ์ในการยับยั้ง COX-2 เพิ่มตามความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น (รูปที่ 4.9 C-D) แม้ที่ความเข้มข้นในระดับต่ำ (50-150 μg/ml) สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีความสามารถไม่ต่างกันมากในการยับยั้ง COX-2 แต่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 200 μg/ml ขึ้นไป สารสกัด 95EE-FLP สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ได้มากกว่าสารสกัด WE-FLP โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (250 μg/ml) 95EE-FLP สามารถลดการแสดงออกของ COX-2 ได้เกือบ 70% ในขณะที่ความเข้มข้นเดียวกันของ WE-FLP สามารถยับยั้งได้ประมาณ 55% (รูปที่ 4.9 C-D) อนึ่ง สารสกัดว่านฮว่านง็อก ทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถลดการแสดงออกของ iNOS ได้ดีกว่าการลดการแสดงออกของ COX-2 (รูปที่ 4.9 A-D)

IL-6 และ TNF-α เป็น cytokine ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ และเป็น pro-inflammatory cytokines ที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในทุกระยะของสภาวะที่เกิดการอักเสบ การยับยั้ง proinflammatory cytokine ทั้งสองจัดเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญในการรักษาทางคลินิกเพื่อลดอาการอักเสบ (Xing et al., 1998; Scheller et al., 2011; Popko et al., 2010) งานวิจัยนี้จึงได้เลือกสารสกัด 95EE-FLP ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการสร้าง NO, iNOS, และ COX-2 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบเพิ่มเติมโดยตรวจสอบผลของสารสกัดต่อ pro-inflammatory cytokines IL-6 และ TNF-α ในระดับ protein และ ระดับ gene โดยเลือกศึกษาใน RAW264.7 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เนื่องจาก LPS เป็น endotoxin ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์หลากหลายชนิดรวมทั้ง macrophage ให้สร้าง pro-inflammatory cytokines ต่าง ๆ รวมทั้ง IL-6 และ TNF-α (Guha and Mackman, 2001) ผลการทดสอบพบว่าสารสกัด 95EE-FLP ที่ความเข้มข้น 150 และ 250 μg/ml สามารถยับยั้งการหลั่งทั้ง TNF-α และ IL-6 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ vehicle control (รูปที่ 4.10 A-B) ($p < 0.05$) และการยับยั้ง cytokines ทั้งสองเป็นผลสืบเนื่องจากการยับยั้งที่ระดับของ mRNA (รูปที่ 4.11 A-B) ทั้งนี้ การศึกษาทั้งในระดับโปรตีนและระดับ gene ให้ผลที่สอดคล้องและสนับสนุนซึ่งกันและกันว่า สารสกัด 95EE-FLP มีความสามารถในการยับยั้ง IL-6 ได้ดีกว่า TNF-α

Proinflammatory cytokines ต่าง ๆ โดยเฉพาะ TNF-α และ IL-6 ที่สร้างโดยเซลล์ต่าง ๆ เช่น เซลล์ในตระกูลของ myeloid (myeloid lineage), macrophage และ endothelial cell เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารซึ่งกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เชื้อโรค endotoxin หรือ LPS สามารถชักนำให้เพิ่มการสร้าง iNOS ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง NO ในปริมาณสูง และคงตัวอยู่ได้นานขึ้น (Wink et al., 1998) ซึ่งปริมาณที่สูงเกินไปของ NO (สร้างในระดับ nanomoles แทนที่จะเป็น picromoles) โดยการชักนำของ iNOS (Cuzzocrea et al., 2001) เป็นต้นเหตุสำคัญหนึ่งที่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น เกิดการสร้างสารก่อมะเร็ง N-nitroso compound, เกิด deamination และ หรือ oxidation ของเบสใน DNA ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis) รวมทั้งความเสียหายต่อเนื้อเยื่อและพยาธิสภาพที่เกิดในโรคต่าง ๆ เช่น โรคความดันต่ำ septic shock, nitrosation, neural damage (Liu and Hotchkiss, 1995; Moncada et al., 1991 และ Wink et al., 1998) ในสภาวะปกติของร่างกาย เซลล์ในเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดแทบจะไม่สร้างเอนไซม์ COX-2 แต่สร้างเฉพาะ COX-1 เท่านั้น การสร้าง หรือ การแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์ เช่น macrophage, endothelial cell และ synoviocytes เกิดจากการชักนำให้สร้างขึ้นภายใต้สภาวะของการอักเสบเท่านั้น เช่น ถูกกระตุ้นโดย proinflammatory cytokines ต่าง ๆ (IL-1α/β, IL-2, IFN-γ, และ TNF-α), endotoxin, mitogens, phorbol ester, growth factors ต่าง ๆ (fibroblast growth factor, platelet derived growth factor และ epidermal growth factor),และ luteinizing hormone เป็นต้น (Dannhardt and Kiefer, 2001; Wang and Dubois, 2010) ดังนั้น ในสภาวะที่เกิดการอักเสบจึงมีความเกี่ยวข้องกับ inflammatory mediators ต่าง ๆ มากมายโดยเฉพาะการสร้าง NO ในปริมาณสูง (Liu and Hotchkiss, 1995), pro-inflammatory cytokines TNF-α และ IL-6 (Faghali and Wright, 1997) และ inducible enzymes iNOS และ COX-2 (Dannhardt and Kiefer, 2011; Calixto et al., 2003) ซึ่งงานวิจัยนี้แสดงว่าสารสกัดฮว่านง็อกนอกจากมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยยับยั้งการทำงานของสารสื่อกลางและโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ คือยับยั้งการสร้าง NO, การสร้างเอนไซม์ iNOS และ COX-2 และการสร้าง proinflammatory cytokines TNF-α และ IL-6 ใน *in vitro* ซึ่งสาร หรือ โปรตีนเหล่านี้ล้วนมีบทบาทสำคัญ มีความสัมพันธ์ และเกื้อหนุนกันในการชักนำให้เกิดการอักเสบ ส่วนความสามารถของสารสกัดในการต้านการอักเสบใน *in vivo* จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของฮว่านง็อกในงานวิจัยนี้สนับสนุนโดยรายงานของ Khumpook et al. (2013) ซึ่งได้ตรวจสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของฮว่านง็อกในสัตว์ทดลอง โดยใช้สารสกัด ethanol ที่เตรียมจากใบของฮว่านง็อก และพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ในหนู albino rat โดยใช้ ethyl phenylpropiolate-induced edema ear test และ cotton pellet-induced granuloma formation เป็นโมเดลใน

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน และ แบบเรื้อรังตามลำดับ แม้ว่างานวิจัยของ Khumpook (2013) ยังไม่ได้ศึกษากลไกต้านการอักเสบในเชิงลึกว่าเกี่ยวข้องกับสารหรือโปรตีนที่เกี่ยวกับการอักเสบใดบ้าง แต่คณะวิจัยชี้แนะว่า ฤทธิ์ต้านการอักเสบของฮว่านง็อกน่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระ เพราะพบว่าในหนู rat ที่ถูกชักนำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง สารสกัดสามารถลดปริมาณของ malondialdehyde ซึ่งเป็น degradation product ของ lipid peroxidation และเป็นดัชนีบ่งชี้สภาวะ oxidative stress ควบคู่กับการลดปริมาณของ NO และความสามารถในการเพิ่ม superoxide dismutase ซึ่งเป็น anti-oxidant enzyme แม้ในปัจจุบัน ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอักเสบของฮว่านง็อกปริมาณจำกัดมาก แต่มีงานวิจัยอื่นอีกมากมายที่แสดงว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant สามารถมีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้ง NO, iNOS, COX-2 และ หรือ pro-inflammatory cytokines ต่าง ๆ รวมทั้ง TNF-α และ IL-6 ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลของโครงการวิจัยนี้ ตัวอย่างเช่น curcumin จากขมิ้น (*Curcuma longa* L.), resveratrol จากเปลือกองุ่น, ไวน์แดง และสารสกัดจากพืชอื่นๆ อีกมากมาย เป็นต้น (Surh *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2003) นอกจากนี้ phenolic compounds โดยเฉพาะกลุ่ม flavonoids อาทิเช่น apigenin, genistein และ kaempferol เมื่อบ่มล่วงหน้ากับเซลล์ RAW264.7 สามารถยับยั้งการแสดงออกของ NO, iNOS และ COX-2 protein ที่กระตุ้นด้วย LPS (Kobuchi *et al*., 1997; Liang *et al.*, 1999; Raso *et al*., 2001; Sakata *et al*., 2003) สารสกัด ethyl acetate ของ *Sonchus asper* ซึ่งใช้เป็นสมุนไพรใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น หลอดลมอักเสบ หอบหืด ถูกไฟลวก เป็นต้น สามารถเพิ่ม expression ของ antioxidant superoxide dismutase ควบคู่กับการยับยั้ง inflammatory mediators ต่าง ๆ คือ NO, iNOS,COX-2, PGE2 TNF-α, IL-1β, IL-6 และ heme oxygenase-1 ในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และชี้แนะว่าสารที่ออกฤทธิ์น่าจะเป็น rutin, caffeic acid และ queretin (Wang et al., 2015) Neobavaisoflavone ซึ่งเป็น flavonoid ชนิดหนึ่งที่เตรียมจาก *Psoralea corylifolia* สามารถยับยั้งการสร้าง ROSs และ RNS รวมทั้ง cytokines IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70 และ TNF-α ใน RAW264.7 เซลล์ ที่กระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ IFN-γ หรือกระตุ้นด้วย PMA เพียงอย่างเดียว (Szliszka et al., 2011)

อนึ่ง ความสามารถในการยับยั้งสารและโปรตีนที่เกี่ยวกับการอักเสบในโครงการวิจัยนี้ ไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ RAW264.7 อันส่งผลทางอ้อมให้เซลล์พลอยมีปริมาณของ NO, TNF-α, IL-6, iNOS และ COX-2 ลดลงด้วย เพราะความเข้มข้นของสารสกัดที่เลือกใช้ในทุกการทดลองของงานวิจัยนี้ไม่มีผลกระทบต่อ % ปริมาณของ RAW264.7 เซลล์ที่มีชีวิต (รูปที่ 4.6-4.7) ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ให้ความสำคัญในเรื่องนี้ด้วยการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดฮว่านง็อกต่อ RAW264.7 เซลล์โดยใช้วิธีตรวจสอบ % เซลล์ที่มีชีวิตหลังจากบ่มร่วมกับสารสกัดถึง 3

วิธีที่มีหลักการแตกต่างกันคือ 1) MTT assay ซึ่งตรวจวัด metabolic activity ของเซลล์มีชีวิต 2) trypan blue exclusion method ที่ใช้การนับเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ของ trypan blue ซึ่งเป็น anionic ที่ physiological pH และย้อมติดสีน้ำเงินของ trypan blue เฉพาะเซลล์ตาย เพราะ trypan blueไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งโดยธรรมชาติมีประจุลบ (Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014) และ 3) propidium iodide staining method ที่ใช้ flow cytometer ในการติดตามเซลล์ตายซึ่งย้อมติดสีเรืองแสงของ propidium iodide (PI) ทั้งนี้ เพื่อให้แน่ใจว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เลือกใช้ในการทดสอบมีความเหมาะสม ไม่มีพิษต่อเซลล์ หรือส่งผลกระทบต่อ % เซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งผลการทดสอบพบว่าทั้ง 3 วิธีเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และให้ผลที่ยืนยันซึ่งกันและกัน อย่างไรก็ตาม ในแต่ละวิธีทดสอบที่ใช้ในการประเมินการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มี มีข้อได้เปรียบ หรือข้อบกพร่องซึ่งแตกต่างกัน เช่นวิธี MTT เป็นการวัดผลด้วยการใช้ spectrophotometer กระทำได้ง่ายและสะดวกกว่าวิธี trypan blue exclusion มีความคลาดเคลื่อนระหว่างบุคคลน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ดี ข้อเสียเปรียบบางประการของวิธี MTT คือวิธีนี้ไม่ได้วัดปริมาณเซลล์ที่ตายโดยตรง แต่วัด metabolic activity ของเซลล์ (เอนไซม์ activity ของ mitochondrial succinate dehydrogenase) จึงอาจเกิด false positive ที่เซลล์ยังมีชีวิต แต่ metabolically inactive และอาจมีปัญหาเรื่องสีรบกวนจาก phenol red ส่วนประกอบอื่นใน media หรือแม้แต่สีของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ นอกจากนั้น metabolic activity ของเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงเนื่องจากผลกระทบจากสารที่ใช้ทดสอบ หรือสภาวะของการทดสอบ เช่น สาร polyphenol ใน green tea หรือ pH ของสภาวะทดสอบ เป็นต้น (Wang et al., 2010; Plumb et al., 1989; Hansen et al., 1989; Hsu et al., 2003) ซึ่งเป็นปัญหาทั่วไปทาง colorimetric method Maioli et al. (2009) รายงานว่ายา และ สารประกอบบางชนิดสามารถเปลี่ยนแปลง mitochondrial activity ใน MTT assay ได้ ดังนั้น การประเมินการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยการใช้วิธี MTT จึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ ควรตระหนักถึงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นได้ และที่สำคัญต้องเพิ่มกลุ่มควบคุม เพื่อตรวจสอบการรบกวนของสีจากสารสกัดร่วมด้วยทุกครั้งเมื่อใช้วิธี MTT ประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งสามารถกระทำได้ด้วยการมี culture ที่มีแต่สารสกัดบ่มร่วมกับ MTT โดยไม่มีเซลล์เป็น “blank sample” เพื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปลบออกจากค่าดูดกลืนแสงของสารทดสอบ (culture ที่มีเซลล์บ่มร่วมกับสารสกัดและ MTT) วิธี trypan blue เป็นวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐาน (classic method) ในการหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต แต่เป็นวิธีที่น่าเบื่อ เพราะต้องใช้เวลามากในการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงไม่เหมาะสมกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก เพราะเกิดความผิดพลาดง่ายจากความเหนื่อยล้า ต้องใช้สายตานับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นระยะเวลานาน และปัญหาสำคัญคือมีความคลาดเคลื่อนจากปัจจัยระหว่างบุคคล เช่น ตัวอย่างเดียวกัน ที่นับโดย 2 บุคคล อาจได้จำนวนเซลล์ต่างกัน หรือแม้แต่ในบุคคลเดียวกันนับจำนวนเซลล์ของตัวอย่างเดียวกัน 2 ครั้ง อาจได้ค่าที่ไม่ค่อยเท่ากัน เป็นต้น นอกจากนั้น การเตรียม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้ในการนับ ถ้าจำนวนเซลล์น้อยหรือมากเกินไป สามารถส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในค่าที่นับ ส่วนวิธีที่ใช้ PI อาศัยคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดความเสียหายในขณะที่เซลล์ตายจึงยอมให้ PI ผ่านเข้าไปจับกับ DNA ปัญหาคืออาจได้ background สูง หรือ false positive เมื่อวิเคราะห์ด้วย flow cytometry เพราะเมื่อเซลล์ตาย DNA ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งจับกับ PI และ PI นอกจากจับกับ DNA ยังสามารถจับกับ RNA จึงต้องใส่ RNAase ในหลอดทดลอง นอกจากนั้น การย้อมเซลล์ด้วย PI ไม่ควรใช้เวลานานเกิน และห้ามใช้กับเซลล์ที่ถูกตรึง (fixed cell) ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำให้ permeabilized คือยอมให้สารทุกชนิดผ่านเข้าได้ในการทดลอง ทำให้ต้องรีบวิเคราะห์ตัวอย่างทันทีด้วย flow cytometry ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ถูกตรึงแล้ว เพื่อวิเคราะห์ภายหลัง อันเป็นข้อปฏิบัติส่วนใหญ่ที่ทำให้การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ flow cytometry มีความสะดวกสบาย นอกจากนั้น สาร PI ยังเป็น genotoxic หรือ mutagenic ต่อเซลล์ (Rieger et al., 2010; Rieger and Barreda, 2016., Johnson and Spence, 2010; Deitch and deVere White, 1982; Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014) สำหรับงานวิจัยนี้ เลือกความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองจากความเข้มข้นที่ต้องไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์จากผลที่เป็นเอกฉันท์ของทั้ง 3 วิธีทดสอบเท่านั้น

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใน *in vitro* กระทำโดยทดสอบความเป็นพิษโดยตรงต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็ง HepG2, MCF-7, PC-3, และ Jurkat เพื่อเป็นตัวแทนของโรคมะเร็งที่พบบ่อยคือ มะเร็งตับ มะเร็งทรวงอก มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งในเม็ดเลือดขาวตามลำดับ ผลการตรวจสอบพบว่าทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่างสายพันธุ์ HepG2, MCF-7, PC-3, และ Jurkat มากน้อยแตกต่างกัน โดยเซลล์ Jurkat มีความไว (sensitive) ที่สุดต่อการถูกทำลายโดยสารสกัดทั้งสอง ในขณะที่เซลล์มะเร็งทรวงอก MCF-7 และโดยเฉพาะเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 มีความทนทานต่อการถูกทำลายโดยสารสกัดเป็นพิเศษ (รูปที่ 4.12) แม้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองสูงถึง 1,500 μg/ml ก็ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ PC-3 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานความเป็นพิษของสารสกัดหยาบ *P. palatiferum* ที่มีฤทธิ์แตกต่างกันต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ เซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT15, SW48, SW480) (Pamok et al., 2012), Caco2, และมะเร็งเต้านม (MCF-7) (ศศมล และ ประเสริฐ 2557). นอกจากนี้พืชสมุนไพรหลายชนิดที่มี polyphenol เป็นส่วนประกอบและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันก็สามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ Jurkat cell (Musika and Indrapichate, 2014), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (AGS, SNU-668 and SNU-638) (Kim et al., 2009)และเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231, MCF-7 and SK-BR-3) (Award et al., 2003) จากค่า LC_{50} ของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ในตารางที่ 4.2 พบว่า WE-FLP แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ Jurkat และ MCF-7 มากกว่า 95EE-FLP ดังนั้น ความเป็นพิษของ 95EE-FLP และ WE-FLP ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์น่าจะมี

ความสัมพันธ์กับองค์ประกอบ polyphenol ที่ละลายได้ในน้ำ เช่น flavanoids, apigenin, catechin, gallic acid, และ tannic acid (Dieu et al., 2008; Das et al., 2009; Chayarop et al., 2011). นอกจากนี้ ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีความเป็นพิษเฉพาะเจาะจงสูงสุดต่อเซลล์ Jurkat มากกว่าเซลล์มะเร็งที่เหลืออีก 3 สายพันธุ์ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของคุณสมบัติและภูมิหลังทางพันธุกรรมที่ต่างกันของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่างชนิดกัน (Thi Mai et al., 2011; Sak, 2014). ข้อดีของฮว่านง็อกที่เหมาะสมในการใช้ต้านมะเร็งคือ ในช่วงความเข้มข้น 250-1500 μg/ml ของทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ PBMCs น้อยกว่า เซลล์ Jurkat (รูปที่ 4.13 A, B ตามลำดับ) คุณสมบัติความเป็นพิษที่เฉพาะเจาะจงของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์มะเร็ง หรือความสามารถของยาที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าเซลล์มะเร็งเป็นคุณสมบัติอันพึงประสงค์ของยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นที่ต้องการเป็นอย่างสูงในปัจจุบัน (American Cancer Society, 2013)

โดยทั่วไป เซลล์อาจเกิดการตายได้ใน 2 รูปแบบหลักๆ คือ การตายแบบ apoptosis และการตายแบบ necrosis (Majno and Joris, 1995) เนื่องจากยาทำลายเซลล์มะเร็งที่เกิดผ่านกลไกของ apoptosis จะเป็นที่พึงปรารถนามากกว่าการชักนำให้เกิดการตายแบบ necrosis เพราะเซลล์มะเร็งที่ถูกชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ไม่ก่อให้เกิดปฏิกริยาการอักเสบ (inflammation reaction) ไม่ทำความเสียหายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อข้างเคียง ซึ่งแตกต่างจากการตายของเซลล์มะเร็งแบบ necrosis ที่จะก่อให้เกิดปฏิกริยาการตอบสนองต่อการอักเสบ พลอยทำลายเซลล์ หรือ เนื้อเยื่อข้างเคียง เกิดความเสียหายเป็นบริเวณกว้าง (Singh and Anand, 1995; Kam and Ferch, 2000) ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อร่างกาย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงตรวจสอบความสามารถของสารสกัดในการชักนำให้เกิดการตายของ Jurkat เซลล์ว่าเกิดผ่านกลไกของ apoptosis ได้หรือไม่ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทั้งการเปลี่ยนแปลงด้านสัณฐานวิทยาภายนอกของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ รวมทั้งหมด 4 เทคนิค คือ 1) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะความเสียหายของนิวเคลียสด้วยการย้อมสี Hoechst 33258 2) วิเคราะห์การแตกหักของ DNA ใน agarose gel electrophoresis 3) ตรวจสอบการ translocate ของ phosphatidyl serine จากเดิมที่เคยอยู่ผิวด้านในออกสู่ผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ อันเป็นเอกลักษณ์ของเซลล์ในระยะ early apoptosis ด้วยการใช้ Annexin V-PI และ 4) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง mitochondrial membrane potential ที่ส่งผลให้เกิดการหลั่งของ cytochrome C ด้วยเทคนิค flow cytometry ผลการตรวจสอบทั้ง 4 วิธี ให้ผลสนับสนุนซึ่งกันและกัน และชี้ชัดเป็นเอกฉันท์ว่า กลไกการชักนำให้เกิดการตายใน Jurkat เซลล์โดยสารสกัดทั้ง 95EE-FLP และ WE-FLP เกิดผ่านกระบวนการ apoptosis ภายหลัง Jurkat เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดทั้ง 2 เป็นเวลา 24 ชม ผลจากการติดสีของ Hoechst เห็นการหดตัวและการแตกหักของนิวเคลียสที่ถูกทำลายอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.15-4.16) ซึ่งลักษณะของ nucleus ที่พบคล้ายคลึงกับเซลล์ที่บ่ม

ร่วมกับ 40 µg/ml etoposide :ที่ใช้เป็น positive control ที่สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis (Kozmar et al., 2010)

ผลการทดลอง สัณฐานวิทยาของ Jurkat เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ตรงกับลักษณะเฉพาะของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อเกิด apoptosis คือ เซลล์มีขนาดเล็กลง (shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการ blebling ส่วนที่เป็น chromatin เกิดการหดตัว (chromatin condensation) ตามด้วยการหดตัวของ nucleus (nuclear condensation) และ DNA เกิดการแตกหัก (DNA fragmentation) (Pelfrey et al., 1995) การแตกหักของ DNA ยืนยันได้จากผลของ agarose gel electrophoresis ในรูปที่ 4.14 A-D ผลจากการทดลองพบว่าทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้น 300 และ 600 µg/ml สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง Jurkat เกิด apoptosis ได้ที่ช่วงระยะเวลาที่ 12 และ 24 ชม. ของการบ่ม ดังสังเกตจากลักษณะการแตกหักของ DNA เป็นแบบขั้นบันได อันเป็นเอกลักษณ์ของ DNA ของเซลล์ที่เกิด apoptosis ซึ่งการเกิด DNA ladder พบได้เฉพาะ lane ที่เซลล์บ่มร่วมกับสารสกัดที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม และ lane ที่เซลล์บ่มร่วมกับ positive control etoposide (lane ที่มีอักษร P ในรูปที่ 4.14 A-D) ทั้งนี้ DNA ladder ไม่พบในเซลล์ที่เป็น vehicle control ซึ่งไม่ได้รับสารสกัด หรือ etoposide (lane ที่มีอักษร C ในรูปที่ 4.14 A-D) เนื่องจากไม่ถูกชักนำให้เกิด apoptosis นั่นเอง ในกรณีที่เซลล์ไม่ได้ตายด้วยกระบวนการ apoptosis เมื่อ load DNA ใน agarose gel electrophoresis จะมีลักษณะเป็น smear ซึ่งหมายถึง DNA ที่เกิดการแตกหักมีทุกขนาด bp เพราะถูกตัดอย่างไม่เจาะจง (random) ส่วนผลการตรวจสอบ early apoptotic cell ด้วยการใช้ annexin V-PI และ การหลั่ง cytochrome c จาก mitochondrial membrane และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องและยืนยันเช่นเดียวกันว่าสารกสกัดสามารถชักนำให้ Jurkat เซลล์เกิด apoptosis โดยผลการทดลองพบว่า % early apoptotic cell เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสอง (รูปที่ 4.17-4.18) เซลล์ที่จัดเป็น early apoptotic เป็นเซลล์ในจตุภาคที่ 3 เท่านั้น เพราะเป็นเซลล์ที่ย้อมติดสี annexin V ซึ่งแสดงว่าเซลล์เกิด apoptosis เพราะ annexin V สามารถจับกับ phosphatidyl serine ซึ่ง translocate จากด้านในของ cell membrane ออกสู่ผิวด้านนอกของ cell membrane ที่เกิดในระยะเริ่มต้นของการเกิด apoptosis แต่ในระยะเริ่มแรกนี้ cell membrane ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติการยอมให้สารผ่านได้ สี PI จึงยังไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์เพื่อไปจับ DNA ภายในเซลล์ ดังนั้น เซลล์ที่จัดเป็น early apoptotic จึงย้อมติดเฉพาะ annexin V แต่ไม่ติดสี PI การศึกษากลไกของสารสกัดในการชักนำให้เกิดการตายของ Jurkat เซลล์ด้วยกระบวนการ apoptosis พบว่าเกิดผ่านการชักนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c จาก mitochondrial membrane โดยปริมาณของการหลั่ง cytochrome c แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดและระยะเวลาของการบ่มร่วมกับ Jurkat cell (รูปที่ 4.19 -4.20) สารสกัดทั้งสองต้องสามารถทำความเสียหายต่อเยื่อหุ้ม

mitochondria ใน Jurkat ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของ cytochrome c จาก mitochondria สู่ cytoplasm อันเป็นขั้นตอนสำคัญของการเกิด apoptosis เพราะ cytochrome c สามารถจับกับ Apaf-1 ใน cytoplasm เกิด apoptosome ที่สามารถกระตุ้น initiator caspase 9 ที่ไปกระตุ้น executive caspase 3 เกิด apoptosis ได้ในที่สุด (Von Asen et al., 2000; Donovan and Cotter, 2004; Garrido et al., 2006)

แม้งานวิจัยนี้พบว่า สารสกัดสามารถชักนำเซลล์มะเร็ง Jurkat ให้เกิดการตายแบบ apoptosis และส่วนหนึ่งของการชักนำเกิดผ่านกลไกของ intrinsic pathway เกิดการหลั่ง cytochrome c จาก mitochondria แต่งานวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดกระตุ้นให้เกิด apoptosis โดยผ่านกลไกของ intrinsic pathway เพียงอย่างเดียว เพราะแม้การหลั่ง cytochrome c จาก mitochondria จะเป็น pathway หลักของ intrinsic apotoic pathway แต่การเกิด apoptosis ผ่าน extrinsic pathway ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c ได้เช่นกัน โดยการชักนำให้เกิด truncated bid (Kantari and Walczak, 2011) ดังนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของสารสกัดต่อโปรตีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ apoptotic pathway เช่น ศึกษาความสามารถของสารสกัดในการกระตุ้น caspase 9, caspase 8, AIF และ Fas ligand pathway รวมทั้งผลของสารสกัดต่อ pro- และ anti-apoptotic protein ที่สำคัญอื่นๆ เช่น p53, Bad, Bid,BCl-2 และ BCl-X_L เป็นต้น เพราะสารสกัดอาจสามารถชักนำให้เกิด apoptosis ใน Jurkat เซลล์ได้หลายหนทาง ดังตัวอย่างของ etoposide ที่ใช้เป็น positive control ในงานวิจัยนี้ etoposide เป็นยาชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เพราะมีกลไกการออกฤทธิ์ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการ apoptosis ได้หลายรูปแบบ etoposide มีฤทธิ์ยับยั้ง topoisomerase II :ซึ่งเป็น nuclear enzyme ทำหน้าที่คลายเกลียวที่เป็นเกลียวซ้อนเกลียวของ DNA และมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตนเองของ DNA, transcription, การซ่อมแซม DNA และการปรับกายภาพของสาย chromatin (chromatin remodeling) เป็นต้น การยับยั้ง activity ของ topoisomerase II ของ etoposide ส่งผลให้เกิด protein-linked DNA double-strand breaks ที่เสถียรและไม่สามารถซ่อมแซมได้ (Montecucco et al., 2015; Grandela et al., 2008) จึงเกิดการกระตุ้นการสร้าง p53 ซึ่งชักนำให้เกิด apoptosis ได้หลายกลไก เช่น p53 โดยทำหน้าที่เป็น transcription factor ชักนำให้เกิดการสร้างกลุ่มโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิด apoptosis เช่น BAX, PUMA, NOXA และ BID พร้อมกับยับยั้งการสร้างโปรตีนที่ยับยั้งกระบวนการ apoptosis เช่น BCL-2, BCL-X_L นอกจากนั้น p53 ยังสามารถชักนำให้เกิด apoptosis ได้โดยใช้กลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่เป็น transcription factor โดย p53 สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ BCL-2 และ BCL-X_L ที่ผิวของ mitochondria ทำให้เกิดการรั่วไหลของ cytochrome c ออกจาก mitochondria และชักนำให้เกิด apoptosis ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นกลไกหลักของการชักนำให้เกิด apoptosis ของ etoposide (Jamil et al.,

2015) ทั้งนี้ ผลงานวิจัยอื่นที่สนับสนุนคือ ที่ความเข้มข้นสูงของ etoposide สามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis ผ่าน cytochrome c/caspase 9 pathway รวมทั้ง Fas ligand pathway (Wang et al., 2006; Kaufmann and Earnshaw, 2000; Montecucco et al., 2015) ส่วนกลไกการชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง ของสารสกัดฮว่านง็อกจะมีหลายเป้าหมายคล้ายคลึง etoposide หรือไม่ จำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งควรค่าต่อการศึกษาต่อยอดอย่างยิ่ง เนื่องจากผลทดสอบการชักนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c ในรูปที่ 4.19-4.20 ชี้ชัดว่า แม้สารสกัดทั้งสองเป็นเพียงสารสกัดหยาบ แต่ในความเข้มข้นสูง คือ 600 µg/ml มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารบริสุทธิ์ 40 µg/ml etoposide ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

เนื่องจากการสร้างเส้นเลือดใหม่ หรือ angiogenesis เป็นกระบวนการจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต และการแพร่กระจาย (metastasis) ของก้อนเนื้องอก (Fidler and Ellis, 1994., Folkman, 1990., Hart and Saini, 1992., Chen et al., 2009) โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาความสามารถของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ในการยับยั้ง angiogenesis *in vivo* ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็งโดยเลือกศึกษาใน CAM model เนื่องจากเป็นโมเดลที่เรียบง่าย ราคาไม่แพง และ CAM หรือ chicken chorioallantoic membrane เป็น membrane ที่อยู่นอกตัวอ่อนซึ่งมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงเป็นจำนวนมาก จึงเป็นเครื่องมืออย่างดีในการศึกษาเกี่ยวกับหลอดเลือด (blood vessel) และ CAM model เป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยในงานด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น งานทางด้านวิศวกรรมชีวเวช (bioengineering) ด้านพัฒนาการ (development) สัณฐานวิทยา (morphology) ชีวเคมี (biochemistry) ชีวการปลูกถ่าย (transplant biology) งานวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งและยา (Nowak-Sliwinska et al., 2014) เซลล์มะเร็งที่ชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ B16F10 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งผิวหนัง สามารถผลิตเม็ดสี melanin เมื่อรวมกันเป็นกลุ่ม หรือ ถ้าพัฒนาเป็นก้อนเนื้อจะเห็นได้ชัดใน CAM model เนื่องจากเซลล์มีสีดำ จึงสะดวกในการศึกษาและติดตาม นอกจากนั้น B16F10 melanoma มีความสามารถสูงในการ metastasize เมื่อปลูกถ่าย B16F10 ที่ CAM มากกว่า 80% ของเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ สามารถแทรกตัวออก (extravasate) และแพร่กระจาย หรือ metastasis ออกจาก CAM และพัฒนาจนเป็นก้อนเนื้อใหญ่ (macroscopic tumor mass) ภายในระยะเวลาเพียง 4 วัน (Ribatti et al., 2013) ดังนั้น การใช้เซลล์ B16F10 จึงเหมาะสมสำหรับการศึกษาเพื่อต่อยอดงานวิจัยทั้งใน CAM model และ/หรือในหนูเม้าส์ ซึ่ง B16F10 สามารถแพร่กระจายสู่ปอด เป็นก้อนเนื้อเล็ก ๆ ในปอด (lung nodule) ซึ่งมีสีดำ ทำให้สะดวกต่อการนับ nodule หรือสะดวกในการรายงานผลเชิงปริมาณ (Ribatti et al., 2013., Chen et al., 2009) และคุณสมบัติที่สำคัญคือ การปลูกถ่าย B16F10 ใน CAM ก่อให้เกิดการตอบสนองด้วยการสร้างเส้นเลือดใหม่อย่างมากมาย (strong angiogenic response) เทียบเท่ากับการกระตุ้นด้วย angiogenic cytokine fibroblast growth factor-2 หรือ bFGF (Ribatti et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับผลการ

ทดลองในรูปที่ 4.22-4.23 ของงานวิจัยนี้ที่แสดงให้เห็นว่า B16F10 มีคุณสมบัติเป็น strong angiogenic ใน CAM เพราะเมื่อ inoculate ใน CAM เป็นระยะเวลา 24 หรือ 48 ชม. ปริมาณเซลล์ B16F10 ตั้งแต่ $1x10^6$-6 $x10^6$ เซลล์สามารถชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่สูงกว่าการกระตุ้นด้วย 100 ng bFGF อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) และปริมาณการชักนำเพิ่มขึ้นตามปริมาณเซลล์ที่สูงขึ้น งานวิจัยนี้เลือกใช้ 3 $x10^6$ เซลล์ของ B16F10 เป็นปริมาณสูงสุดเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัด ฮว่านง็อก เพราะแม้เพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 2 เท่าคือ $6x10^6$ เซลล์ สามารถชักนำให้เพิ่มการสร้างเส้นเลือดใหม่จาก $3x10^6$ เซลล์ประมาณ 14% และ 16% ที่ 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ สำหรับ bFGF ที่ใช้เป็น positive angiogenic control ในงานวิจัยนี้ เป็นหนึ่งใน angiogenic cytokine ที่เซลล์มะเร็งหลายชนิดสร้างขึ้น เพื่อช่วยในการเจริญเติบโต การแพร่กระจาย และมีความสัมพันธ์กับปัญหาในการวินิจฉัยโรค (Claffey et al., 2001) bFGF มีความสัมพันธ์กับ vascular density ศักยภาพในการแพร่กระจาย และอัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งทรวงอก มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งผิวหนัง melanoma (Ribatti et al., 2012) งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ bFGF เป็น positive control เพื่อเลียนแบบ (mimic) angiogenic activity ของ cytokine ที่สร้างโดยเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลทดลองเป็นไปตามที่คาดหมาย คือ bFGF ที่ 100 ng/ml สามารถชักนำให้เกิดเส้นเลือดใหม่ (neovascularization) เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 4-12 เท่า (แล้วแต่การทดลองในแต่ละครั้ง) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย bFGF ผลในงานวิจัยนี้แสดงชัดเจนว่าเซลล์มะเร็ง B16F10 มีความสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่เหนือกว่า 100 ng/ml bFGF

เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดย B16F10 ไม่ควรแสดงความเป็นพิษโดยทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรง เพราะจำนวนเซลล์มะเร็งที่ลดลง จะส่งผลทางอ้อมให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ลดลง การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัดจึงอาจไม่ใช่กลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด แต่เป็นผลทางอ้อมที่เกิดจากความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งโดยตรงมากกว่า ผลจากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดในการทดลอง (รูปที่ 4.21) พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำ (50-100 µg/ml) ไม่มีผลกระทบต่อ % การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ แต่สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ตั้งแต่ 600-1,500 µg/ml ทำให้เกิดการตายของเซลล์ 30%-70% ตามลำดับสำหรับ WE-FLP และ ประมาณ 36%-82% สำหรับ 95EE-FLP งานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นที่ 300 µg/ml เป็นความเข้มข้นสูงสุดเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัดต่อไป เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้ 95EE-FLP และ WE-FLP ชักนำให้เกิดการตายประมาณ 26% และ 9% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถใช้เป็น maximum tolerated concentration (MTC) ได้ สำหรับ WE-FLP และมีความเป็นพิษที่สูงกว่า MTC อีกเล็กน้อยในกรณีของ 95EE-FLP เนื่องจากทั้งสารสกัด 95EE-FLP ได้จากการสกัดด้วย 95% ethanol ซึ่งถือเป็น universal solvent ที่สามารถสกัดสารทั้งที่ละลายน้ำ

ได้ และที่ละลายน้ำไม่ได้ และสารสกัด WE-FLP ที่แยกเอาส่วนเฉพาะที่ละลายน้ำได้สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเฉพาะชนิดได้ ความเป็นพิษของสารสกัดฮว่านง็อกในการทำลายเซลล์มะเร็ง B16F10 จึงอาจเกี่ยวเนื่องกับส่วนประกอบของสารพฤกษเคมีในส่วนที่ละลายน้ำได้ เช่น flavonoids, apigenin, catechin, gallic acid และ tannic acid (Dieu et al., 2008., Das et al., 2009., Chayarop et al., 2011) เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่ากลุ่มสาร polyphenol.ในพฤกษเคมีสามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์หลายชนิด เช่น T cell leukemia Jurkat cell (Musika and Indrapichate, 2014) มะเร็งกระเพาะอาหาร (AGS, SNU-668, SNU-638) (Kim et al., 2009) และมะเร็งทรวงอก (MDA-MB-231, MCF-7 และ SK-BR-3) Awad et al., 2003; Park et al., 2008; ศศมล ผาสุข และ ประเสริฐ มีรัตน์, 2015).อย่างไรก็ตาม การทำลายเซลล์ B16F10 ก็อาจจะเกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของสารพฤกษเคมีในส่วนที่ไม่ละลายน้ำในสารสกัด 95EE-FLP ได้เช่นกัน

นอกจากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดฮว่านง็อกที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยตรง งานวิจัยนี้ยังตรวจสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่มีผลกระทบต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM ที่เกิดตามธรรมชาติ (natural angiogenesis) การบ่มสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับ CAM เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชม พบว่าผลของสารสกัดฮว่านง็อกต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติใน CAM ขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลาการบ่มของสารสกัด WE-FLP ที่ระยะเวลา 24 ชม ความเข้มข้นสารสกัดสูงสุดที่ไม่ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติอยู่ที่ 600 μg/ml แต่ที่ 48 ชม. ความเข้มข้นสูงสุดอยู่ที่ 300 μg/ml (รูปที่ 4.25B-4.26B) ส่วนสารสกัด 95EE-FLP ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีผลกระทบต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM อยู่ที่ 300 ทั้งที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชม. (รูปที่ 4.25A-4.26A) ข้อมูลที่น่าสนใจคือ เมื่อระยะเวลา 24 ชม. สารสกัด WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่ำ (100-300 μg/ml) สามารถกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ให้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ 48 ชม. สารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลทำให้เส้นเลือดใหม่ที่สร้างขึ้นมีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด ชี้แนะว่าที่ความเข้มข้นต่ำ สารสกัดสามารถชักนำการสร้างเส้นเลือดใหม่ให้เกิดเร็วขึ้น แต่เมื่อเวลาผ่านไป มิได้ส่งผลกระทบต่อจำนวนของเส้นเลือดใหม่ที่สร้างขึ้นตามธรรมชาติใน CAM แต่อย่างใด คุณสมบัติของสารสกัดในการชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามธรรมชาติใน CAM ให้เกิดเร็วขึ้น หรือมีฤทธิ์ส่งเสริมการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis promoter) ด้วยหรือไม่ จำเป็นจะต้องมีการศึกษาและตรวจสอบต่อไป อย่างไรก็ดี ผลทดลองในรูปที่ 4.25-4.26 ชี้ชัดว่าที่ความเข้มข้นสูงของสารสกัด โดยเฉพาะที่ 900 และ 1,500 μg/ml ของ WE-FLP และ 600 μg/ml 95EE-FLP มีความเป็นพิษต่อ CAM เนื่องจากไปลดจำนวนเส้นเลือดเดิมที่มีอยู่ใน CAM ดังปริมาณเส้นเลือดใน CAM มีค่าลดลงจากช่วงระยะของการเริ่มต้นการทดลอง (ระยะเวลาเป็นศูนย์) (ปริมาณเส้นเลือดใหม่ที่แสดงเป็นค่าติดลบในรูปที่ 4.25 และ 4.26) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารสกัดทั้งสองที่ความ

เข้มข้นสูงสุดเพื่อใช้ใน CAM model ที่ 300 µg/ml ที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อการสร้างเส้นเลือดตามธรรมชาติใน CAM ทั้งที่ 24 และ 48 ชม. เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัดต่อไป

การสร้างเส้นลือดใหม่ หรือ angiogenesis เป็นกระบวนการในร่างกายมนุษย์ที่มีการควบคุมอย่างเข้มงวดโดย angiogenic และ angiostatic factors ต่าง ๆ (Folkman and Klagsbrun, 1987) การสร้างเส้นเลือดใหม่ทางพยาธิสภาพเกิดขึ้นในโรคมะเร็ง โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง หรือโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) (Gacche et al., 2015) สารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่สามารถรบกวนขั้นตอนต่าง ๆ ในการสร้างเส้นเลือดใหม่ เช่นเดียวกับ สารที่ส่งเสริมการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่สามารถใช้กระตุ้นให้สร้างเส้นเลือดในบริเวณที่เส้นเลือดถูกทำลาย โดยการกระตุ้นการเจริญของ endothelial cell หรือ การเคลื่อนตัวออกของ endothelial cell ในการแตกแขนงแยกออกเป็นเส้นเลือดใหม่ (Koutrafouri et al., 2001) เนื่องจากการเจริญของก้อนเนื้องอกเกือบทุกชนิด ต้องอาศัยกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงเพื่อการเจริญและการแพร่กระจาย สารซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยเซลล์มะเร็งในก้อนเนื้องอก จึงมีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นกลยุทธ์หนึ่งในการรักษาโรคมะเร็ง ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดผ่านกลไกของการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่พบว่า WE-FLP ที่ความเข้มข้น 30-300 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็ง B16F10 ประมาณ 20-87% ที่ 24 ชม. และ ประมาณ 15-91% ที่ 48 ชม. โดยการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ส่วนสารสกัด 95EE-FLP ที่ 100 µg/ml ยับยั้งได้ใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 41% ที่ 24 และ 48 ชม. (รูปที่ 4.28-4.29) ทั้งนี้ การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็งไม่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารสกัด เพราะความเข้มข้นที่ใช้คือ 30-100 µg/ml WE-FLP และ 100 µg/ml 95EE-FLP ไม่มีความเป็นพิษทั้งต่อ B16F10 และลดการสร้างเส้นลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติใน CAM สิ่งที่น่าสนใจคือที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัด 300 µg/ml ซึ่งเป็นค่า MTC หรือสูงกว่าเล็กน้อยต่อ B16F10 ที่ทำให้เกิดการตายของ B16F10 เพียง 9% ใน WE-FLP และ 26% ใน 95EE-FLP.สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็งได้มากถึง 90% ในกรณีของ WE-FLP และ 100% ในกรณีของ 95EE-FLP ดังปริมาณเส้นเลือดใหม่ใน CAM ที่บ่มกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 300 µg/ml มีค่าเทียบเท่า (ผลของ WE-FLPที่ 24 ชม) หรือต่ำกว่า (ผล WE-FLP ที่ 48 ชม. และ 95EE-FLP ทั้งที่ 24 และ 48 ชม.) (รูปที่ 4.28-4.29) การสร้างเส้นเลือดใหม่ในสภาวะธรรมชาติที่ไม่ได้อยู่ภายใต้อิทธิพลของการชักนำโดยเซลล์มะเร็ง B16F10 ดังนั้น ปริมาณการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่มีค่าสูงถึง 90% หรือมากกว่านั้น จึงไม่ได้ขึ้นกับความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัดต่อ B16F10 เพียงปัจจัยเดียว โดยรวม- ผลงานวิจัยนี้ชี้ชัดว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เล็กน้อย (300 µg/ml) มีศักยภาพสูงของการเป็นสารยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งที่ดี

(strong angiogenesis inhibitor) เมื่อเทียบกับการใช้ความเข้มข้นต่ำ (30-100 µg/ml) ข้อควรสังเกตคือ เซลล์มะเร็งที่บ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลา 48 ชม. ก็ยังสามารถสร้างเส้นเลือดใหม่ให้เพิ่มขึ้นจาก 24 ชม. อย่างมีนัยสำคัญได้ (รูปที่ 4.30) ได้ แต่ถ้าบ่มร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นสูง 300 µg/ml เซลล์มะเร็งไม่สามารถสร้างเส้นเลือดใหม่ให้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใดไม่ว่าจะเป็นที่ระยะเวลา 24 หรือ 48 ชม. แสดงว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในการชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ ไม่ใช่เพียงแค่ชะลอระยะเวลาของการสร้างเส้นเลือดใหม่ให้ช้าลงเท่านั้น อีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจคือ ปริมาณการเพิ่มขึ้นของการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์ B16F10 จาก 24 ชม. ไป 48 ชม. มีปริมาณลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.31) ดังการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM ที่เหนี่ยวนำโดย B16F10 จาก 24 ชม. ถึง 48 ชม. มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 95%, 50%, และ 4% ที่ความเข้มข้น 30, 100 และ 300 µg/ml ของ WE-FLP ตามลำดับ (รูปที่ 4.31) สิ่งที่สำคัญคือ ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 100-300 µg/ml สามารถมีผลเฉพาะการยับยั้งสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็ง B16F10 โดยไม่ส่งผลใดๆ ต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดตามธรรมชาติใน CAM (รูปที่ 4.25-4.26) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นและสำคัญยิ่งสำหรับสารที่ควรค่าต่อการพัฒนาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ต้านโรคมะเร็งในอนาคต

การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์ B16F10 ของสารสกัดจากใบฮว่านง็อกอาจมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด งานวิจัยในปัจจุบันที่ทำการศึกษาใน *in vivo* model ต่าง ๆ รวมทั้งใน CAM assay พบว่า สารพฤกษเคมีหลายชนิดในพืชที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ หรือต้านออกซิเดชันมักมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ร่วมด้วย ตัวอย่างของ สารสกัด ethanol ของ *Pithecellobium Jiringae* สารสกัดจากใบของ *Nuelumbo nucifera* สารสกัด methanol ของ *Sphenocentrum jollyanum* Pierre, สารสกัดชาเขียว รวมทั้งสารพฤษเคมี anthocyanidin delphinidin, flavones และ catechin (Muslim et al., 2012, Lee et al., 2015., Nia et al., 2004., Lamy et al., 2006., Lamy et al., 2002., Cao and Cao, 1999., Gacche et al., 2015) เป็นที่ทราบกันดีว่า ROSs มีบทบาทในการกระตุ้นกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ เอนไซม์ที่เป็นแหล่งกำเนิด ROSs ใน endothelial cell และชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่คือ NADPH oxidase และ endothelial nitric oxide synthase เซลล์มะเร็งหลายชนิดสามารถสร้าง H_2O_2 ในระดับสูง ชักนำสัญญาณให้สร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis signaling) ผ่าน VEGF receptors โดยเฉพาะ VEGFR2 และ angiopoietin-I/Tie-2 receptor หรือ เพิ่มการสร้าง NADPH oxidase 1 ผ่าน hypoxia inducible factor 1 หรือ ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ VEGF นอกจากนั้น oxidized phospholipid และ metabolized products จาก arachidonic acid สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่เช่นกัน (Prauchner 2014., Bochkov et al., 2006) ดังนั้น สารซึ่งมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ อาจจะมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ได้เช่นกัน

โปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในการเป็น “angiogenic switch” กระตุ้น endothelial cell ให้เข้าสู่กระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ ได้แก่ VEGF, angiopoietin-1, angiopoietin-2, IL-8, bFGF, platelet-derived growth factor, angiotensin II, matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) และ metalloproteinase-9 (MMP-9) (Prauchner 2014., Pepper,2001) สารต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดมีกลไกยับยั้งการชักนำการสร้างเส้นเลือดใหม่ *in vitro* และ /หรือ *in vivo* ผ่านการควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของ pro-angiogenic pathway เช่น flavonoid precursor 4-hydroxychalocone (Q797) สามารถควบคุมทั้ง VEGF- และ bFGF ที่ชักนำให้เกิด phosphorylation ของ extracellular signal regulated kinase (ERK)-1/2 และ Akt kinase ใน CAM assay (Varinska et al., 2012) EGCG สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ทั้งในโมเดล *in vitro* และ *in vivo* รวมทั้งใน CAM assay โดยผ่านหลายกลไก คือ ยับยั้งการสร้าง IL-8, ยับยั้ง activity ของ urokinase และของ MMP การกำจัด ROSs ยับยั้งการชักนำ VEGF และป้องกัน neutrophil ในการชักนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Tang and Meydani, 2001., Zhang et al., 2000., Prauchner, 2014) นอกจากนั้น EGCG และ theaflavins จากชา ยังสามารถยับยั้งการจับของ AP-1 กับ DNA ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ เนื่องจาก AP-1 เป็น transcription factor ที่ควบคุมการสังเคราะห์ MMP-1 และ urokinases (Prauchner, 2014) resveratrol ซึ่งเป็นสาร polyphenolic พบในองุ่น มีกลไกยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ใน CAM โดยรบกวนการสร้าง ROSs ผ่าน VEGF ในขั้นตอนของการกระตุ้น Src kinase ที่ทำให้เกิด tyrosine phosphorylation ของ cadherin ใน endothelial (Lin et al., 2003) ส่วน apigenin ยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอกใน nude mice โดยยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 และ VEGF นอกจากนั้น lycopene เป็นอีกหนึ่งตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระในพฤกษเคมีที่ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ในโมเดลของ rat aortic ring และ CAM โดยลด activity ของ MMP-2, urokinase-type plasminogen activator, ลดการส่งสัญญาณ (attenuating signaling) ของ VEG-2 และเพิ่มการแสดงออกของ ตัวยับยั้ง MMP-2 (inhibitors of MMP-2) และตัวยับยั้ง plasminogen activator (plasminogen activator inhibitor-1) (Chen et al., 2012., Prauchner, 2014) สำหรับกลไกใดที่สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ใช้ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์ B16F10 โดยมีผลกระทบ angiogenic factor, anti-angiogenic factor หรือ วิถีทางของสารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ชนิดใด (signal transduction) บ้าง จึงมีความจำเพาะต่อการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เหนี่ยวนำโดยเซลล์มะเร็งเท่านั้น จำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อยอดงานวิจัยในเชิงลึกต่อไป

การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่นอกจากเกิดผ่านกลไกของการต้านอนุมูลอิสระ ยังอาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดได้เช่นกัน เนื่องจากกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่มีความเกี่ยวข้องกับ mediators ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น VEGF ซึ่งเป็น pro-angiogenic stimuli ที่

สำคัญ สามารถชักนำการแสดงออกของ eNOS mRNA และ โปรตีน และเพิ่มการสังเคราะห์ NO• ในเซลล์ endothelial (Hood et al., 1998) และ NO• มีบทบาทเกี่ยวกับการชักนำการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Murohara and Asahara, 2002) นอกจากนั้น COX-2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ยังจัดเป็น mediator ที่สำคัญในการสร้างเส้นเลือดใหม่ และการพัฒนาของการเกิดเนื้องอก ดังที่เซลล์มะเร็งหลายชนิดมีปริมาณของCOX-2 เพิ่มขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับการสร้าง VEGF และการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เพิ่มขึ้น (Gately and Li, 2004; Toomey et al., 2009) ทั้งนี้ Gately และ Li (2004) รายงานว่า proangiogenic activity ของ COX-2 เกิดผ่าน thromboxane A (2), prostaglandin E (2) และ prostaglandin I (2) โดย eicosanoid products ทั้งสามนี้กระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ผ่านกลไกการเพิ่มปริมาณ VEGF ยังสามารถชักนำให้เกิดการสร้าง matrix metalloproteinases กระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่เกิดผ่าน EPGF receptor ส่งเสริมการอยู่รอด (survival) ของ endothelial เซลล์โดยเพิ่มการแสดงออกของ BCl-2 และ การส่งสัญญาณของ Akt (Akt signaling) รวมทั้งเร่งการแตกแขนงของหลอดเลือดใหม่ (vascular sprouting) การเคลื่อนตัว (migration) และการสร้างหลอดเลือด (tube formation) (Gately and Li, 2004) ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านการอักเสบด้วยการลดการสังเคราะห์ NO• ลดปริมาณการสร้าง COX-2 แม้สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ทั้งระดับโปรตีนและระดับยีน แต่จะออกฤทธิ์ยับยั้ง eNOS ด้วยหรือไม่ ควรมีการศึกษาต่อไป เนื่องจากกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ส่งเสริม metastasis ของเซลล์มะเร็ง สารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ของ B16F10 จะสามารถยับยั้งการเกิด metastasis ของ B16F10 ร่วมด้วยหรือไม่ เป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จำเป็นต้องทำการวิจัยต่อยอดต่อไป

สิ่งที่ผู้บริโภคกังวลเกี่ยวกับฮว่านง็อก ไม่ใช่พิษเฉียบพลัน หรือ พิษกึ่งเฉียบพลัน เพราะในประเทศไทยและโดยเฉพาะสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนามได้มีการใช้ใบสดฮว่านง็อกมาช้านานในการรักษาทั้งคนและสัตว์ และไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับพิษเฉียบพลัน หรือ กึ่งเฉียบพลันของฮว่านง็อกแต่ประการใด แต่ผู้บริโภคมักกังวลว่าการบริโภคพืชสมุนไพรต่อเนื่องเป็นระยะนานจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาพิษระยะยาวเบื้องต้นของสารสกัดจากใบฮว่านง็อก โดยเลือกการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากใบสด 95EE-FLP และ WE-FLP ด้วยวิธี Ames test ซึ่งเป็นการทดสอบที่นิยมใช้เพื่อเป็นการคัดกรองเบื้องต้นของสารก่อกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง ทั้งนี้ เพราะสารก่อมะเร็งส่วนใหญ่มักเป็นสารก่อกลายพันธุ์ร่วมด้วย และการกลายพันธุ์เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญยิ่งในการชักนำให้เกิดโรคมะเร็งในร่างกาย (Klaassen, 2008; Griffiths et al., 2000; Tennant, 2014) และสืบเนื่องจากสารมีพิษหลาย

ชนิดที่ออกฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้ จะต้องถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในร่างกาย (metabolize) โดยเอนไซม์ในตับให้เปลี่ยนเป็นสารก่อกลายพันธุ์ โครงการนี้จึงตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดฮว่านง็อก เมื่อมี และไม่มี S9 mix ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เตรียมจากตับหนู rat ที่สามารถ metabolize สารพิษต่างๆ ได้ ผลการวิจัยในตารางที่ 4.3 ชี้ชัดว่าทั้ง 95% EE-FLP และ WE-FLP ที่ปริมาณ 150-600 µg/plate ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของทั้ง TA 98 และ TA100 ในการทดสอบไม่ว่าจะมี หรือ ไม่มี S9 mix ร่วมด้วย แสดงว่าสารสกัด และ metabolize product ของฮว่านง็อกที่ปริมาณ 160-600 µg/plate ไม่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ และจากการสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ สารสกัดที่ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษโดยตรงต่อทั้ง *S. typhimurium* strain TA100 ซึ่งมีการกลายพันธุ์แบบ base-pair substitution และ *S. typhimurium* strain TA 98 ที่มีการกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation และมีค่า MI ต่ำกว่า 2 ทั้งในสายพันธุ์ TA98 และ TA 100 ในขณะที่สารก่อกลายพันธุ์ทั้งหมดที่ใช้เป็น positive control ให้ค่า MI สูงมากอย่างที่ควรจะเป็น คือ MI มีค่าตั้งแต่ 13.56-50.6 ซึ่งบ่งบอกคุณสมบัติที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารอย่างชัดเจน และสารที่เป็น positive control 2-NF และ sodium azide เป็นสารก่อกลายพันธุ์ได้โดยไม่มี S9 mix ส่วนสาร 2 AA เป็น indirect-mutagen ต้องผ่าน N-oxidation โดย CYP1A2 ใน S9 mix จึงกลายเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Carriere et al., 1992) ซึ่งถูกต้องตรงกับที่เคยมีการรายงานมา (Hemanth kumar and Ramesh, 2014; Mortelmans and Zeiger, 2000) ดังนั้น ผลการทดลองชี้ชัดว่าความเข้มข้นของสารสกัดฮว่านง็อกที่ใช้ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วย Ames test และชี้แนะว่าไม่มีความผิดปกติแต่อย่างใดในขั้นตอนของวิธีการทดสอบ รวมทั้ง *S. typhimurium* strain TA 98 และ *S. typhimurium* strain TA100 ที่ใช้ในการทดลองก็ไม่มีความผิดปกติ ไม่เกิดการกลายพันธุ์แบบธรรมชาติ (spontaneous mutation) ที่ผิดสังเกต และมีการกลายพันธุ์อย่างที่ควรจะเป็นกับสารที่ใช้เป็น positive control ที่ยืนยันว่าการทดสอบมีความถูกต้อง ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Pamok et al (2012) ที่รายงานเช่นเดียวกันว่า aqueous และ ethanol extract จากใบฮว่านง็อกที่ 25-100 µg/plate ไม่ส่งผลก่อกลายพันธุ์ต่อ *S. typhimurium* ทั้ง TA98 และ TA100 และงานวิจัยนี้แสดงว่าปริมาณสารสกัดสูงถึง 600 µg/plate ก็ยังไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

บทที่ 6

สรุป

สรุปผลการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อก พบว่าร้อยละปริมาณสุทธิของการสกัดจากใบสดมีค่าสูงสุดไม่เกิน 5% ซึ่งต่ำกว่าการสกัดจากใบตากแห้งที่มีค่าสูงสุดประมาณ 16% ส่วนร้อยละปริมาณสุทธิที่พบสูงสุดประมาณ 85% พบในสารสกัดหยาบที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากสารที่สกัดจากใบสดด้วย 95% ethanol แล้วนำมาแยก fraction อีกทอดหนึ่งด้วย hexane และ น้ำ และเลือกเอาเฉพาะ fraction ที่เป็นน้ำ

2. ทุกสารสกัดที่เตรียมจากใบสดมีค่าปริมาณรวมของ phenolics และ flavonoids สูงกว่าสารสกัดที่เตรียมจากใบแห้ง และสารสกัดที่มีค่าปริมาณรวมของ phenolics และ flavonoids สูงสุดคือ WE-FLP ที่เป็นสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากใบสดที่สกัดด้วย 95% ethanol โดยมีค่าปริมาณรวม phenolics และ flavonoids เท่ากับ 212.47 ± 0.52 mg GAE/ กรัมน้ำหนักแห้ง และ 133.43 ± 11.27 mg CE/กรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

3. สารสกัดหยาบจากใบฮว่านง็อกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณรวมของ phenolics และ flavonoids โดยสารสกัดจากใบสดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH• และ มีค่า reducing power ใน FRAP assay สูงกว่าสารสกัดจากใบแห้ง สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ WE-FLP ที่มีค่า IC_{50} ในการทำลาย DPPH• เท่ากับ 21.55±0.06 µg/ml ซึ่งมีความสามารถน้อยกว่าสารมาตรฐาน vitamin C, catechin และ trolox ประมาณ 5.5, 6.1 และ 3.7 เท่าตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่เตรียมจากใบสดที่สกัดด้วย 95% ethanol (95EE-FLP) มีค่า reducing power สูงสุดใน FRAP assay อยู่ที่ 213.23 ± 1.09 mg VCEAC/กรัม น้ำหนักแห้ง หรือมีความสามารถน้อยกว่าไวตามินซีประมาณ 4.7 เท่า ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย tBuOOH ใน DCFH-DA assay โดย 95EE-FLP ที่ 250 µg/ml มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ 20 µM resveratrol และ 10 µM quercetin

4. ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (50-250 µg/ml) ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ *in vitro* โดยสารสกัดทั้งสองสามารถยับยั้งการผลิต NO เอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS (1 µg/ml) ร่วมกับ IFN-γ (25 U/mL) และ

สารสกัด 95EE-FLP สามารถยับยั้งทั้งการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines TNF-α และ IL-6 ทั้งในระดับโปรตีนและระดับ mRNA ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย 100 ng/ml LPS

5. ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่างชนิดแตกต่างกัน โดยเรียงลำดับความเป็นพิษจากมากไปหาน้อยดังนี้ เซลล์ Jurkat > HepG2 > MCF-7 > PC-3 โดยสารสกัดทั้งสองแสดงความเป็นพิษต่อ peripheral nuclear cell ในคนต่ำกว่าเซลล์มะเร็ง Jurkat ในช่วงระดับความเข้มข้นเดียวกัน

6. สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็ง Jurkat เกิดการตายด้วยกระบวนการ apoptosis ผ่านวิถีทางของ mitochondria ที่ยืนยันจากผลการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ เอกลักษณ์ของ DNA ladder ใน gel electrophoresis การย้อมติดสี annexin V-PI และการหลั่งของ cytochrome c จาก mitochondrial membrane สู่ cytoplasm

7. สารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ 100 และ 300 μg/ml ในระยะเวลา 24 และ 48 ชม. มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่เฉพาะชนิดที่เกิดจากการชักนำโดยเซลล์มะเร็ง B16F10 โดยไม่มีผลกระทบต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ตามธรรมชาติเมื่อทดสอบใน *in vivo* CAM model

8. เมื่อทดสอบด้วย Ames assay ทั้งสารสกัด 95EE-FLP และ WE-FLP ที่ปริมาณ 150-600 μg/plate ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะทั้งที่มีและไม่มี S9 mixไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบฮว่านง็อกที่สกัดจากใบสดด้วยวิธีการปั่นมีปริมาณรวมของสารกลุ่ม phenolics และ flavonoids สูงกว่าสารสกัดที่ได้จากการหมัก หรือ maceration ของใบตากแห้ง สารสกัดจากใบฮว่านง็อกโดยเฉพาะที่สกัดจากใบสด และสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากใบสดที่สกัดด้วย 95% ethanol อีกต่อหนึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย คือมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง การศึกษาในงานวิจัยนี้สนับสนุนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบฮว่านง็อกที่มีการใช้มาช้านาน และเป็นหนึ่งในหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ของสรรพคุณฮว่านง็อกที่ถูกกล่าวอ้าง ฮว่านง็อกเป็นพืชสมุนไพรที่ทรงควรค่าที่ควรได้รับการพัฒนาและศึกษาต่อยอดงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านมะเร็งเพิ่มเติม รวมทั้งการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆเพิ่มเติมดังข้อเสนอแนะต่อไปนี้

1. ปรับปรุงเทคนิคในการเตรียมสารสกัดจากใบสดฮว่านง็อกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของปริมาณสุทธิของการสกัด (recovery yield) ให้สูงขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบทีสกัดด้วย

95% ethanol และสารสกัดส่วนที่ละลายน้ำได้ที่เตรียมจากสารสกัดด้วย 95% ethanol อีกทอดหนึ่งก็มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงทั้งคู่ ดังนั้น จึงควรทำการแยกส่วน (fractionate) สารสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีทางเคมีและวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารพฤกษเคมีเฉพาะชนิดในแต่ละ fraction ที่ละลายในน้ำ หรือ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ พร้อมทั้ง หาปริมาณสารที่น่าจะเป็น active ingredients เช่น rutin, caffeic acid, quercetin, β-sitosterol, stigmasterol, β-sitosterol 3-O-β glucoside, stigmasterol 3-0 methyl ether 7-O-β glucoside, apigennin 7-O-β-glucoside เป็นต้น ทั้งนี้ สามารถศึกษาโดยใช้งานวิจัยที่เคยรายงานเกี่ยวกับส่วนประกอบสำคัญในฮว่านง็อเป็นแนวทางในการตรวจหาสารเฉพาะชนิดได้ (Phan et al., 2003; Dieu et al., 2005, 2006) การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีเฉพาะชนิด หรือ เฉพาะกลุ่มควบคู่กับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยศึกษาว่ากลุ่มสารใดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และ/หรือ ต้านมะเร็ง ช่วยให้สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อยอดในสัตว์ทดลอง และ/หรือในมนุษย์ต่อไป รวมทั้งการ พัฒนาสารสกัดของฮว่านง็อกให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าในเชิงเภสัชวิทยา หรือ อาหารเสริม ที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับด้านสรรพคุณ ไม่ใช่เป็นแค่การกล่าวอ้าง โฆษณาลอย ๆ เหมือนผลิตภัณฑ์สมุนไพรในท้องตลาดทั่วไป

2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฮว่านง็อกเพิ่มเติมว่าสามารถลด oxidative stress โดยเพิ่มการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่เกิดภายในเซลล์ได้หรือไม่ เช่น ผลต่อ endogenous antioxidant enzymes ต่าง ๆ เช่น superoxide dismutase, glutathione peroxidase, heme oxygenase-1, ระดับของ glutathione, ผลต่อ lipid peroxidation เป็นต้น โดยอาจเริ่มต้นใช้ *in vitro* model และต่อยอดงานวิจัยโดยตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน *in vivo* โดยใช้โมเดลของสัตว์ทดลอง

3. ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดฮว่านง็อกเพิ่มเติม เนื่องจาก gene ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น type II phospholipase A2, COX-2,และ iNOS genes สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ platelet-activating factor, leukotrienes, prostagnoids, และ NO (Dinarello, 2000) ดังนั้น นอกจากศึกษาผลของสารสกัดในการยับยั้งการสร้าง NO, iNOS, COX-2 แล้วควรยืนยันการลดระดับของ lipid mediators ที่สำคัญ เช่น prostaglandins, leukotrienes และ platelet activating factorts ร่วมด้วย

4. นอกจากความสามารถของสารสกัดในการยับยั้ง COX-2 ควรศึกษาผลของสารสกัดต่อ COX-1 ร่วมด้วย เนื่องจาก COX-1 เป็น mediator ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของสรีรวิทยา ดังนั้นหากสารสกัดฮว่านง็อก ไปลดระดับ COX-1 ย่อมมีผลข้างเคียง เพราะจะกระทบต่อกระบวนการทำงานปกติของร่างกาย ซึ่งคล้ายกับยาแผนปัจจุบันหลายชนิดที่สามารถลดอาการอักเสบโดยลดระดับ COX-2 แต่ในขณะเดียวกันส่งผลลดการทำงานของ COX-1 ด้วย ดังนั้นถ้าสารสกัดฮว่านง็อกมี

ฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ COX-2 แต่ไม่มีผลต่อ COX-1 สารสกัดฮว่านง็อกก็ควรค่าอย่างยิ่งต่อการต่อยอดงานวิจัยและพัฒนาเพื่อเป็นยาต้านอักเสบได้ในอนาคต

5. ในกรณีที่สารสกัดสามารถยับยั้ง COX-2 และไม่มีผลต่อ COX-1 ใน *in vitro* ควรศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดฮว่านง็อกในสัตว์ทดลองว่าสามารถต้านการอักเสบได้มากน้อยเพียงใด โมเดลสัตว์ทดลองที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีอยู่มากมาย เช่น carrageenan-induced paw edema, acetic acid-induced vascular permeability หรือ arachidonic-acid-induced ear edema เป็นต้น

6. เนื่องจากสารสื่อกลาง หรือ mediators ที่เกี่ยวกับการอักเสบต่าง ๆ เช่น NO, IFN-γ, COX-2, PGE-2 เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญ (potent activator) ของวิถีทางการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (pro-inflammatory signal transduction cascade) ต่าง ๆ เช่น NF-*k*B-inducing kinase, mitogen-activated protein kinase, และ protein kinase C (Pan et al., 2009; Pan et al., 2011) จึงสามารถศึกษากลไกการต้านการอักเสบของสารสกัดฮว่านง็อกเพิ่มเติมในเชิงลึกว่าเกิดผ่านการยับยั้ง transcription factors สำคัญต่าง ๆที่เกี่ยวข้อง เช่น NF-*k*B , NFAT, C/EBP, และ AP-1 เป็นต้น เพื่อดูความสามารถของสารสกัดในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีน รวมทั้ง signaling molecules ต่าง ๆ ที่สำคัญในแต่ละ signaling pathways

7. นอกจากศึกษาผลของสารสกัดในการลด proinflammatory cytokines ของสารสกัดยังอาจศึกษาผลของสารสกัดต่อ acute phase proteins ต่าง ๆ หรือศึกษาผลต่อการเพิ่มการทำงานหรือปริมาณของ anti-inflammatory cytokines เช่น IL-4, IL-10 และ IL-13 รวมทั้งสารกลุ่ม glucocorticoids เพราะสารเหล่านี้มีความสามารถในการลดการชักนำของ COX-2 (Dannhardt and Kiefer, 2001; Wang and Dubois, 2010)

8. ศึกษาต่อยอดเพิ่มเติมใน CAM model ของฤทธิ์ต้านการสร้างเส้นเลือดใหม่ เช่น ขยายเวลาการทดลองและติดตามเพิ่มเติมว่า การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็ง B16F10 ของสารสกัดสามารถส่งผลยับยั้งการพัฒนาของขนาดก้อนเนื้องอก (tumor mass) และการเกิด metastasis ของเซลล์มะเร็งได้มากน้อยเพียงใด

9. ศึกษากลไกของสารสกัดฮว่านง็อกในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่ชักนำโดยเซลล์มะเร็งว่าเกี่ยวข้องกับ pro-angiogenic mediators หรือ anti-angiogenic mediators ที่สำคัญใดบ้าง รวมทั้งผลของสารสกัดต่อ inflammatory mediators และ tumorigenic cytokines เช่น TNF และ IL-6 และ pro-inflammatory cytokines ต่าง ๆ ที่สามารถมีอิทธิพลต่อการพัฒนาการของมะเร็งทั้ง 3 ระยะ คือระยะ initiation, promotion, และ progression รวมทั้งผลต่อ metastasis (Grivennikov and Karin, 2017) เพื่องานวิจัยต่อยอดใน CAM model

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10. ศึกษากลไกของสารสกัดฮว่านง็อกในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis ว่าเกิดผ่าน intrinsic หรือ extrinsic pathway โดยศึกษาผลของสารสกัดต่อ initiator caspase และ protein ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในแต่ละ pathway และการชักนำให้เกิด apoptosis เช่น ผลต่อ caspase 8, caspase 9, apoptosis-inducing factors, surivvin, Apaf-1, Fas receptor. กลุ่ม BCl-2 family ที่เป็น proapoptotic (BCl-2, BCL-X_L) และกลุ่มที่เป็น pro-apoptotic (Bad, Bax, Bid, PUMA, NOXA) รวมทั้ง transcription factor ที่เกี่ยวข้อง p53, Akt เป็นต้น

11. ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดในสัตว์ทดลองเพิ่มเติม โดยเลือก model ทั้งที่เป็น solid tumor model และ metastasis model

12. เนื่องจากการแสดงออกที่มากเกินไป (overexpression) ของ COX-2 เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของมะเร็ง และการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะ colon cancer และ Alzheimer’s disease รวมทั้งการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastatic mutations) (Timothy et al., 2015; Vane et al., 1998) สารซึ่งสามารถยับยั้ง COX-2 ได้ จึงมีแนวโน้มที่อาจจะป้องกันการเกิดมะเร็งและ Alzheimer’sได้ จึงควรศึกษาฤทธิ์การป้องกันการเกิดมะเร็งของสารสกัด โดยเลือกโมเดลการทดลองที่การชักนำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกที่มากเกินไปของ COX-2

13. ลองศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพิ่มเติมที่มีพยาธิสภาพเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่นศึกษาฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน ต้านภูมิแพ้ ต้านการอักเสบที่เกี่ยวกับโรคอ้วน (obesity), โรคอักเสบของลำไส้ (inflammatory bowel disease), หรือโรคไขข้ออักเสบต่าง ๆ เช่น rheumatoid arthritis เป็นต้น

14. ยืนยันว่าสารสกัดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ โดยใช้ *in vivo* model

15. ควรศึกษาส่วนอื่น ๆ ของต้น เช่น ลำต้น ราก เพื่อคัดกรองว่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนส่วนที่เป็นใบหรือไม่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

มูลนิธิสุขภาพไทย. (2552). **สมุนไพรยอดฮิต ฮว่านง็อก และ แปะตำปึง** [On-line]. Available: http://thaihof.log.in.th/articlematichon.

วงศ์สถิต ฉั่วสกุล และ อรัญญา ศรีบุศราคัม. (2551). ฮว่านง็อก (Hoan-Ngoc) สมุนไพรในกระแส. **จุลสารข้อมูลสมุนไพร.** 25(3): 3-6.

ศศมล ผาสุข และ ประเสริฐ มีรัตน์ 2557 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของสารสกัดหยาบฮว่านง็อก. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22(6): 848-860.

สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์ 2548 จากอนุมูลอิสระสู่อะพอพโตโทซิส. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Adrain, C., Creagh, E.M. and Martin, S.J. 2001. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. **The Euopean Molecular Biology Organization Journal** 20(23): 6627-6636.

Aiyegoro, O.A., and Okoh, A.I. 2009. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum.* **International Journal of Molecular Sciences** 10: 4990-5001.

Alessandro, W., Shinbobu, O., Cicatiello, L., and Esumi, H. 1994. Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-γ and bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry** 269(11): 8324-8333.

Aliomrani, M. 2016. Genetic Toxicology. [On line]. Available: http://www. academia. edu/ 31516867/Genetic_ toxilology_2016.pdf.

Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J., and Rodrigues, C.M. 2010. The role of p53 in apoptosis. **Discovery Medicine** 9(45): 145-152.

American Cancer Society. 2013. **Chemotherapy Principles**. [On-line]. Available: http://www. cccsa.ca/modrinke.html.

Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-mirosome mutagenicity test. **Mutation Research** 31: 347-364.

Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. and Patel, H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics** 5(2): 209-219.

Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayounti, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., and Atmani, D. 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry.** 112: 303-309.

Awad, A. B., Roy, R., and Fink, C. S. 2003. β-sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Oncology Reports** 10(2): 497-500.

Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodriguez, J., and Delporte, C. 2008. Alnalgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. **Journal of Ethnopharmacology** 116: 263-269.

Baggott, G.K. 2001. eprint.bbk.ac.uk/81/1Baggott_perspective.pdf

Bandolier. 2001. Beta-sitosterol for benign prostatic hyperplasia [On-line]. Available: http:/www.medicine.ox.ac.uk/bandolier/banda2/b92-4.html.

Baskar, A.A., A.I. Numair, K.S., Paulraj, M.G., Alsaif, M.A., A.I. Muamar, M., Ignacimuthu, S. 2012. B-sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhytdrazine-induced colon cancer. **Journal of Medicinal Food** 15: 335-343.

Bean, G.R., Ganesan, Y.T., Dong, Y., Takeda, S., Liu, H., Chan, P,M., Huang, Y., Chodosh, L.A., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., Cheng, E.H. 2013. PUMA and BIM are required for

oncogene inactivation-induced apoptosis. **Science Signaling** 6(268): ra 20. doi:10.1126/ scisignal. 2003483.

Benzie, I.F.F., and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry** 239: 70-76.

Berges, R.R., Windeler, J., Trampisch, H.J., Senge Th., and the β-sitosterol study group. 1995. Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. **Lancet.** 1995:1529-1532.

Bernstein, H-G., Bogerts, B., and Keilhoff, G. 2005. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. **Schizophrenia Research** 78: 69-86.

Bielenberg, D.R. and Zetter, B.R. 2015. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. **The Cancer Journal** 21(4): 267-273.

Bochkov, V.M., Philppova, M., Oskilkova, O., Kadl, A., Furnkranz, A., Karabeg, Afonyushkin, T., Gruber, G., Breuss, H.J., Minchenko, A., Mechtcheriakova, D., Hohensinner, P., Rychli, K., Wojta, J., Resink, T., Erne, P., Binder, R., and Leitinger, N. 2006. Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. **Circulation Research**. 99: 900-908.

Bouic, P.J., Etsebeth, S., Liebenberg, R.W., Albrecht, C.F., Pegael, K., Van Jaarsveld, P.P. 1996. Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. **International Journal of Immunopharmacology** 18: 693-700.

Brudnak, M. 2000. Cancer-preventing properties of essential oil monoterpenes D-limonene and perillyl alcohol. **Positive Health** 53: 23-25.

Bunea, A., Rugina, O. D., Pintea, A. M., Sconta, Z., Bunea, C. I., and Socaciu, C. (2011). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from romania. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**. 39(2): 70-76

Bustin, S.A. and Nolan, T. 2008. Analysis of mRNA Expression by Real-Tome PCR-Gene-Quantification. [On line]. Available: http://www.gene-quantification.com/bustin-nolan-horizonpress-2008.pdf

Calixto, J. B., Otuki, M. F., and Santos, A. R. S. 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor *k*B (NF-*k*B). **Planta Medica** 69: 973-983

Cao, Y., Cao, R., and Brakenhielm, E. 2002. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13: 380-390.

Cao, Y.. 2007. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **Journal of Clinical Investigation** 117(9): 2362–2368

Cao,Y. and Cao, R. 1999. Angiogenesis inhibited by drinking tea. **Nature** 398 : 381.

Carriere, V., De Waziers, I., Courtois, Y.A., Leroux, J..P., Beaune, P.H. 1992. Cytochrome P450 induction and mutagenicity of 2-aminoanthracene (2AA) in rat liver and gut. **Mutation Research** 268: 11-12.

Chai, J. W., Kuppusamy, U.R., Kanthimathi, M.S. 2008. Beta-sitosterol induces apoptosis in MCF-7 cells. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 16: 28-30.

Chayarop, K., Peungvicha, P., Wongkrajang, Y., Chuakul, W., Amnuoypol, S., and Temsiririrkkul, R. 2011. Pharmacognostic and Phytochemical Investigations of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. ex Lindau Leaves. **Pharmacognosy Journal**. 3(23): 18-23..

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Chen, H., Wang, C.S., Li, M., Sanchez, E., Li, J., Berenson, A., Wirtschafter, E., Wang, J., Shen, J., Li, Z., Bonavida, B., and Berenson, J.R. 2010. A nevel angiogenesis model for screening anti-angiogenic compounds: The chlorioallantoic membrane/feather bud assay. **International Journal of Oncology** 37: 71-79.

Chen, L., Lu, Y., Jia-ming, W., Bo, X., Zhang, L., Ming, G., Zheng, S., Wang, A., Zhang, C., Zhang, W., and Lei, N. 2009. Ligustrazine inhibits B16F10 melanoma metastasis and suppresses angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 386: 374-379.

Chen, M.L., Lin, Y.H., and Hu, M.L. 2012. Lycopene inhibits angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* by inhibiting MMP-2/uPA system through VEGFR2-mediated PI3K-Akt and ERK/p38 signaling pathways. **Molcular Nutrition & Food Research** 56(6): 889-899.

Chun, S-C., Jee, S. Y., Lee, S. G., Park, S. J., Lee, J. R., Kim, S. C. 2007. Anti-inflammatory activity of the methanol extract of moutan cortex in LPS-activated RAW264.7 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 4(3): 327-333.

Chung JH; Eun HC. 2007 Angiogenesis in skin aging and photoaging. **Journal of Dermatology** 34(9): 593-600.

Claffey, K.P., Abrams, K., Shih, S.C., Brown, L.F., Mullen, A., and Keough, M. 2001. Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. **Laboratory Investigation** 81(1): 61-75.

Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., and Sellins, K.S. 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annual Review of Immunology** 10: 267-293.

Constanta, S., and Rodica, S. 2010. Analytical study of the determination of flavonoids in Black Sea algae. **Ovidus University Annals of Chemistry** 21(1): 29-34.

Coulter, J.A., McCarthy, H.O., Xiang, J., Roedl, W., Wagner, E., Robson, T., and Hirst, D.G. 2008. Nitric oxide-a novel therapeutic for cancer. **Nitric Oxide.** 19:192-198.

Crawford T.N;. Alfaro D.V., Kerrison, J.B.; and Jablon, E.P. 2009. Diabetic retinopathy and angiogenesis. **Current Diabetes Reviews** 5(1): 8-13.

Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., and Waterhouse, N.J. 2016. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. **Cold Spring Harber Protocol** 2016(7):pdb.prot087163. doi: 10.1101/pdb.prot087163.

Cuzzocrea, S., Riley, D.P., Caputi, A.P., and Salvemini, D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**. 53(1): 135-159.

Dannhardt, G., and Kiefer, W. 2001. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry** 36: 109-126.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., and Traganos, F. 1992. Feautures of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry** 13: 795-808.

Das, A., Banik, N. L., and Ray, S. K. 2009. Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. **Cancer**. 116(1): 164-176

Das, A., Banik, N.L., and Ray, S.K. 2009. Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. **Cancer** 116(1): 164-176.

Deitch, A., Law, H., and deVere White, R. 1982. A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistrhy** 309: 967-972.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of . Immunological Methods** 89: 271–277.

deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1995. **Chemical Research in Toxicology** 8: 473-477.

Deryugina, E., and Quigley, J. 2008. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. **Histochemistry and Cell Biology** 130(6): 1119-1130.

Detmar M.; Brown., L.F., Claffey, K.P.; Yeo, K.T.; Kocher, O.; Jackman, R.W.; Berse, B.; and Dvorak, H.F. 1994. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. **Journal of Experimental Medicine**. 180(3): 1141-1146.

Devi, U.P. 2005. Basics of carcinogenesis. **Health Administrator**. 17(1): 16-24.

Dieu, H. K., Loc, C. B., Yamasaki, S., and Hirata, Y. 2005. The ethnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam. **Japan Agricultural Research Quarterly** 39(3): 191-196.

Dieu, H. K., Loc, C. B., Yamasaki, S., and Hirata, Y. 2006. The effects of *Pseuderanthemum palatiferum*, a new medicinal plant, on growth performances and diarrhea of piglets. **Japan Agricultural Research Quarterly** 40(1): 85-91.

Dieu, H.K. 2008. Khao sat thanh phan hoa hoc cua la xuan hoa *(Pseuderanthemum palatiferum).* **Tạpchí Khoahọc**. 9: 232-240.

Dinarello, C.A. 2000. Impact of basic research on tomorrow’s medicine: Proinflammatory cytokines. **CHEST** 118:503-508.

Donnelly, M.T., and Hawkey, C.J. 1997. Review article: COX-II inhibitors—a new generation of safer NSAIDs?. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. 11: 227-236.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Donovan, M., and Cotter, T. G. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1644: 133-147.

DrLam, 2009. The Authority on Natural Healing Beata-Sitosterol [On-line]. Available: http://www.drlam.com/opinion/beta-sitosterol.asp.

Düchler, M., and Stepnik, M. 2008. Cytotoxic effects of a combination of three natural compounds to leukemia cells *in vitro*. **Cancer Therapy**. 6: 733-740.

Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hebert, M-E, Lavoie S., Longtin A., Laprise, C., and Legault, J. 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. **Journal of Ethnopharmacology** 111: 22-28.

Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Research** 57(10): 1835-1840.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology** 35: 495-516.

Fahrmann, J.F. and Hardman, W.E. 2013. Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. **Lipids in Health and Disease** 12: 36-48.

Fang, J., Seki, T., and Maeda, H. 2009. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews** 61(4): 290-302.

Feghali, C. A., and Wright, T. M. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**. 2: d12- d26.

Fernald, K., and Kurokawa, M. 2013. Evading apoptosis in cancer. **Trends in Cell Biology** 23(12): 620-633.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Fernandes de Oliveira, A. M., Pinheiro, L. S., Souto Pereira, C. K., Matias, W. N., Gomes, R. A., Chaves, O. S., Vanderlei de Souza, M. D .F., Nóbrega de Almeida, R., and Simões de Assis, T. 2012. Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. **Antioxidants**. 1: 33-43.

Ferri, K.F. and Kroemer, G. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nature** Cell Biology 3: E255-263.

Fidler, I.J. and Ellis, L.M. 1994. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. **Cell** 79: 185-188.

Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine** 285(21): 1182-1186.

Folkman, J. 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent ? **Journal of The National Cancer Institue** 82: 4-6.

Folkman, J., and Klagsbrun, M. 1987. Angiogenic factors. **Science** 235(4787): 442-447.

French, L.e. and Tschopp, J. 2003. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. **Cell Death and Differentiation** 10: 117-123.

Gacche, R., Meshram, J., Shegokar, H., Gond, S., Kamble, S., Dhabadge, V.N., and Utage, B. 2015. Flavonoids as a scaffold for development of novel anti-angiogenic agents: An experimental and computational enquiry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 577-578: 35-48.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., and Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death and Differentiation** 13: 1423-1433.

Gately, S., and Li, W.W. 2004. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. **Seminars in Oncology** 31(2 Suppl. 7): 2-11.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Ghiselli, A., Serafi ni M., Maiani, G., Azzini, E., and Ferro-Luzzi, A. 1995. A fluorescence-based method fr measuring total plasma antioxidant capability. **Free Radical Biology and Medicine** 18: 29-36.

Giang, P.M., Bao, H.V. and Son, P.T. 2003. Phytochemical study on *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk, Acantheaceae. **Journal of Chemistry** 41: 115-118.

Giang, P.M., Bao, H.V., and Phan, T.S. 2005. Study on anti-oxidative activities andpreliminary investigation on antibacterial, antifungal of extracted fraction rich in flavonoides from leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. **TC Duoc hoc**. 9: 9-12.

Goldman, R., and Shields, P. G. 2003. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status. Food Mutagens. **American Society for Nutritional Sciences**. 133: 965S-973S.

Gow, A.J., Luchsinger, B.P., Pawloski, J.R., Singel, D.J., and Stamler, J.S. 1999. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 96:9027-9032.

Grandela, C., Pera, M.F., and Wolvetang, E.J. 2008. P53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells. **Stem Cell Research** 1: 116-128.

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. 2000. An introduction to genetic analysis, 7th edition. New York: W.H. Freeman.

Grivennikov, S. and Karin, M. 2017. Inflammatory cytokines in cancer: tumor necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Annals of the Rheumatic Diseases** 70 (Suppl 1): i104-i108. doi:10.1136/ard.2010.140145.

Guha, M., Mackman, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signalling** 13: 85-94.

Hakura, A., Shimada, H., Nakajiman, M., Sui, H., Kitamoto, S., Suzuki, S. and Satoh, T.2005. Salmonella/human S9 mutagenecity test: a collaborative study with 58 coumpounds. **Mutagenesis** 20(3): 217-228

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of. Immunological. Methods** 119:203–210.

Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., and Phipps, R. P. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology** 23(3): 144-150.

Hart, I.R. and Saini, A. 1992. Biology of tumor metastasis. **Lancet** 339: 1453-1457.

Heier JS. 2013 Neovascular age-related macular degeneration: individualizing therapy in the era of anti-angiogenic treatments. **Ophthalmology**. 120(5 Suppl):S23-5. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.01.059.

Heim, K. E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13: 572-584.

Hemanth kumar, H. and Ramesh, C. 2014. Antimutagenic activity of root extract of *Picrorhiza kurroa* using Ames test in both dose dependant cytotoxic assay and mugagenicity study. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 2(6): 48-52.

Holtz, R.L., Fink, C.S., Awad, A.B. 1998. Beta-sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. **Nutrition and Cancer** 32: 8-12.

Hong, H., Chen, F., Cai, W., and Zhang, Y. 2014. New radiotracers for imaging of vascular targets in angiogenesis-related diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 76: 2-20.

Hood, J.K., Meininger, C.J., Ziche, M., and Granger, H.J. 1998. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. **Heart and Circulatory Physiology** 43: H1054-H1058.

Hsu, S., Bollag, W.B., Lewis, J., Huang, Q., Singh B., Sharawy, M., Yamamoto, T., and Schuster, G. 2003. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 306: 29–34.

Hübner, A., Barrett, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J. 2008. Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. **Molecular Cell** 30(4): 415-425. doi: 10.1016/j. molcel.2008.03.025

Iyengar, R., Stuehr, D. J., and Marletta, M. A. 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and *N*-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 84: 6369-6373.

Jackson, J.R., Seed, M.P., Kircher, C.H., Wiloughby, D.A., and Winkler, J.D. 1997. The condependence of angiogenesis and chronic inflammation. **The Journal of the Feneration of American Societies for Experimental Biology** 11: 457-465.

Jamil, S., Lam, I., Majd, M., Tsai, S-H., and Duronio, V. 2015. Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actons of p53. **Cancer Cell International** 15: 79 doi 10.1186/ s12 935-015-0231-z

Jang, S. I., Kim, Y-J., Lee, W-Y., Kwak, K. C., Baek, S. H., Kwak, G. B., Yun, Y-G., Kwon, T-O., Chung, H. T., and Chai, K-Y. 2005. Scoparone from *Artemisia capillaris* inhibits the release of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon-γ plus LPS. **Archives of Pharmacal Research**. 28(2): 203-208.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Johnson, I.D. and Spence, M.T.Z. 2010. **The Molecular Probes Handbook**: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11th ed. Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon.

Kam, P.C. A., and Ferch, N.I. 2000. Apoptosis: mechanism and clinical implications. **Anesthesia** 55: 1081-1093.

Kang, M. S. (2003). **Handbook of formulas and software for plant geneticists and breeders**. Binghamton, NY: Food Products Press.

Kantari, C., and Walczak, H. 2011. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta** 1813: 558-563.

Karpuzoglu, E., and Ahmed, S.A. 2006. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide** 15(3): 177-186.

Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. 2006. Protocol Staining of Suspension Cells with Hoechst 33258 to Detect Apoptosis. **Cold Spring Harbor Protocol** 2006: 3-4.

Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., and Yamane, Y. 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52: 2391-2396.

Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental Cell Research** 256: 42-49.

Kelm, S. and Schauer, R. 1997. Sialic acids in molecular and cellular interactions. **International Review of Cytology** 175: 137-240.

Khonsung, A., Panthong, A., Chiranthanut, N., and Intahphuak, S. 2011. Hypotensive effect of the water extract of the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum*. **The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer** 65(3-4): 551-558.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Khumpook, T., Chomdej, S., Saenphet, S., Amornlerdpison, D. and Saenphet, K. 2013. Anti-inflammatory activity of ethanol extract from the leaves of Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. **Chiang Mai Journal of Science** 40: 321-331.

Kim, G-N., Kwon, Y-I., and Jang, H-D. 2011. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2, 2’-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu^{2+}-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Toxicology In Vitro** 25: 138-144.

Kim, J. H., Jung, C. H., Jang, B.-H., Go, H. Y., Park, J.-H., Choi, Y.-K., Hong, S. I., Shin, Y. C., and Ko, S.-G. 2009. Selective cytotoxic effects on human cancer cell lines of phenolic-rich ethyl-acetate fraction from Rhus verniciflua Stokes. **The American journal of Chinese medicine**. 37(03): 609-620. 43.

Kim, J-K., Oh, S-M., Kwon, H-S., Oh, Y-S., Lim, S-S., Shin, and H-K. 2006. Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 345: 1215-1223.

Klassen, C. D., Amdur, M. O., and Doull, J. 1996. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (5^{th} ed.) New York: Macmillan Publishing

Kobuchi, H., Kroy-Lefaix, M. T., Christen, Y., and Packer, L. 1997. Ginkgo biloba extract (Egb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW254.7. **Biochemical Pharmacology** 53: 897-903

Kolb, H., and Kolb-Bachofen, V. 1992. Nitric oxide: A pathogenic factor in autoimmunity. **Immunology Today** 13: 157-160.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T and Oers, M.V. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood** 84: 1415-1420.

Korde (Choudhari), S., Sridharan, G., Gadbail, A., and Poornima, V. 2012. Nitric oxide and oral cancer: A review. **Oral Oncology** 48: 475-483.

Koutrafouri, V., Leondiadis, L., Avgoustakis, E., Livaniou, J., Czarnecki, D.S., Ithakissios, G., and Evangelatos, P. 2001. Eject of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1568: 60-66.

Kozmar, A., Greenlee-Wacker, M. C. and Bohlson, S. S. (2010). Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression. **Journal of Innate Immunity** 2(3): 248-259.

Kubola, J., and Siriamornpun, S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. **Food Chemistry** 110: 881-890.

Kumar, S., and Pandey, A.K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Scientific World Journal**: Article ID 162750

Kwolek-Mirek, M. and Zadrag-Tecza, R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research** 14: 1068-1079.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680-685.

Lamy, S., Blanchette, M., Michaud-Levesque, J., Lafleur, R., Durocher, Y., and Moghrabi, A. 2006. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. **Carcinogenesis** 27(5): 989-996.

Lamy, S., Gingras, D., and Bliveau, R. 2002. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. **Cancer Research**. 62: 381-385.

Lander, H. 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction.. **FASEB Journal** 11: 118-124.

Lee, J., Shukla, S., Kim, J., and Kim, M. 2015. Anti-angiogenic effect of *Nelumbo nucifera* leaf extracts in human umbilical vein endothelial cells with antioxidant potential. **PLOS ONE.** 10(2): 712-749.

Lee, Y.G., Lee, W. M., Kim, J. Y., Lee, I-K., Yun, B-S., Rhee, M. H., and Cho, J. Y. 2008. Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. **British Journal of Pharmacology** 154: 852-863.

Leong TT, Fearon U, Veale DJ. 2005. Angiogenesis in psoriasis and psoriatic arthritis: clues to disease pathogenesis. **Current Rheumatology Reports** 7(4): 325-9.

Liang, Y.-C., Huang, Y.-T., Tsai, S.-H., Lin-Shiau, S.-Y., Chen, C.-F. and Lin, J.-K. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis** 20(10): 1945-1952.

Lin, H.-Y., Juan, S-H., Shen, S-C., Hsu, F-L., Chen, Y-C. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. **Biochemical Pharmacology**. 66: 1821-1832.

Lin, M-T., Yen, M-L., Lin, C-Y., and Kuo, M.N. 2003. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. **Molecular Pharmacology**. 64(5): 1029-1036.

Liu, J., Wang, Z-T., และ Ge, B-X. 2008. Andrograpanin, isolated from *Andrographis paniculata*, exhibits anti-inflammatory property in lipopolysaccharide-induced macrophage cells through down-regulating the p38 MAPKs signaling pathways. **International Immunopharmacology**. 8: 951-958.

Liu, L-Z., Jing, Y., Jiang, L.L., Jiang, X.-E., Jiang, Y., Rojanasakul, Y., and Jiang, B.H. 2011 . Acacetin inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis and growth through

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

AKT/HIF-1 α pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 413(2): 299-305.

Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., and Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 50: 2926-2930.

Liu, R. H., and Hotchkiss, J. H. 1995. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. **Mutation Research**. 339: 73-

Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G.P. and Moutsatsou, P. 2010. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Molecular Nutrition & Food Research** 54(4):551-8. doi: 10.1002/mnfr.200900012.

Lokman, N.A., Elder, A.S.F., Ricciardelli, C., and Oehler, M.K. 2012. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. **International Journal of Molecular Sciences** 13: 9959-9970.

Lorsbach, R. B., Murphy, W. J., Lowenstein, C. J., Snyder, S. H., and Russell, S. W. 1993. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. **The Journal of Biological Chemistry**. 268(3): 1908-1913.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. 193(1): 265-275.

Macmicking, J., Xie, Q-W., and Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**. 15: 323-350.

Mahdieh, N. and Rabbani, B. 2013. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. **Iranian Journal of Pediatrics** 23(4): 375-388.

Maioli, E., Torricelli, C., and Pacini, A. 2009. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. **Biological Procedures** 11: 227-240.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Majno, G., and Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. **American Journal of Pathology**. 146(10): 3-15.

Marinkovićl, N, Pašalić, D., and Potočki, S. 2013. Polymorphism of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis. **Biochemia Medica** 23(3): 255-265.

Mariod, A. A., Matthäus, B., Eichner, K., and Hussein, I. H. 2006. Antioxidant activity of extracts from *Sclerocarya birrea* kernel oil cake. **Grasas Y Aceites**. 57(4): 361-366..

Maron, D.M., and Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research** 113: 173-215

Medical Research Council, 2014. Nitric oxide as a signaling molecule. [On line]. Available: https://www.mrc.ac.uk /documents/pdf/nitric-oxide.

Miller, W. J., Kayton, M. L., Patton, A., O'Connor, S., He, M., Vu, H.,Baibakov G., Lorang, D., Knezevic V., Kohn E., Alexander H., Stirling D., Payvandi F., Muller G., and Libuttis. 2004. A novel technique for quantifying changes in vascular density, endothelial cell proliferation and protein expression in response to modulators of angiogenesis using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Journal of Translational Medicine** 2(1): 1-12.

Mineo, M., Nakamura, N., Kitajima, K., Ueda, M., Tsutsishita, Y., Futakis, S and Takaishi, Y. 1997. Benzoquinones inhibit the expression of inducible nitric oxide synthase gene. **Biochemical Biophysical Research Communication** 239: 367-371.

Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna., L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G.M., and Duran, N. 2003. Phenolic compounds and antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**. 82: 409-416.

Mirmajlessi, S.M. and Loit, E. 2016. General principles of real-time PCR: A technology for quantitative detection of phytopathogens. **Journal of Medical and Bioengineering** 5(1): 49-52.

Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. 43(2): 109-142

Montecucco, A., Zanetta, F., and Biamonti, G. 2015. Review article: Molecular mechanisms of etoposide. **Experimental and Clinical Science Journal** 14: 95-108.

Moongkarndi, P., Kosem, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., and Neungton, N. 2004. Antiproliferation, antioxidant and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line**.** **Journal of Ethnopharmacology** 90: 161-166.

Morgan, L., and Dabco, D.C. 2000. Nitric oxide: A challenge to chiropractic. **Journal of the Canadian Chiropractic Association** 44(1):40-48.

Mortelmans, K., and Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research** 455:29-60.

Mosmon, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 65: 55-63.

Murohara, T., and Asahara, T. 2002. Nitric oxide and angiogenesis in cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling** 4: 825-831.

Musika, S and Indrapichate, K. 2014. Cytotoxicity and apoptosis induction of Mintweed (*Hyptis suaveolens* L. Poit) leaf extracts on human T-leukemia cel line, Jurkat cells. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 3(3): 304-317.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Muslim, N., Nassar, Z., Aisha, A., Shafaei, A., Idris, N., Majid, A., and Ismail, Z. 2012. Antiangiogenesis and antioxidant activity of ethanol extracts of *Pithecellobium jiringa*. **Complementary and Alternative Medicine**. 12: 210-219.

Nam, N.H., Kim, H.M., Bae, K.H., and Ahn, B.Z. 2003. Inhibitory effects of Vietnamese medicinal plants on tube-like formation of human umbilical venous cells. **Phytotherapy Research** 17: 107-111.

Naoyo, N., Hirohisa, Y., Takashi, N.,m Toshiharu, K., and Masamichi, K. 2006. Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management** 2(3): 213-219.

Nguyen, Q-V., and Eun, J-B. 2011. Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5(13): 2798-2811.

Nia, R., Paper, D.H., Essien, E.E., Iyadi, K.C., Bassey, A.I.L., Antai, A.B., and Franz, G. (2004). Evaluation of the anti-oxidant and anti-angiogenic effects of *Sphenocentrum Jollyanum* Pierre. **African Journal of Biomedical Research**. 7: 129-132.

Nishikawa, H., Wakano, K., and Kitani, S. 2007. Inhibition of NADPH oxidase subunits translocation by tea catechin EGCG in mast cell. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 362(2): 504-509.

Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., and Iruela-Arispe, M.L. 2014. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis** 17(4): 779-804.

Okawara, M., Katsuki, H., Kurimoto, E., Shibata, H., Kume, T. and Akaike, A. 2007. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. **Biochemical Pharmacology** 73(4): 550-560.

Oliveira, M. G. B. D., Marques, R. B., Santana, M. F. D., Santos, A. B. D., Brito, F. A., Barreto, E. O., Sousa, D. P. D., Almeida, F. R. C., Jr, D. B-P., Antoniolli, Ậ. R., Quintans-Júnior,

L. J. 2012. α-Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology** 111(2): 120-125.

Overbergh, L., Giulietti, D., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. **Journal of Biomolecular Technuques** 14(1): 33-43.

Pamok, S., Saenphet, S., Vinitketkumnuen, U., and Saenphet, K. 2012. Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**. 6(1): 139-145.

Pamok, S., Saenphet, S., Vinitketkumnuen, U., and Saenphet, K. 2012. Antiproliferative effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk extracts on the colon cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**. 6(1): 139-145.

Pan, M.H., Chious, Y.S., Tsai, M.L., and Ho, C.T. 2011. Anti-inflammatroy activity of traditional Chinese medicinal herbs. **Journal of Traditional and Complementary Medicine** 1(1): 8-24.

Pan, M.H., Lai, C.S., Dushenkov, S., and Ho, C.T. 2009. Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57: 4467-4477.

Park, C., Moon, D. O., Rhu, Chung-H., Choi, B. T., Lee, W. H., Kim, G. Y., and Choi, Y. H. 2008. β-Sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis. **Acta Pharmacologica Sinica.** 29 (3): 341-348.

Park, c., Moon, D.O., Rhu, C.H., Chio, B.T., Lee, W.H., Kim, G.Y., and Choi, Y.H. 2007. β-sitosterol induces antiproliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 30: 1317-1323.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Park, E-K., Shin, Y-W., Lee, H-U., Kim, S-S., Lee, Y-C., Lee, B-Y., and Kim, D-H. 2005. Inhibitory effect of Ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** 28(4): 652-656.

Park, Y. C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G., and Packer, L. 2000. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-a secretion, and NF-kB –dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. **FEBS Letter** 465: 93-97.

Peifer, C., and Dannhardt, G. 2004. A novel quantitative chick embryo assay as an angiogenesis model using digital image analysis. **Anticancer Reserch** 24(3A): 1545-1552.

Pelfrey, C. M., Tranquill, L. R., Boehme, S. A., McFarland, H. F. and Lenardo, M. J. 1995. Two mechanisms of antigen-specific apoptosis of myelin basic protein (MBP)-specific T lymphocytes derived from multiple sclerosis patients and normal individuals. **The Journal of Immunology** 154(11): 6191-6202.

Pepper, M.S. 2001. Role of matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 21: 1104-1117.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Diaz-Rubio, M.E., Serano, J., Goñi, I., and Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International** 41: 274-285.

Phan, M. G., Ha, V. B., and Phan, T. S. 2003. Phytochemical study on *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., Acanthaceae. **Journal of Chemistry**. 41(2): 115-118.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. 2015. Free radicals: Properties, sources, targets and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry** 30(1): 11-26.

Plumb, J. A., Milroy, R., and Kkaye, S. B. 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemo-sensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. **Cancer Research** 49(16): 4435-4440.

Popko, K., Gorska, E., Stelmaszczyk-Emmel, A., Plywaczewski, R., Stoklosa, A., Gorecka, D., Pyrzak, B., and Demkow, U. 2010. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-a and the development of inflammation in obese subjects. **European Journal of Medical Research** 15 (Suppl. II): 120-122.

Prauchner, C.A. 2014. Angiogenesis inhibition by antioxidants. **International Journal of Biomdical Science and Engineering** 2(6-1): 7-19.

Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., and Henderson, B.E. 1990. Increased cell division as a cause of human cancer. **Cancer Research** 50: 7415-7421.

Rajabi, M., and Mousa, S.A. 2017. The role of angiogenesis in cancer treatment. **Biomedicines** 5(2): E34. doi:10.3390/biomedinces5020034.

Rampal, G., Khanna, N., Thind, T.S., Arora, S., Viga, A.P. 2012. Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms. **Medicinal Chemistry and Drug Discovery** 3(2): 79-93.

Raso, G. M., Meli, R., Carlo, G.D., Pacilio, M., and Carlo, R.D. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Science** 68: 921-931

Rastogi, R.P., Sinha, R., and Sinha, R. 2009. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. **Experimental and Clinical Sciences Journal** 8: 155-181.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggrawal, B.B. 2010. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine** 49(11): 1603-1616.

Ribatti, D. 2014. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. **Experimental Cell Research** 328: 314-324.

Ribatti, D., Nico, B., Cimpean, A.M., Raica, M., Crivellato, E., Ruggieri, S., and Vacca, A. 2013. B16-F10 melanoma cells contribute to the new formation of blood vessels in the chick embryo chorioallantoic membrane through vasculogenic mimicry. **Clinical and Experimental Medicine** 13: 143-147.

Rieger, A.M., and Barreda, D.R. 2016. Accurate assessment of cell death by imaging flow cytometry. In: Barteneva N., Vorobjev I. (eds) **Imaging Flow Cytometry. Methods in Molecular Biology**, vol 1389. Humana Press, New York, NY

Rieger, A.M., Hall, B.E., Luong, L.T., Schang, L.M. and Bareda, D.R. 2010. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. **Journal of Immunoogical methods** 358: 81-92.

Robbin, R. A., and Sisson, J. H. 1996. Nitric oxide. In: Immunopharmacology of allergic disease. R. G. Townley, and D. K. Agrawal (eds.). pp. 415-431. New York: Marcel Dekker.

Saeed, N., Khan, M. R., and Shabbir, M. 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla.* **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 12:221-233.

Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A.R., and Abdollahi, M. 2014. The story of beta-sitosterol-A review. **European Journal of Medicianl Plants** 4(5): 590-609.

Sak, K. 2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. **Pharmacognosy Review**. 8(16): 122-146

Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T., and Mori, H. 2003. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. **Cancer Letters** 199:139-145.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International.** 32: 407-412.

Sandoval, M., Zhang, X., Liu, X., Mannick, E. E., Clark, D. A. and Miller, M. J. S. 1997. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 amd RAW 264.7 cells : Attenuation by L-ascorbic acid. **Free Radical Biology and Medicine** 22(3): 489-495.

Sarastea, A., and Pulkkic, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research** 45: 528-537.

Scally, A. 2016. The muatation rate in human evolution and emographic interference. **Current Opionion in Genetics and Development** 41: 36-43.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochemica et Biophysica Acta** 1813: 878-888.

Serra, A. T., Duarte, R,.O., Bronze, M.R. and Duarte, C.M.M. 2011. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. **Food Chemistry** 125: 318-325.

Sharma, J. N., Al-Omran, A., and Parvathy, S.S. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology** 15: 252-259.

Sheeja, K., Guruvayoorappan. C., and Kuttan, G. 2007. Antiangiogenic activity of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **International Immunopharmacology**. 7: 211-221.

Shi, Y-X., Xu, Y-K., Hu, H-B., Na, Z., and Wang, W-H. 2011. Preliminary assessment of antioxidant activity of young edible leaves of seven Ficus species in the ethnic diet in Xishuangbanna, Southwest China. **Food Chemistry** 128: 889-894.

Shin, E. M., Zhou, H. Y., Guo, L. Y., Kim, J. A., Lee, S. H., Merfort, I., Kang, S. S., Kim, H. S., Kim, S., and Kim, Y. S. 2008. Anti-inflammatory effects of glycyrol isolated from

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Glycyrrhiza uralensis in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **International Immunopharmacology** 8: 1524-1532.

Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P., and Bajpai, V.K. 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. **Experimental and Toxicologic Pathology** 64: 807-811.

Siervo M; Ruggiero D; Sorice R; Nutile T; Aversano M; Stephan BC; Ciullo M. 2010. Angiogenesis and biomarkers of cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. **Journal of Internal Medicine** 268(4), 338-347.

Singh, N. 2007. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry** 22(2): 6-16.

Singh, N., and Anand, S. 1995. Apoptosis in health and disease. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology** 39(2): 91-94.

Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. In L. Packer (ed). **Methods in enzymology, oxidants and antioxidants**. (Vol. 299, pp 152–178). San Diego: Academic Press.

Song, Y. S., Park, E-H., Hur, G. M., Ryu, Y. S., Lee, Y. S., Lee, J. Y., Kim, Y. M., Jin, C. 2002. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Cancer Letter**. 175: 53-61.

Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A.J. 2003. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatments. **Trends in Pharmacological Sciences** 24(2): 96-102.

Sugano, M., Morioka, H., Ikeda, I. 1977. A comparison of hypocholesterolemic activity of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. **Journal of Nutrition** 107: 2011-2019.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Sunila, E.S., and Kuttan, G. 2006. *Piper longum* inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice. **International Immunopharmacology** 6: 733-741.

Surh, Y. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Review** 3(10):768-780.

Surh, Y.-J., Chun, K.-S., Cha, H.-H., Han, S. S., Keum, Y.-S., Park, K.-K. and Lee, S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-*k*B activation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** 480: 243-268.

Szekanecz Z; Besenyei T; Szentpetery A; Koch AE. 2010. Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**. 22(3): 299-306.

Szliszka, E., Skaba, D., Czuba, Z.P., and Krol, W. 2011. Inhibition of Inflammatory Mediators by Neobavaisoflavone in Activated RAW264.7 Macrophages. **Molecules** 16: 3701-3712.

Tang, F-Y., and Meydani, M. 2001. Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. **Nitrition and Cancer** 41: 119-125.

Tennant, R.W. 2014. Mutagens and carcinogens. Access Science (McGraw-Hill Education). [On line]. Available: http://doi.org/10.1036/1097-8542.441100.

Thi Mai, H. D., Thi Minh, H. N., Pham, V. C., Bui, K. N., Nguyen, V. H., and Chau, V. M. 2011. Lignans and Other Constituents from the Roots of the Vietnamese Medicinal Plant *Pseuderanthemum palatiferum*. **Planta Medica**. 77: 951-954.

Timothy, A., Giridhar, M.N.V., Ghazaleh Shoja,.E.R. 2015. COX-2 inhibitors and their role in cancer prevention and treatment. **Jacobs Journal of Cancer Science and Research** 1(3):016.

Toomey, D.P., Murphy, J.F, and Conlon, K.C. 2009. COX-2, VEGF and tumor angiogenesis. **Surgeon.** 7(3): 174-180.

Vane, J. R., Bakhle, Y. S., and Botting, R. M. 1998. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 38: 97-120.

Varinska, L., Wijhe, M., Belleri, M., Mitola, S., Perjesi, P., Presta, M., Koolwijk, P., Ivanova, L., and Mojzis, J. 2012. Anti-angiogenic activity of the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone. **European Journal of Pharmacology**. 691: 125-133.

Velasco, P. and Lange-Asschenfeldt, B. 2002. Dermatological aspects of angiogenesis. **British Journal of Dermatology** 147(5): 841-852.

Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods** 243: 167-190.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C.A. 1995. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early aoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. **Journal of Immunological Methods** 184: 39-51.

Von Ahsen, O., Waterhouse, N. J., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. 2000 . The harmless release of cytochrome *c*. **Cell Death and Differentiation**. 7: 1192-1199.

Wang, D., and DuBois, R. N. 2010. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. **Oncogene**. 29: 781-788.

Wang, L., Xu, M.L., Liu, J., Wang, Y., Hu, J.H and Wang, M.-H. 2015. Sonchus asper extract inhibits LPS-induced oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in RAW264.7 macrophages. **Nutrition Research and Practice** 9(6): 579-585.

Wang, P., Henning, S.M., and Heber, D. 2010. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PLoS One** 5: e10202ใ

Wang, P., Song, J.H., Song, D.K., Zhang, J., Hao, C. 2006. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy during induction of apoptosis. **Cellular Signalling** 18: 1528-1535.

Wang, S., Zheng , Z., Weng, Y., Yu, Y., Zhang, D., Fan, W., Dai, R., and Hu, Z. (2004). Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. **Life Sciences**. 74: 2467-2478.

Williams, P. L., kJames, R. C., and Roberts, S. M. 2000. Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Wilt, T.J., Macdonald, R., and Ishani, A. 1999. β-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. **British Journal of Urology International**. 83: 976-983.

Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W., and Mitchell, J. B. 1998. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**. 19(5): 711-721.

Wolfe, K. L., and Liu, R. H. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 8896-8907.

Wong, M. L., and Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques** 39(1): 75-85.

Wyllie, A. H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. **The Journal of Pathology** 142: 67-77.

Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X., and Achong, M.K. 1998. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **Journal of Clinical Investigation** 101: 311-320.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Yen, G.C., Chiang, H.C., Wu, C.H. and Yeh, C.T. (2003). The protective effects of *Aspergillus candida* metabolites against hydrogen peroxide-induced oxidative damage to Int 407 cells. **Food Chemical Toxicology** 41(11): 1561-1567.

Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Choi, O.B., Do, M-S., Kang, T.B., Lee, S.W., Azuma, I., and Kim J.B. 1995 . Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extraction on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice. **Cancer Letters**. 97: 83-91.

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R., and Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. **BioTechniques** 23: 525-531.

Zhang, G., Miura, Y., and Yagasaki, K. 2000. Suppression of adhesion and invasion of hepatoma cell in culture by tea compounds through antioxidative activity. **Cancer Letter** 159:169-173.

Zhou, J., Zhang, S., Ong, C-N., และ Shen, H-M. 2006. Critical role of pro-apoptotic Bcl-2 family members in andrographolide-induced apoptosis in human cancer cells. **Biochemical Pharmacology** 72: 132-144

Zidek, Z., and Mašek, K. 1998. Erratic behavior of nitric oxide within the immune system: illustrative review of conflicting data and their immunopharmacological aspects. **International Journal of Immunopharmacology**. 20: 319-343.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก A

การเตรียมสารเคมี

1. Folin-Ciocalteau micro method

- Gallic acid stock solution

Gallic acid	0.500	g
Ethanol	10	mL

เจือจางความเข้มตามต้องการด้วยน้ำ (เก็บที่ 4° C)

- Sodium carbonate solution

Anhydrous sodium carbonate	200	g
DI water	800	mL

นำไปต้ม ทิ้งไว้จนหายร้อน เติมผลึกของ sodium carbonate ลงไปเล็กน้อย ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชม. นำไปกรองและเติม DI water จนมีปริมาตร 1 L (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

2. Aluminium chloride colorimetric method

- 5% sodium nitrite

Sodium nitrite	5	g
Distilled water	100	ml

- 10% aluminium chloride

Aluminium chloride	10	g
Distilled water	100	ml

3. Vanillin assay

- 4% vanillin-methanol

Vanillic acid	4	g
Methanol	100	ml

- 4% HCl-methanol

HCl	4	ml
Methanol	96	ml

4. DPPH assay

- Stock DPPH solution (1 mM)

DPPH	0.0985	g

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Methanol	250	mL

(กรอง และเก็บไว้ใน freezer)

- **Working DPPH (0.2 mM)**

Stock DPPH solution (1 mM)	10	mL
Methanol	40	mL

5. FRAP assay

- **Acetate buffer (300 mM, pH 3.6)**

Sodium acetate.3H_2O	3.1	g
Glacial acetic acid	16	mL

เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L

(เก็บไว้ที่ 4° C)

- **Dilute HCl: 40 mM**

Conc. HCl (1 M)	1.46	mL

เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **TPTZ (10 mM)**

TPTZ	0.062	g
HCl (40 mM)	20	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

- **Ferric chloride 20 mM**

$FeCl_3.6H_2O$	0.108	g
DI water	20	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

- **Working FRAP reagent**

Acetate buffer (300 mM, pH 3.6)	200	mL
TPTZ (10 mM)	20	mL
Ferric chloride (20 mM)	20	mL
DI water	24	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. **Nitrite assay**

- **Griess reagent**

Phosphoric acid	3.5	mL
Sulfanilamide	1	g
N-(1-napthyl)-ethylenediamine (NED)	0.1	g

เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 mL (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

7. **Western blot**

- **RIPA buffer**

PBS 1X	100	mL
NP-40	1	mL
SDS	0.1	g

(เก็บไว้ที่ 4° C)

- **Lysis buffer**

RIPA buffer	1	mL
PMSF (200 mM)	10	μL
Leupeptin (2 mM)	1	μL
E-64 (1 mM)	1	μL

(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

- **6X Sample Buffer**

Tris-base	0.59	g
DI water	8.5	mL
SDS	1.5	g
2ME	0.6	mL
Glycerol	7.5	mL
Bromophenol blue	7.5	mg

(เก็บไว้ที่ 4° C)

- **10% SDS-polyacrylamide gel**

SDS	10	g
DI water	100	mL

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- **10% AP solution**

Ammonium persulfate	0.1	g
DI water	1	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

- **30% acrylamide**

Acrylamide	30	g
bis- acrylamide	0.8	g
DI water	100	mL

(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

- **1.5 M Tris Cl, pH 8.8**

Tris-base	18.165	g
DI water	80	mL

ปรับด้วยกรด HCL ไปที่ pH 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

- **5 M TrisCl, pH 6.8**

Tris-base	6	g
DI water	80	mL

ปรับด้วยกรด HCL ไปที่ pH 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

- **Running buffer (10 X)**

Tris-base	30	g
Glycine	14.4	g
SDS	10	g

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 1 L

(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

- **Running buffer (1X)**

Running buffer (10 X)	100	mL
DI water	900	mL

กรอง (เก็บไว้ที่ 4° C)

- **Blotting buffer (1X)**

Tris-base	3.03	g
Glycine	14.4	g

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Methanol	200	mL

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 1 L (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

- **TPBS 0.1% Tween 20**

PBS 1X	1,000	mL
Tween 20	1	mL

กรอง (เก็บไว้ที่ 4° C)

- **5% skim milk**

Skim milk	0.75	g
TPBS 0.1% Tween 20	15	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Coomassie stain solution**

Coomassie blue	0.05	g
Methanol	80	mL
Glacial acetic acid	14	mL

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **Destaining solution**

Methanol	5	mL
Glacial acetic acid	7	mL

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **10% Resolving gel** (12.05 mL สำหรับ 2 gel)

30% acrylamide	3.984	mL
1.5 M Tris/SDS pH 8.8	2.988	mL
DI water	4.98	mL
10% AP	84	µL
TEMED	15	µL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- **Stacking gel** (4.99 mL สำหรับ 2 gel)

30% acrylamide	0.65	mL
0.5 M Tris/SDS pH 6.8	1.25	mL
DI water	3.05	mL
10% AP	34	µL
TEMED	5	µL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Lowry reagent**

Reagent A (2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH)

Na_2CO_3	5	g
NaOH (0.1 N)	250	mL

(เก็บไว้ที่ 4° C)

Reagent B (0.5% $CuSO_45H_2O$ in 1% sodium citrate)

$CuSO_45H_2O$	0.05	g
Sodium citrate	0.1	g
DI water	10	mL

Reagent C (1 N Folin phenol reagent)

2 N Folin phenol reagent เจือจางด้วย DI water (1:1, v/v)

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

Reagent D

Reagent A : Reagent B (50 : 1)

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Primary antibodies iNOS หรือ COX-2** (1:500)

Primary antibodies (iNOS or COX-2) (200µg/ mL)	20	µL
Skim milk	0.1	g
TPBS	10	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Secondary antibody HRP-conjugated rabbit-anti-mouse-IgG** (1:10,000)

Secondary antibody HRP (200 µg/ 0.5 mL)	1	µL
Skim milk	0.1	g
TPBS	10	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- **Tubulin antibody** (1:1,000)

Tubulin antibody (200 µg/ mL)	10	µL
Skim milk	0.1	g
TPBS	10	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

8. ELISA

- **Citric-phosphate buffer (pH 5.0)**

Diabasic sodium phosphate (0.2 M)	25.7	mL
Ctric acid (0.1 M)	24.3	mL
DI water	50	mL

(ปรับ pH เป็น 5.0)

- **3, 3’, 5, 5’-tetramethyl-benzidine stock solution (6 mg/mL)**

3, 3’, 5, 5’-tetramethyl-benzidine (TMB)	**30**	**mg**
DMSO	**5**	**mL**

(Stock solution สามารถเก็บได้ 1 เดือนที่อุณหภูมิห้อง)

- **H_2O_2 (1%)**

H_2O_2 **(30%)**	**0.1**	**mL**
DI water	**2.9**	**mL**

- **TMB substrate**

Citric-phosphate buffer pH 5.0	12.5	mL
TMB stock solution (6 mg/mL)	200	µL
H_2O_2 (1%)	**50**	**µL**

(เตรียมสด)

- **H_2SO_4 (6 N)**

H_2SO_4 (18 M)	166.67	mL

ปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำ DI

9. **Hoechst 33258 staining**

- **Fixing solution (4% *p*-formaldehyde)**

37% formaldehyde	2.2	ml
PBS, 1X	17.8	ml

- **Hoechst staining solution**

Hoechst 33258 (1 mg/ml)	40	µl
1% TritonX-100	400	µl
DI water	3,560	µl

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(เก็บที่ -20 °C)

10. DNA fragmentation

- **TBE buffer 10X solution**

Boric acid	55	g
Tris base	108	g
0.5 M EDTA, pH 8.0	40	ml
DI water	800	ml

ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml (เก็บที่ 4 °C)

- **TBE buffer 1X solution**

TBE buffer 10 X solution	100	ml
DI water	900	ml

- **1.5% agarose gel**

Agarose gel	0.75	g
TBE buffer 1X solution	50	ml

(เตรียมสด)

- **RNase A 100 mg/ml**

RNaseA	0.05	g
DI water	500	μl

- **Ethidium bromide staining (0.5 μg/ml)**

Ethidium bromide	0.05	g
DI water	100	ml

11. Ames test

- **Vogel-Bonner medium E stock salt solution (VB salt)**

$MgSO_4.7H_2O$	10	g
$C_6H_{10}O_8$	100	g
K_2HPO_4	500	g
$NaNH_4HPO_4.4H_2O$	175	g

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C.

- **40% glucose**

$C_6H_{12}O_6$	40	g

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาที ที่อุณหภูมิ 121 °C.

- **Minimal glucose agar plate**

Bacto agar	5.25	g
VB salt	7	ml

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

40% glucose	17.5 ml

นำ Bacto agar 5.25 g เติม 350 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C หลัง autoclave เติม 7 ml sterile VB salts และ 17.5 ml sterile 40% สารละลาย glucose ผสมให้เข้ากัน เท agar medium ที่เตรียมไว้ใส่ 100 mm petri dishes

- **Oxiod nutrient broth no.2**

Nutrient broth no.2	2.5 ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ด้วย DI water แบ่งสารละลายใส่หลอดละ 12 ml ก่อน autovlave 20 นาที ที่อุณหภูมิ 121 °C.

- **0.1 M L-histidine HCl stock**

L-histidine HCl	2.096 g

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autovclave 20 min ที่อุณหภูมิ 121 °C

- **1 mM L-histidine HCl**

0.1 M L-histidine HCl	1 ml

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autovclave 20 min ที่อุณหภูมิ 121 °C

- **1 mM biotin stock**

0.1 M L-histidine HCl	0.024 g

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autovclave 20 min 121 °C

- **0.5 mM L-histidine HCl-0.5 mM biotin**

1 mM L-histidine HCl	100 ml
1 mM biotin stock	100 ml

- **Top agar**

Agar	0.6 g
NaCl	0.5 g

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autovclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 °C หลังจากนั้นเติม 0.5 mM L-histidine HCl-0.5 mM biotin และเขย่าจนเข้ากัน

- **0.2 M NaH_2PO_4**

$NaH_2PO_4.2H_2O$	14.2 g

ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วย DI water

- **0.2 M Na_2HPO_4**

$Na_2HPO_4.2H_2O$	13.8 g

ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วย DI water

- **0.2 M $NaPO_4$, pH 7.4** (Use: for S9 mutagenic assay)

0.2 M NaH_2PO_4	60 ml
0.2 M Na_2HPO_4	440 ml

ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 0.1 M NaH_2PO_4 หลังจากนั้น autoclave สารละลายเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 ℃

- **1 M KCl**

KCl	7.5	g

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย DI water และ autovclave 20 นาที 121 ℃

- **$NaPO_4$-KCl buffer**

0.5 M $NaPO_4$, pH 7.4	100	ml
1 M KCl	16.5	ml

ปรับปริมาตรเป็น 330 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 ℃

- **$MgCl_2$-KCl salts** (สำหรับ S9 mutagenic assay)

$MgCl_2.6H_2O$	61.5	g
KCl	40.7	g

ปรับปริมาตรเป็น 500 ml ด้วย DI water และ autoclave 20 นาทีที่อุณหภูมิ 121 ℃

- **1 M glucose-6-phosphate** สำหรับ S9 mutagenic assay)

Glucose-6-phosphate	2.82	g
Distilled water	10	ml

- **0.1 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)** (สำหรับ S9 mutagenic assay)

NADP	0.383	g
Distilled water	5	ml

- **Co-factors for standard S-9 mix, total volume 50 ml** (เพื่อใช้ใน NADH regenerating system)

S9 (4%)	2	ml
$MgCl_2$-KCl salts	1	ml
1 M glucose-6-phosphate	0.25	ml
0.1 NADP	2	ml
0.2 M $NaPO_4$, pH 7.4	25	ml
Distilled water	19.75	ml

(เตรียมสารละลายสดทุกครั้งก่อนการทดลองและเก็บที่ 4°C).

ภาคผนวก B

การเตรียมสารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

1. สารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

- FBS/FCS (inactivated, Hyclone)

  ละลาย FBS ที่แช่แข็งใน -20°C ด้วยการนำไปแช่ใน breaker ที่เปิดน้ำไหลผ่าน
  วางขวด serum ไว้ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 37°C
  สังเกตให้ละลายเป็นของเหลวจนเป็นเนื้อเดียวกัน
  Heat inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 20 นาที
  เขย่าเบา ๆโดยการหมุนเป็นวงกลมในน้ำทุก 5-10 นาที
  Aliquot ใน 50 mL conical tube (เก็บไว้ที่ -20°C)

- RPMI 1640 1X

RPMI-1640 1X ด้วย L-glutamine และ phenol red	1	ซอง
$NaHCO_3$	2	g

  ปรับปริมาตรด้วย MQ water ไปที่ 1000 mL
  ปรับ pH ไปที่ 7.4 ตามด้วยการกรอง และเก็บไว้ที่ 4°C

- RPMI 1640 1X (complete media)

FBS (inactivated, Hyclone)	20	mL
HEPES buffer 1 M	3.75	mL
Penicillin+Streptomycin (100 X)	2	mL
RPMI-1640 1X ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น	200	mL

  (เก็บไว้ที่ 4° C)

- PBS 10X

KH_2PO_4	0.288	g
NaCl	18	g
$Na_2HPO_4.7H_2O$	1.5	g
MQ.water	200	mL

  (Autoclave ที่ 121°C, 15 นาที, และเก็บไว้ที่ 4°C)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- **PBS 1X**

PBS 10X	20	mL
MQ.water	180	mL

(เก็บไว้ที่ 4°C)

- **Hepes buffer (1M)**

Hepes	23.83	g
MQ.water	100	mL

(เก็บไว้ที่ 4°C)

- **Penicillin/Streptomycin (100X)**

Penicillin	0.6	g
Streptomycin	1.34	g
PBS 1X	100	mL

(Aliquot และเก็บไว้ที่ -20°C)

- **Trysin/EDTA**

Trysin	0.25	g
EDTA	0.04	g
PBS 1X	100	mL

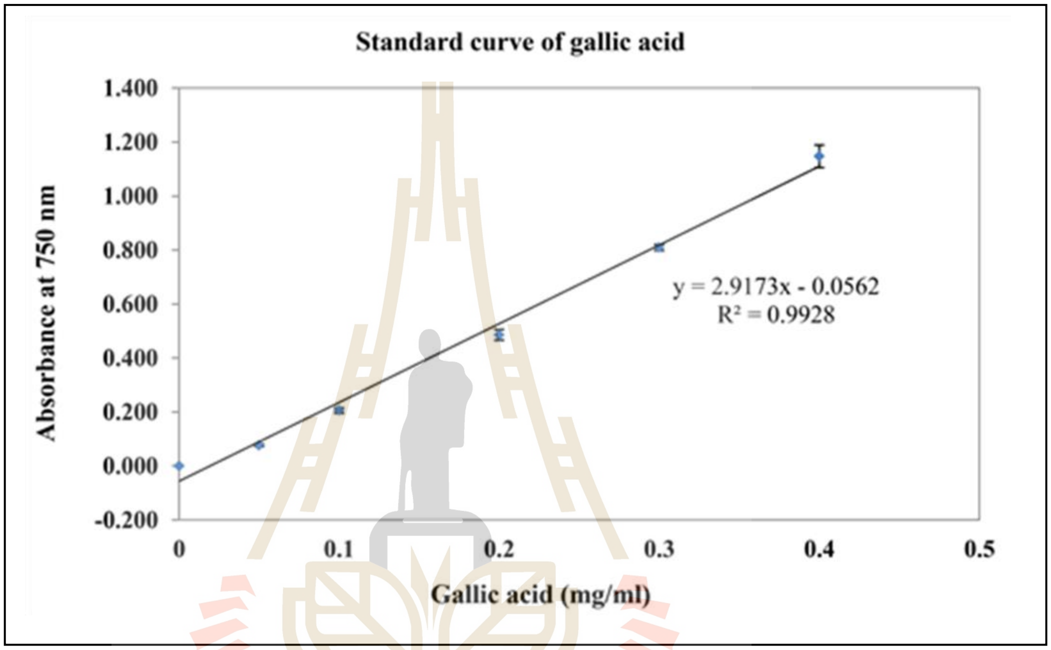
(Aliquot และเก็บไว้ที่ -20°C)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

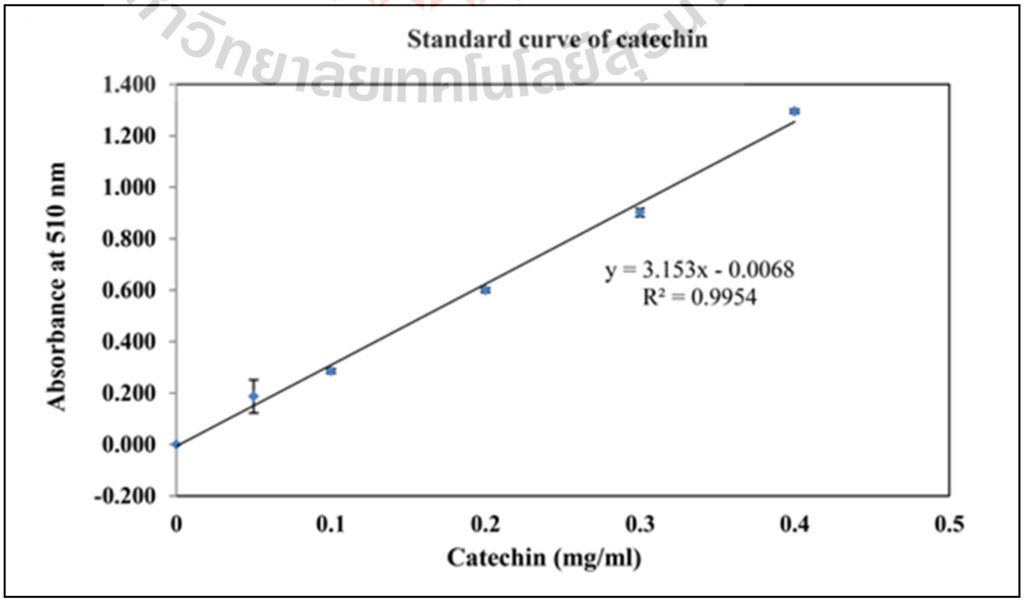
ภาคผนวก C

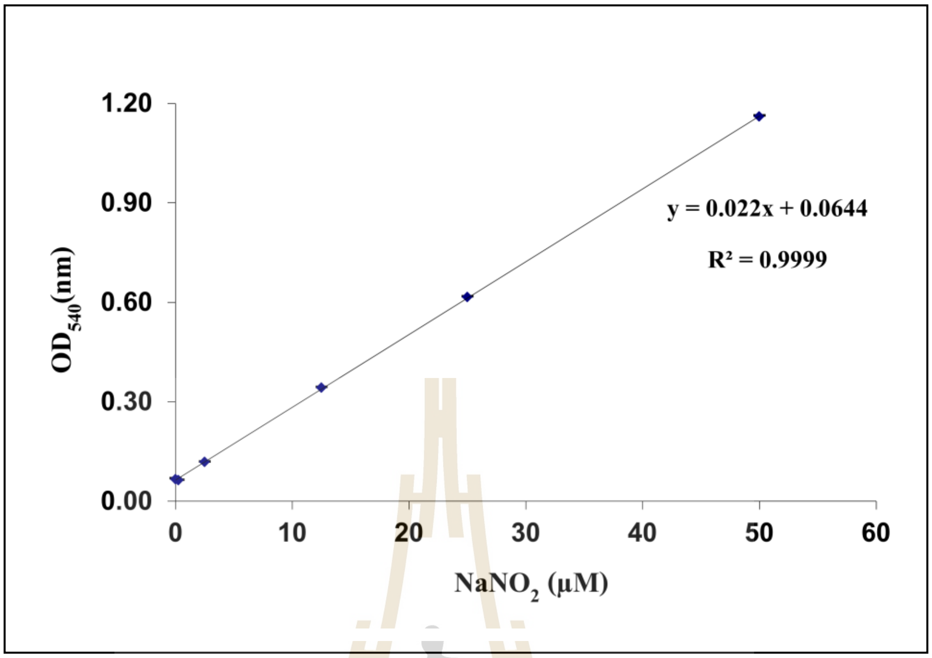
กราฟมาตรฐานของการหาสารพฤกษเคมี ปริมาณ nitrite และโปรตีน

1. กราฟมาตรฐานของ gallic acid ในการวิเคราะห์หา total phenolic content

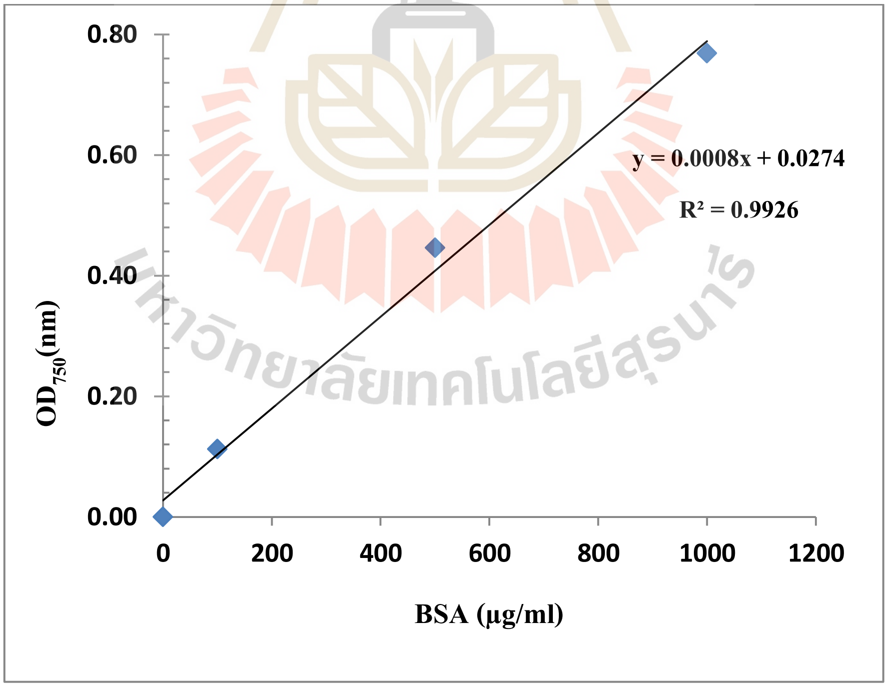


2. กราฟมาตรฐานของ catechin ในการวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoids





4. กราฟมาตรฐานในการหาโปรตีน

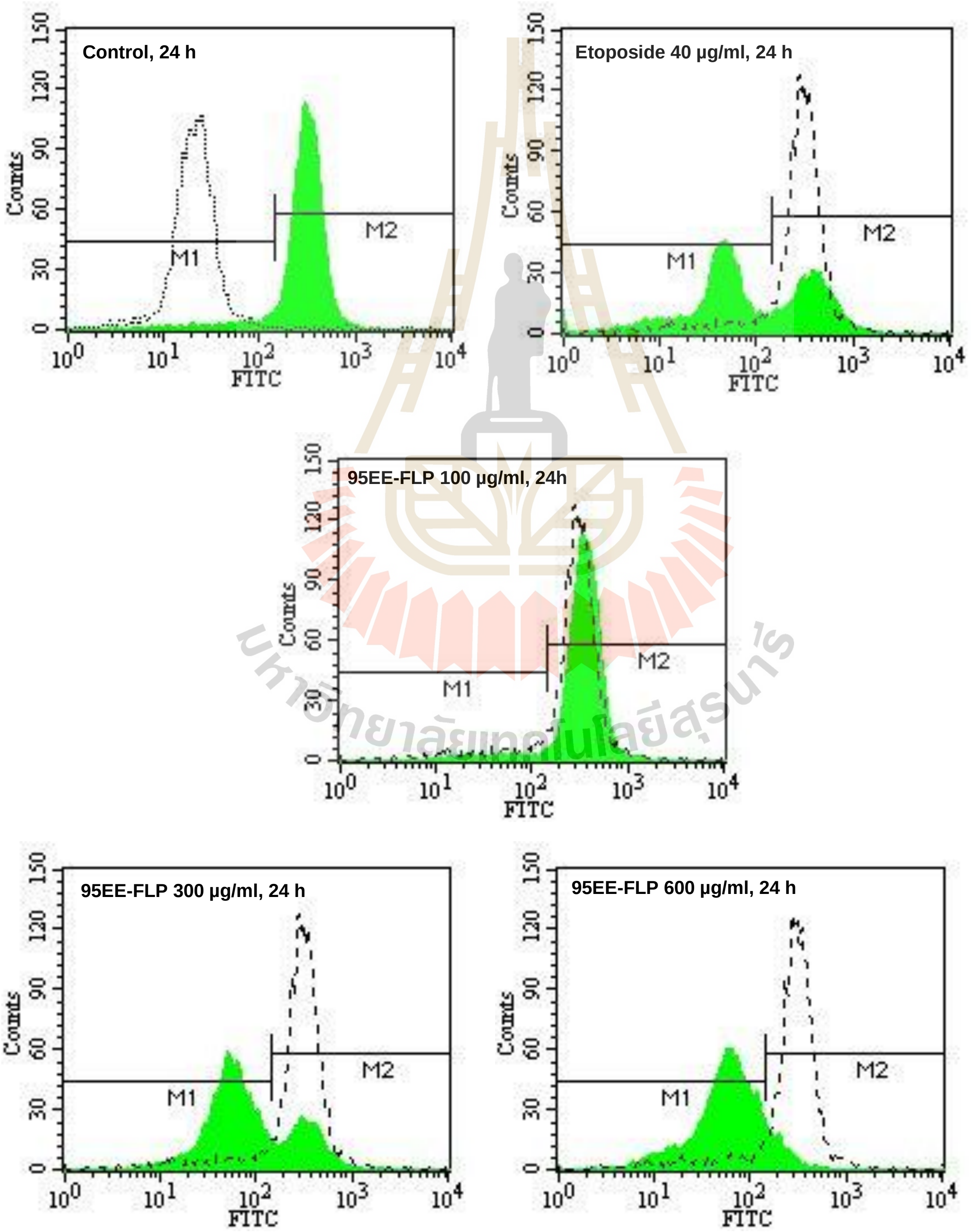


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก D

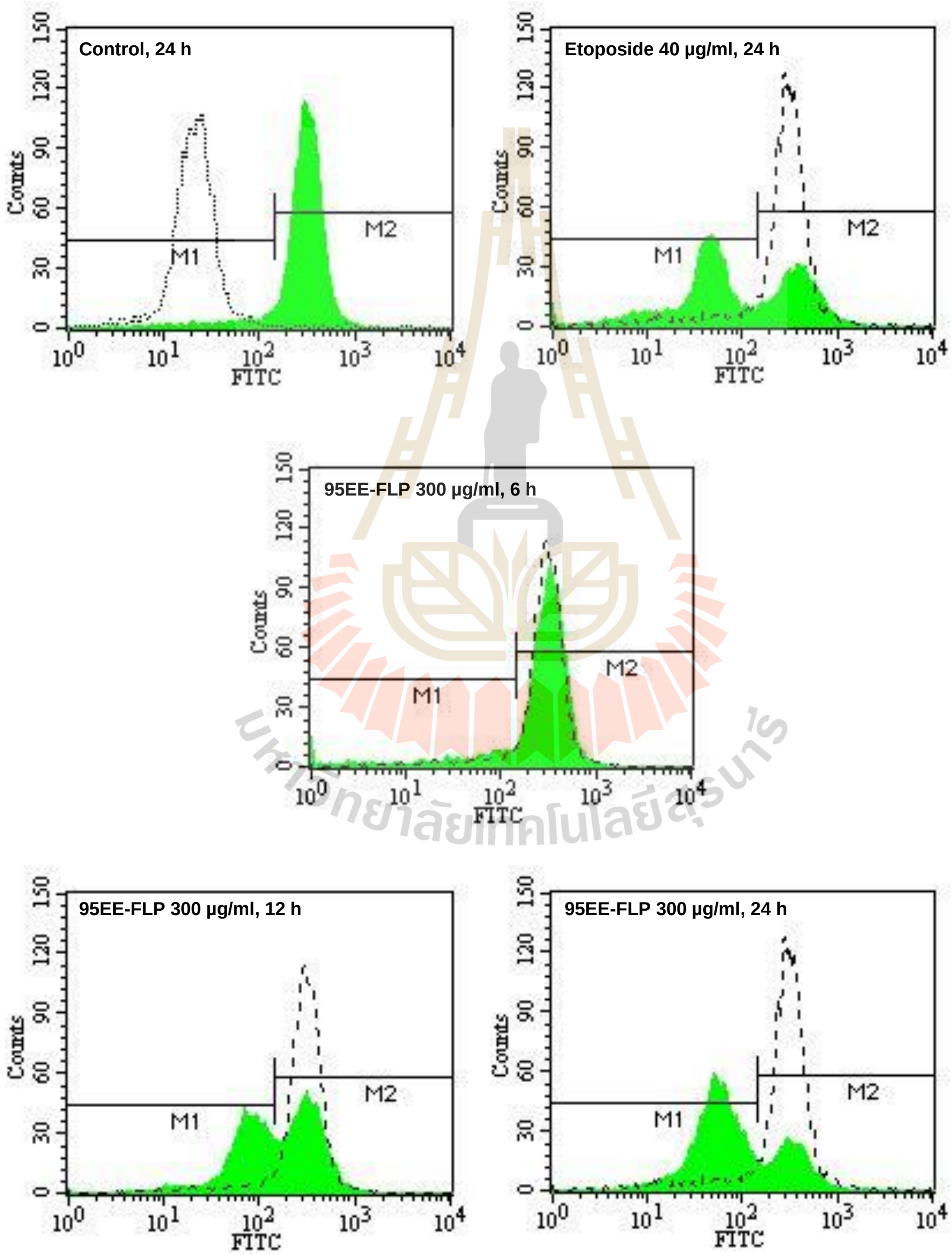
Cytometry histogram ของ immunolabeled cytochrome c

1. ผลของ 95EE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการหลั่งของ cytochrome C .ใน Jurkat เซลล์

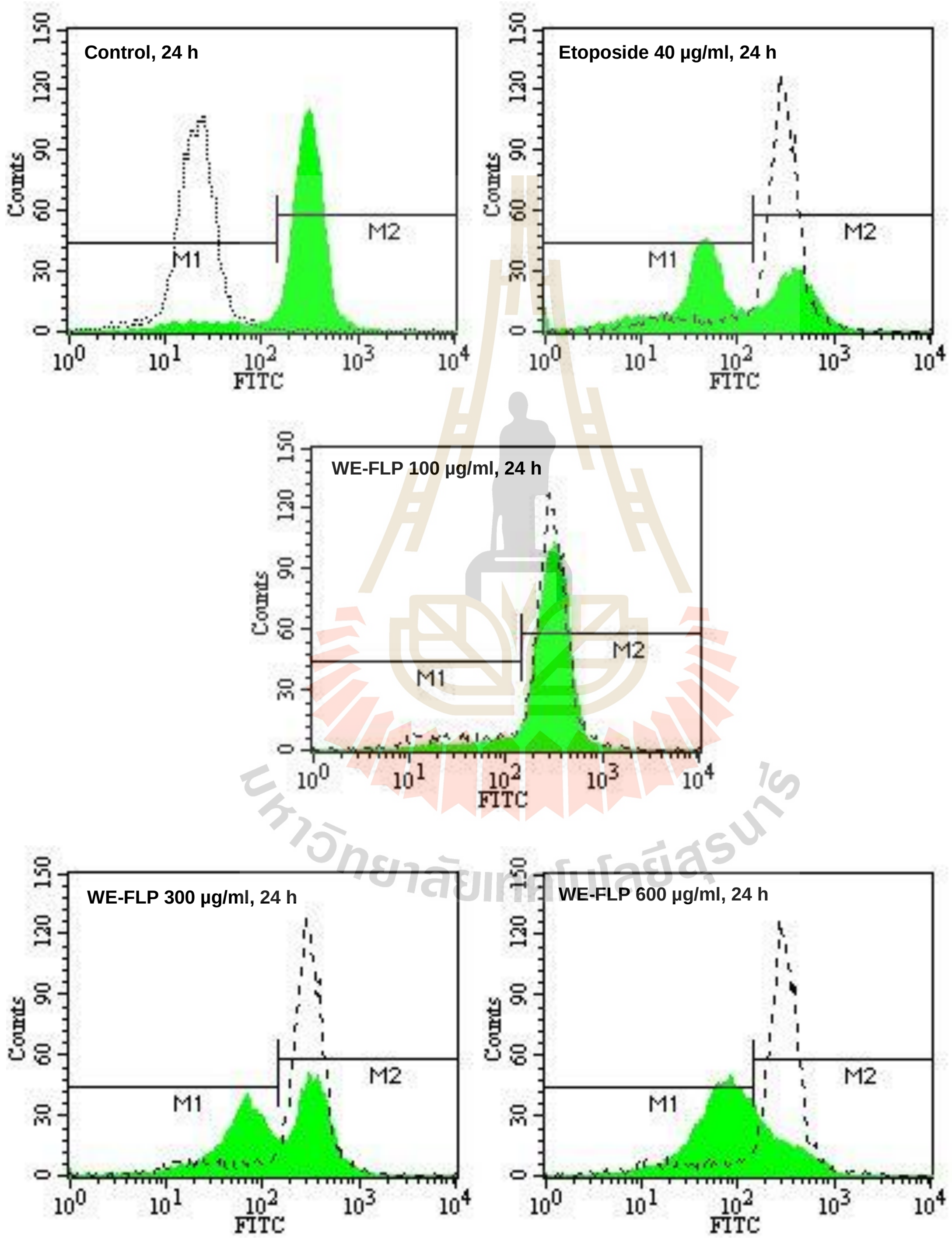


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

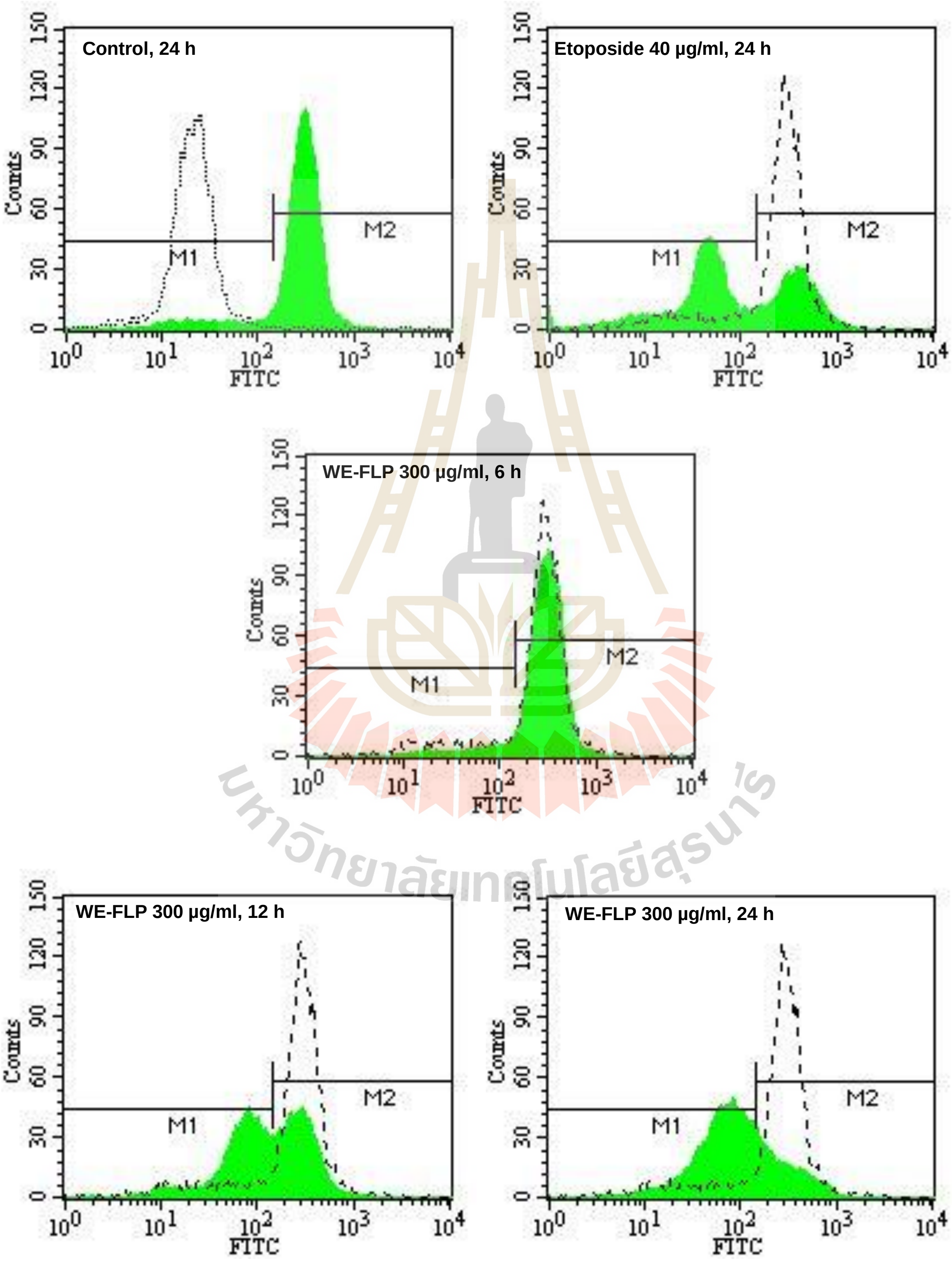
2. การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการหลั่ง cytochrome C ใน Jurkat เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัด 95EE-FLP



3. ผลของ WE-FLP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการหลั่งของ cytochrome C .ใน Jurkat เซลล์



4. การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการหลั่ง cytochrome C ใน Jurkat เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัด WE-FLP



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก E

ชุดตรวจวัด

E1 การสกัด RNA โดยใช้ SV Total RNA isolation kits (Promega, Madison, WI)

1. ภายหลังการทดลอง (เก็บ supernatant และแช่แข็งที่ -80°C เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย ELISA) ล้างส่วนที่เป็นเซลล์ 1 ครั้งด้วย sterile 1XPBS (แช่เย็น)
2. ใส่ 175 µl RNA lysis buffer (RLA) ไปยังเซลล์ที่ล้างซึ่งอยู่ใน 6-well plate ผสมด้วยการ vortex หรือ resuspend เซลล์ด้วย pipette
3. ย้าย cell lysate ไปยังหลอด 1.5 ml microcentrifuge (เก็บแช่แข็งได้ที่ -80°C จนกระทั่งใช้งาน)
4. ใส่ 350 µl RNA dilution buffer (สีฟ้า) ไปยัง 175 µl cell lysate ที่อยู่ใน microfuge ปิดฝาหลอดให้สนิท ก่อนผสมโดยคว่ำและหงายหลอดอย่างนุ่นนวลประมาณ 3-4 ครั้ง- นำหลอดใส่ใน water bath หรือ heating block ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 70 °C บ่มเป็นเวลา 3 นาที (ถ้าบ่มนานกว่า 3 นาที อาจส่งผลต่อความเสถียร (integrity) ของ RNA
5. เมื่อครบ 3 นาที นำหลอดไป centrifuge ที่ 12,000-14,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ที่ 20-25°C
6. ย้าย cleared lysate solution ไป microfuge ใหม่อีกหลอด (พยายามหลีกเลี่ยงการรบกวน pellet debris ที่ก้นหลอด)
7. ใส่ 200 µl 95% ethanol ไปยัง cleared lysate ผสมด้วยการ pipette ขึ้นลง 3-4 ครั้ง เสร็จแล้ว pipette ไปยัง spin column ซึ่งประกอบเรียบร้อย นำไป centrifuge 12,000-14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
8. แยกส่วนที่เป็น spin basket ออกจาก spin column assembly และเทส่วนที่เป็นของเหลวใน collection tube ออก ใส่ spin basket กลับเข้าไปใน collection bube
9. ใส่ 600 µl RNA wash solution ไปยัง spin column assembly นำไป centrifuge ที่ 12,000-14,000 x g 1 นาที
10. เทของเหลวใน collection tube ทิ้ง และวางหลอดใน rack เพื่อตั้งรอ
11. เตรียม DNase incubation mix โดยผสม 40 µl Yellow Core Buffer, 5 µl 0.09 M $MnCl_2$ และ 5 µl DNase I enzyme เข้าด้วยกันในหลอดปลอดเชื้อ (ใส่สารเรียงตามลำดับ) เตรียม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปริมาณ DNase incubation mix เฉพาะที่ต้องการใช้ และผสมด้วยการ pipette ขึ้นลงอย่างระมัดระวังด้วยความนุ่มนวล (**ห้ามใช้ vortex**) ต้องเก็บ DNase I ในน้ำแข็งระหว่างใช้ หรือระหว่างรอให้ละลาย (thaw) เมื่อนำออกจากตู้แช่แข็ง

12. นำ DNase incubation mix ที่เตรียมสด 50 µl ใส่ใน membrane ด้านในของ spin basket ต้องแน่ใจว่าสารละลายที่ใส่ต้องคลุมพื้นที่ผิวใน membrane จนทั่ว ซึ่งสังเกตได้ง่าย เพราะสารละลาย DNase incubation mix มีสีเหลือง

13. หลังจากนั้น บ่มเป็นเวลา 15 นาทีที่ 20-25 °C เมื่อครบเวลา ใส่ 200 µl DNase Stop Solution ไปยัง spin basket และ centrifuge ที่ 12,000-14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที (ในขั้นตอนท้ายนี้ ไม่จำเป็นต้องเทของเหลวใน collection tube ออก)

14. .เติม 600 µl RNA Wash Solution (ที่เติม ethanol แล้ว) และ centrifuge ที่ 12,000-14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที

15. เทของเหลวใน collection tube ออก ล้างอีกรอบด้วยการเติม 250 µl RNA Wash Solution (ที่เติม ethanol แล้ว) และ centrifuge ที่ 20,000 x g เป็นเวลา 2 นาที

16. เปิดฝาออกจาก spin basket ด้วยการบิดออก

17. แต่ละตัวอย่าง ตัดฝาออกจากหลอด 1.5 ml elution tube ย้าย spin basket จาก collection tube ไปยัง elution tube แล้วเติม 100 µl nuclease-free water ลงใน membrane (ให้แน่ใจว่าส่วนที่เป็น membrane ถูกคลุมหมดด้วยน้ำ)

18. นำ spin basket assemblies ไป centrifuge โดยส่วนที่เป็นฝาของ elution tube หงายขึ้น centrifuge ที่ 12,000-14,000 x g เป็นเวลา 1 นาที

19. เอาส่วนที่เป็น spin basket ทิ้ง ปิดฝา elution bube ซึ่งมี RNA บริสุทธิ์ เก็บที่ -70 °C เพื่อนำไปเตรียมเป็น cDNA ต่อไป ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA ที่ได้ ให้วางหลอดที่มี RNA ในน้ำแข็ง และวัดปริมาณด้วย NanoDrop ND-1000 spectrophotometer

E2 การทำ reverse transcription (RT) จาก RNA เป็น cDNA โดยใช้ High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (AB Applied Biosystems, Foster City, CA)

เตรียม 2X Reverse Transcription Master Mix ในหลอดที่แช่ในน้ำแข็งดังนี้:

ส่วนประกอบ	ปริมาตร/ปฏิกริยา (μl)
10 X RT Buffer	2.5
25 X dNTP Mix	1
10 X RT Random primers	2.5
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μl)	1.25
RNase-free H_2O	5.25
ปริมาตรสุดท้าย	12.5

1. Pipette 12.5 μl ของ 2X RT master mix ลงไปในแต่ละหลุม
2. Pipette 12.5 μl ของ ตัวอย่าง RNA ลงในแต่ละหลุม ผสมให้เข้ากันด้วยการ pipette ขึ้นลง 2-3 ครั้ง
3. ปิด plate ให้แน่นและบ่มที่ 25 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 นาที ที่ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชม. และที่ 85°C เป็นเวลา 5 นาที
4. เก็บที่ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 ชม. ก่อนนำมาใช้

E3 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต (QIA prep spin miniprep kit ของ Qiagen)

1. ปิเปตเซลล์ตัวอย่างปริมาตร 200 μl ลงในหลอด microcentrifuge
2. เติม Proteinase K ปริมาตร 20 μl ต่อเซลล์ตัวอย่างปริมาตร 200 μl
3. เติมบัฟเฟอร์ AL 200 μl ต่อเซลล์ตัวอย่างปริมาตร 200 μl
4. จากนั้นผสมทุกอย่างให้เข้ากันโดย vortex เป็นเวลา 15 วินาที
5. บ่มที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}$Cเป็นเวลา 10 นาที
6. เติมเอทานอล 200 μl (96-100%) ต่อเซลล์ตัวอย่างปริมาตร 200 μl และผสมอีกครั้งโดย vortex เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นดูดส่วนใสใส่ในคอลัมน์ QIAamp spin และวางคอลัมน์ QIAamp ใน

หลอดเก็บรวบรวมขนาด 2 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 × g เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งหลอดที่มีตัวกรอง

7. เติมบัฟเฟอร์ AW 500 µl ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ 6000 × g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวางคอลัมน์ QIAamp spin ในหลอดเก็บรวบรวมขนาด 2 ml และทิ้งหลอดเก็บรวบรวมเดิมที่มีสารหลังจากกรองแล้วกรอง

8. เติมบัฟเฟอร์ AW2 500 µl โดยไม่ต้องเปียกรอบขอบ ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 × g เป็นเวลา 3 นาที

9. วางคอลัมน์ QIAamp spin ลงใน microcentrifuge ขนาด 1.5 ml และและทิ้งหลอดเก็บรวบรวมเดิมที่มีสารหลังจากกรองแล้วกรอง

10. เติมบัฟเฟอร์ AE 50 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีแล้วปั่นเหวี่ยง 6000 × g เป็นเวลา 1 นาที จะได้ตัวอย่างดีเอ็นเอ

11. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 10 อีกครั้ง

12. นำตัวอย่าง DNA ในบัฟเฟอร์ AE 5 µg ผสมกับ 100 µg ต่อ ml ของ RNase A (ความเข้มข้นสุดท้าย) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที

13. ตรวจสอบตัวอย่าง DNA ที่ได้ไป load ใน1.5% ของ agarose gel และrun ที่ 70 volt เป็นเวลา 1.50 ชั่วโมง

E4 คำแนะนำการใช้ FlowCellectTM CytoChrome c Kit จากบริษัทผู้ผลิต (Millipore)

1. เติมเซลล์แขวนลอยปริมาตร 200 µl (1x10^{6} เซลล์) ลงในหลอด
2. นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 400xg เป็นเวลา 5 นาที
3. ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 1X PBS ปริมาตร 200 µl ลงในแต่ละหลุมหรือหลอดตัวอย่าง จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 400xg เป็นเวลา 5 ถึง 7 นาที และดูดส่วนใสทิ้ง
5. เติม Permeabilzation Buffer Working Solution ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมหรือหลอดตัวอย่าง และผสมให้เข้ากัน
6. ปิด plate ตัวอย่างหรือฝาครอบแต่ละหลอดและบ่มบนน้ำแข็ง 10 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7. หลังจากบ่ม เติม buffer สำหรับ fix เซลล์ (Fixation buffer Working Solution) ปริมาตร 100 µl

8. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

9. หลังจากบ่มแล้วนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 300xg เป็นเวลา 5 ถึง 7 นาที

10. ดูดส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย 1X Blocking Buffer ปริมาตร 150 µlสำหรับแต่ละตัวอย่าง

11. นำเซลล์ปั่นเหวี่ยงที่ 400xg อย่างน้อย 5 ถึง 7 นาที

12. ดูดส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย 1X Blocking Buffer ปริมาตร 100 µl ต่อตัวอย่าง จากนั้นผสมให้เข้ากัน

13. บ่ม plate หรือหลอดตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

14. หลังจากบ่มแล้วให้เติม Anti-IgG1-FITC Isotype Control หรือ Anti-CytoChrome c-FITC Antibody ปริมาตร 10 µl จากนั้นผสมให้เข้ากัน

15. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด

16. หลังจากบ่มแล้วให้เติม1X Blocking Buffer ปริมาตร 100 µl สำหรับแต่ละตัวอย่าง

17. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 300 xg เป็นเวลา 5 ถึง 7 นาที

18. ดูดส่วนใสทิ้งและเติม 1X Blocking Buffer ปริมาตร 200 µlสำหรับแต่ละตัวอย่าง

19. นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

20. วิเคราะห์ตัวอย่างและอ่านผลภายใน 4 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก F

ผลงานตีพิมพ์

Conference Proceedings:

1. Salangam, B., Suksawaeng, S., Dunkhunthod, B., and Chitsomboon, B. (2016). Anti-angiogenesis of hoan-ngoc (*pseuderanthemum palatiferum* (nees) radlk) extract on B16F10-inoculated CAM model**. The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6).** 21st-23rd January 2016. Pullman Raja Orchid Hotel, Khon Kaen Thailand.
2. Dunkhunthod, B., and Chitsomboon, B. (2014). Antiproliferative effect on cancer cells and mutagenic activity of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. **The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO5).** 6th to 8th May 2014. Moevenpick Resort & Spa Karon Beach, Phuket, Thailand.

Article:

1. Sittisart, P., Chitsomboon, B., and Kaminski, N. E. (2016). *Pseuderanthemum palatiferum* leaf extract inhibits the proinflammatory cytokines, TNF-α and IL-6 expression in LPS-activated macrophages. **Food and Chemical Toxicology.** 97: 11-22.
2. Sittisart, P., and Chitsomboon, B. (2014). Intracellular ROS scavenging activity and downregulation of inflammatory mediators in RAW264.7 Macrophage by fresh leaf extracts of *Pseuderanthemum palatiferum.* **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Article ID 309095, 11 pages

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)
January 21-23, 2016
Organized by Khon Kaen University

Anti-angiogenesis activity of Hoan-Ngoc *(Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.) leave extract on CAM model

Benjamas Salangam[a], Sanong Suksawaeng[b], Benjawan Dunkhunthod[a], Benjamart Chitsomboon*[a]

[a]School of Pharmacology, Institute of Science, [b]School of Pathology and Laboratory Medicine,
Institute of Medicine, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, Thailand 30000

*benja@sut.ac.th phone +66-897 180 683 fax +66-44224185

ABSTRACT

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. (*P. palatiferum*) known as Hoan-Ngoc or Payawanon is one of the most frequently used medical plants in Thailand for treating a variety of inflammatory diseases including cancer. Angiogenesis is a key process in human cancer growth, progression, and metastasis. There are several families of growth factors with angiogenic activities that have been identified such as fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF).This study aimed to investigate the effect of the water extract of *P. palatiferum* (WEP), fractionated from 95% ethanol extract of fresh leaves, on angiogenesis occurring naturally or induced by tumor melanoma B16F10 using the *in ovo* chick chorioallantoic membrane (CAM) model. The results showed that B16F10 induced a stronger angiogenic response than that of 100 ng/ml of angiogenic cytokine basic fibroblast growth factor (bFGF) ($p < 0.05$). No lethality of chick embryos was observed post exposure to WEP at 100-1,500 g/ml for 24 and 48 hours. WEP at 100-300 µg/ml selectively and significantly suppressed the B16F10-induced angiogenesis by about 21 to 91% at 24 and 48 hr. (p <0.05) and did not inhibit the normal neovascularization on the CAM. Overall, the data suggested that WEP might exhibit anti-cancer B16F10 cells, at least in part, through its anti-angiogenesis activity.

Keywords: anti-angiogenesis, *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., B16F10 cell, CAM model

1. INTRODUCTION

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk (*P. palatiferum*) is a new medicinal plant belonging to the Acanthaceae family. Its vernacular names are “Hoan-Ngoc”, “Wan ling” or “Payawanorn”. Hoan-Ngoc leaves have been reported to possess many pharmacological properties including high efficiency against cancer through apoptosis induction [1]. The leaf extract of Hoan-Ngoc showed high antioxidant activity against hydrogen peroxide radicals in the human blood. The ethyl acetate extract of the leaves showed strong antibacterial and antifungal activities [2]. *P. palatiferum* is used widely as a medicinal plant in Thailand to treat various diseases such as hypertension, diabetes, and tumor [3]. Previous work from this laboratory has revealed anti-inflammatory activity of the crude water leave extract of Hoan-Ngoc as evidenced by decreased nitric oxide production and suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide and interferon gamma-activated RAW 264.7 cells [4]. As angiogenesis is essential in almost all tumor growth, progression, and metastasis, and it is related and is promoted by inflammation, Hoan-Ngoc which possesses anti-inflammatory property may exert its activity against various cancers through targeting the angiogenesis pathway. Therefore, this study aimed to investigate anti-angiogenic activity of the crude water leave extract of Hoan-Ngoc.

2. MATERIALS AND METHODS

Preparation of the water leaves extract of *Pseuderanthemum palatiferum*

Fresh leaves of Hoan-ngoc were blended in 95% ethanol and filtered through gauze. The extract was centrifuged at 3,500 x g for 10 minutes and then the supernatant was filtered through a Whatman No.1 filter paper. After that, the ethanolic filtrate was concentrated using a vacuum rotary evaporator and lyophilized into powder of ethanol crude extract (EEP). The EEP was partitioned between hexane and water (1:1, v/v). The water fraction was collected, centrifuged at 14,000 x *g* for 10 min at 4 ^{o}C, and then the supernatant was filtered through a Whatman No.1 filter paper. After that, the water fraction was evaporated and lyophilized into powder of water fraction of 95% ethanol crude extract (WEP).

Cell culture

B16-F10 (mouse melanoma cell line) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA). B16-F10 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin without HEPES. The cells were maintained at 37 ºC in 5% CO_2 and 95% humidity.

B16F10 and bFGF- induced angiogenesis in chick CAM model

Five-day-old chick embryos were purchased from Suranaree University of Technology Farm. An approximately 2 cm^2 window was cut in the shell over the false air sac, allowing access to the CAM. Angiogenesis in the chick CAM was induced by adding 10 µl of 100 ng/ml basic-fibroblast growth factor (bFGF) or 10 µl DMEM (uninduced control) onto a sterile filter paper disc placed onto the CAM. For tumor induction, pellets of 1×10^6, 3×10^6 or 6×10^6 B16F10 cells were inoculated directly onto the CAM. Then, 30 µl 100 U/ml penicillin was immediately added to the placed disc or to the tumor pellet in the CAM prior covering tumor pellet with a paper disc (1 disc/CAM). The exposed hole in the shell of each egg was closed with tape and further incubated at 37 ºC in 5% CO_2 and 95% humidity for 24 hours and 48 hours. Before and after incubation, the images of each treated CAM were captured and the number of blood vessels in contact with the paper disc within the focal plane of the CAM were quantified when viewed under a stereomicroscope.

Cytotoxic effect of WEP against B16F10

To rule out the direct cytotoxicity of WEP on B16F10, the effect of WEP on cell viability of B16F10 was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as previously described [5].

The effect of WEP on chick chorioallantoic membrane (CAM)

To find out the concentration of WEP that was not toxic in the CAM model, the effects of WEP on natural angiogenesis in the CAM was evaluated at 24 and 48 hours post exposure. A filter disc in the presence or absence of different concentrations (100-1,500 µg/ml) of WEP was placed upon the CAM and 30 µl 100 U/ml penicillin was immediately added. The exposed hole in each egg was closed and incubated for 24 hours and 48 hours. Angiogenesis at each time point was quantified as described above.

The effect of WEP on B16F10-induced agiogenesis in CAM

A Pellet of 3×10^6 B16F10 cells were placed directly onto the CAM, then a filter disc in the presence or absence of different concentrations (100-300 µg/ml) WEP was placed upon the CAM prior adding 30 µl 100 U/ml penicillin. The exposed hole in each egg was closed with tape and further incubated for 24 hours and 48 hours. Angiogenesis at each time point was quantified as described above.

All experiments were performed at least twice with four replicates per treatment, unless stated otherwise. Data shown are representative of at least two independent experiments with similar results.

3. RESULTS

When compared to the uninduced control, the neovascular vessels were increased 12 and 4 folds upon exposure to the angiogenic control 100 ng/ml of bFGF for 24 and 48 hours, respectively (Figure 1). B16F10 also increased the number of neovascular vessels in both dose- and time-dependent manners (p < 0.05). Notably, the increased number of neovascularization induced by B16F10 was significantly greater (p < 0.05) than that of 100 ng/ml of bFGF in both time points. Furthermore, the angiogenesis induction by both B16F10 and bFGF were significantly higher at 48 hours than 24

hours (Figure 1). As doubling the cell number of B16F10 from 3×10^6 to 6×10^6 cells only increased the number of neovascular vessels by about 16%, 3×10^6 cells of B16F10 was selected for further study of anti-angiogenesis activity of WEP on the CAM.

The result of cytotoxicity of WEP towards B16F10 in Figure 2A showed that WEP at the concentration of 50 and 100 µg/ml had no toxicity towards B16F10 cells ($p < 0.05$), whereas 300 µg/ml of WEP decreased the viability of B16F10 by 8.97%. WEP at 600-1500 µg/ml showed the cytotoxicity towards B16F10 by 30-70%. Therefore, the concentration from nontoxic till maximum tolerated concentration of WEP (50-300 µg/ml) was selected for further study in the B16F10-induced angiogenesis CAM model. The results in Figure 2B showed that exposure to WEP up to 300 µg/ml for 24 and 48 hour did not decrease the natural neovascular formation in the CAM. In contrast, exposure to higher concentration of WEP (900 and 1,500 µg/ml for 24 hr., and 600-1,500 µg/ml for 48 hr.) could suppress the natural neovascularization. In spite of some toxicity on neovascular formation of WEP at high concentrations, there was still no lethality of the chick embryo was observed in any treatment groups. Consequently, the concentration up to 300 µg/ml of WEP which had no suppression on natural angiogenesis generation was chosen for subsequent anti-angiogenesis study.

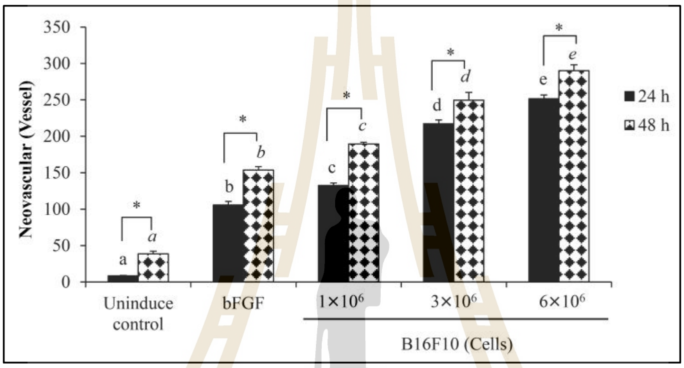


Figure 1. Comparison of angiogenesis induction by bFGF and B16F10 in the CAM model at 24 and 48 hours. Values are mean ± SD. Bars marked with different letters (24 h) or italic letters (48 h) are significantly different within the same time point at p< 0.05, as performed by one-way ANOVA. The asterisk indicates the different of mean values between 24 and 48 hr. ($p < 0.05$) using the Student's *t*-test.

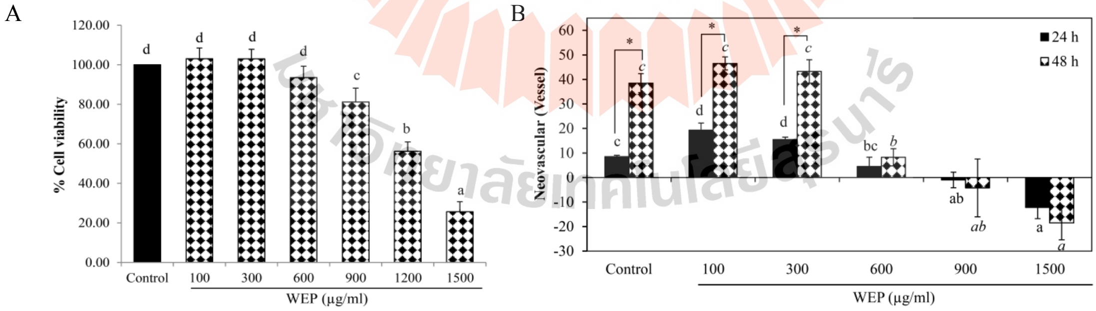


Figure 2. (A) Cytotoxic effect of WEP against B16F10 cells. The cells were exposed to various concentrations of WEP for 24 hour. Values are mean ± SD. Means with different letters are significantly different at p <0.05 as determined by one-way ANOVA. (B) The effect of WEP on normal angiogenesis at 24 and 48 hours. Values are means ± SD. Values marked with different letters (24 h) or italic letters (48 h) are significantly different at p< 0.05 within the same time point, as performed by one-way ANOVA. The asterisk indicates the different of mean values between 24 and 48 hr. ($p < 0.05$) using the Student's *t*-test.

Anti-angiogenesis activities of WEP on B16F10-induced angiogenesis in the CAM are clearly demonstrated in Figure 3A and 3B. WEP produced a dose-dependent suppression of B16F10-induced angiogenesis in the CAM ($p < 0.05$) at both 24 and 48 hr. Concomitantly exposure of B16F10 with WEP on the soaked paper disc for 24 hours caused the reduction of tumor-induced neovascularization by 20.48%, 50.90% and 87.65% at 30, 100 and 300 µg/ml of WEP, respectively. Likewise, After 48 hours, the number of neovascularization induced by of B16F10 was also reduced by 14.7%, 49.8% and 90.8% upon exposure to WEP at 30, 100 and 300 µg/ml, respectively. Notably, the inhibition of B16F10-induced neovascularization by WEP was more pronounced at 300 µg/ml which was barely non-toxic towards tumor cells. Therefore, the strong suppression of neovascularization by WEP was not solely due to direct cytotoxicity towards B16F10 tumor cells (Figure 2A and 3A).

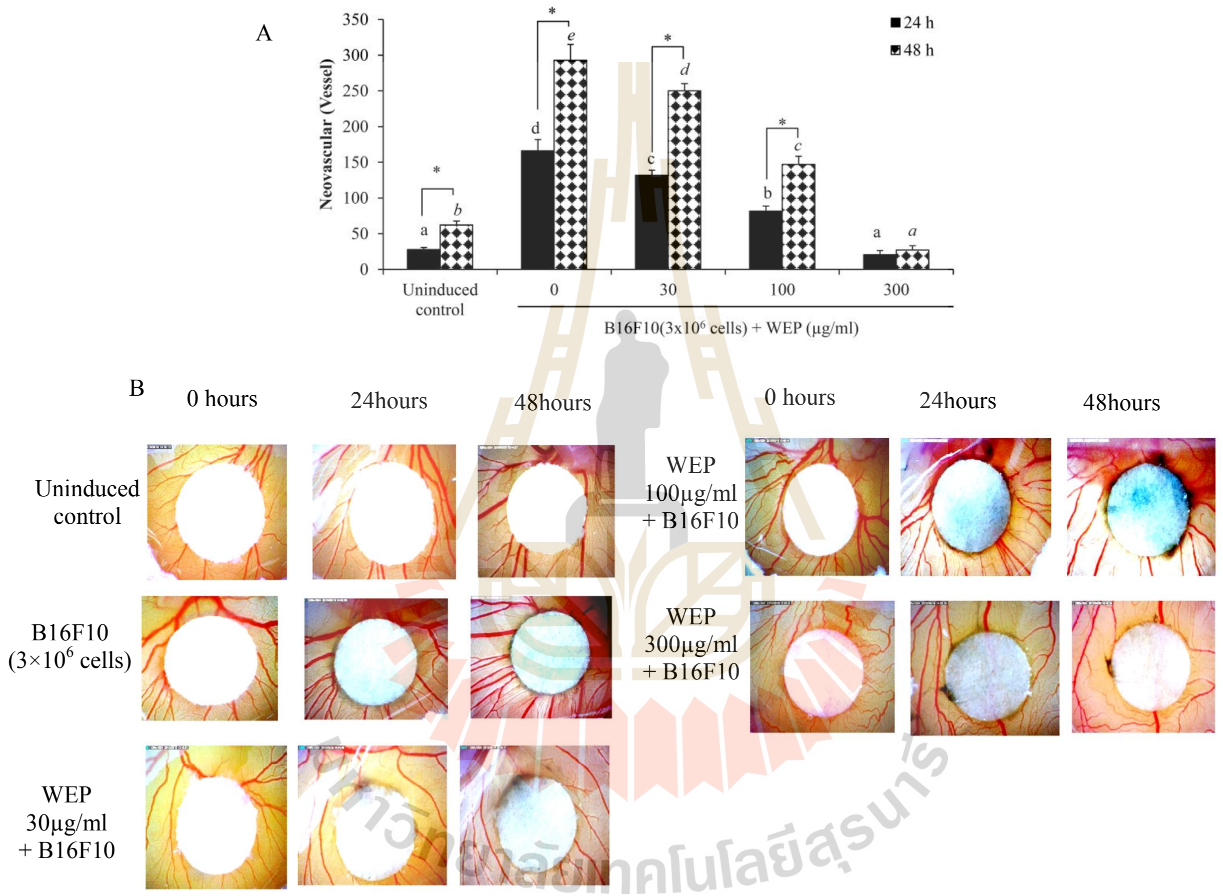


Figure 3. (A) Anti-angiogenic activity of WEP on B16F10-induced angiogenesis in CAM at 24 and 48 hours. Values are expressed as means ± SD (n = 6). Bars marked with different letters (24 h) or italic letters (48 h) are significantly different at $p< 0.05$ as performed by one-way ANOVA. (B) Photograph of neovascular vessels formation in CAM concomitantly exposure to B16F10 and WEP at 24 hr. and 48 hr. time points (6.7x magnification).

4. CONCLUSIONS

The water fresh leaf crude extract of *P. palatiferum* at 100-300 µg/ml produced a dose-dependent suppression of B16F10-induced angiogenesis in chick CAM model. The activity of WEP was highly specific as the extract only selectively inhibited the tumor-induced angiogenesis without targeting the normal or natural neovascularization on the CAM.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the National Research Council of Thailand through Suranaree University of Technology.

REFERENCES

1. Chayarop K, Peungvicha P, Wongkrajang Y, Chuakul W, Amnuoypol S, Temsiririrkkul R. 2011. Pharmacognostic and phytochemical investigations of *Pseuderanthemumpalatiferum* (Nees) Radlk. ex Lindauleaves. Pharmacognosy J. 3(23), 18-23.
2. Padee P, Nualkaew S, Talubmook C, Sakuljaitrong S. 2010. Hypoglycemic effect of a leaf extract of *Pseuderanthemumpalatiferum* (Nees) Radlk. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 132(2), 491-496.
3. Pan R, Dai Y, Gao X, Lu D, Xia Y. 2010. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by scopoletin through interrupting the autophosphorylation of VEGF receptor 2 and its downstream signaling pathways.Vascular Pharmacology. 54(1-2), 18-28.
4. Huynh Kim D, 2008. KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA LÁ XUÂN HOA (*Pseuderanthemum palatiferum*), Tạp chí Khoa học. 9, 232-240.
5. Sashwati R, Savita K, Helaine A, Jelena V, Debasis B, Manashi B, Chandan K. 2002. Anti-angiogenic property of Edible Berries. Free Radical Res. 36 (9), 1023–1031.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

B-O-022

Antiproliferative effect on cancer cells and mutagenic activity of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.

Benjawan Dunkhunthod[a], Benjamart Chitsomboon*[a]
[a]School of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 30000

*benja@sut.ac.th phone +66-897180683 fax +66-44224185

ABSTRACT

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. is one of the most commonly used medicinal plants in Thailand. It has been reported to have antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and antimicrobial activities. This study aimed to investigate the *in vitro* antiproliferation of 95% ethanol extract of *P. palatiferum* (EEP) against different human cancer cell lines (Jurkat, HepG2, MCF-7, and PC-3) using the MTT assay. The mutagenic effect of EEP as a possible health risk from its long term use was also evaluated by the Ames test. The results showed that various types of cancer cells exhibited different susceptibilities to EEP in a dose dependent manner. Jurkat cells was the most sensitive to the lethal effect of EEP. The LC_{50} of EEP in Jurkat and HepG2 were 476.35 ± 31.51 and 927.01 ± 90.84 µg/ml, respectively, and the LC_{50} in MCF-7 was higher than 1,500 µg/ml. No growth inhibition of EEP on PC-3 cells was observed. The cytotoxicity of EEP was mediated through apoptotic mechanism as evidenced by the nuclear condensation and DNA laddering fragmentation profile of Jurkat cells exposed to 300 µg/ml EEP for 12 and 24 h and 600 µg/ml for 24 h. Apoptosis induction in Jurkat cells was further confirmed by Hoechst 33258 and Annexine-V/PI staining using flow cytometry. There was no mutagenic effect of EEP on the *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100, regardless of the absence or presence of S9 mix. Overall, this study suggested that EEP exhibits antiproliferative effect on Jurkat cells by apoptosis induction, and the extract possesses no mutagenic activity

Keywords: Antiproliferation activity, Mutagenic activity, Apoptosis induction, *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. INTRODUCTION

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. or Hoan-ngoc has long been used as medicinal plant by Vietnamese people. A few years ago, it has become popular among Thai people for alleviating or curing various diseases, including cancer. Hoan-ngoc leaves have been reported to have antioxidant and antidiabetic [1], anti-inflammatory [2], and antimicrobial activities [3]. Moreover, the major bioactive compounds in Hoan-ngoc leaves are revealed to be flavonoid, stigmasterol, β-sitosterol, and apigenin-7-0-β-glucoside [4]. Flavonoid and β-sitosterol were reported to induce apoptosis in cancer cells [5, 6]. However, up to present, the pharmacologic studies of Hoan-ngoc's claimed properties are still very limited, and the long-term effects of its use are still largely unknown. Therefore, the aim of this study was to investigate the *in vitro* antiproliferative activity against different human cancer cell lines (Jurkat, HepG2, MCF-7, and PC-3) and evaluated apoptosis induction on Jurkat cells of 95% ethanol extract of *P. palatiferum* (EEP). Besides, the mutagenic effect activity of the extract was assessed.

2. MATERIALS AND METHODS

Preparation of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk leave extracts

Fresh leaves of Hoan-ngoc were blended in 95% ethanol and filtered through gauze. The extract was centrifuged and then the supernatant was filtered through a Whatman No.1 filter paper. After that, the ethanolic filtrate was concentrated using a vacuum rotary evaporator and lyophilized into powder of ethanol crude extract.

Cell culture

HepG2 human hepatocyte carcinoma cell line, MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line, and PC-3 human prostate adenocarcinoma cell line were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Jurkat leukemic cell line was obtained from Cell Line Services (CLS), Germany. HepG2 and MCF-7 cells were cultured in DMEM with high glucose supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Jurkat cells and PC-3 cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. All cell lines were maintained at 37ºC in 5% CO_2 and 95% humidity.

Cytotoxic assay

The cytotoxic effect of EEP on cell viability was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as previously described [7].

DNA fragmentation

Jurkat cells were treated with 100, 300, and 600 µg/ml of EEP for 24 h and 300 µg/ml for 6, 12, and 24 h. After treatment, cells were collected, and then DNA was extracted using QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). Five micrograms of DNA sample were loaded on a 1.5% agarose gel. The gel was run at 70 volts for 1.50 h and then stained with 0.5 µg/ml ethidium bromide. The DNA fragment was visualized under ultraviolet light.

Hoechst 33258 staining

After Jurkat cells were treated with EEP, the cells were fixed with ρ-formaldehyde (4%, v/v) for 20 min and further stained with 10 µg/ml of Hoechst 33258 for 30 min at room temperature in the dark. The stained cells were washed with PBS and visualized under the inverted fluorescence microscope.

Annexin V-PI staining

After EEP treatment, the Jurkat cells were collected and stained for 15 min with Annexin V-FITC and PI using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (EXBIO, Czech Republic). The stained cells were analyzed by flow cytometry.

Ames test

The mutagenicity of EEP was evaluated by the Ames test using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. The assay was performed by pre-incubation method [8] and conducted under both absence and presence of S9 mix. The extract was considered as mutagenic if the number of revertant per plate was at least double over the spontaneous revertant frequency.

3. RESULTS

The *in vitro* cytotoxic effect of EEP against various human cancer cell lines, namely Jurkat, HepG2, MCF-7 and PC-3 after 24 h of exposure are shown in Figure 1A. The results showed that various types of cancer cells exhibited different susceptibilities to EEP in a dose dependent manner. The LC_{50} was calculated from a dose response curve using linear regression analysis. EEP exerted antiproliferation only in Jurkat and HepG2 cell lines with the LC_{50} values of 476.35±31.51 and 927.01 ± 90.84 µg/ml, respectively. EEP at the concentration up to 1,500 µg/ml had no cytotoxicity towards PC-3. The breast cancer MCF-7 cells showed less susceptible to EEP treatment (LC_{50} > 1,500 µg/ml). Being the most sensitive target of EEP, the Jurkat cells were selected for further investigation whether the cytotoxic effect of EEP was mediated through the apoptotic mechanism.

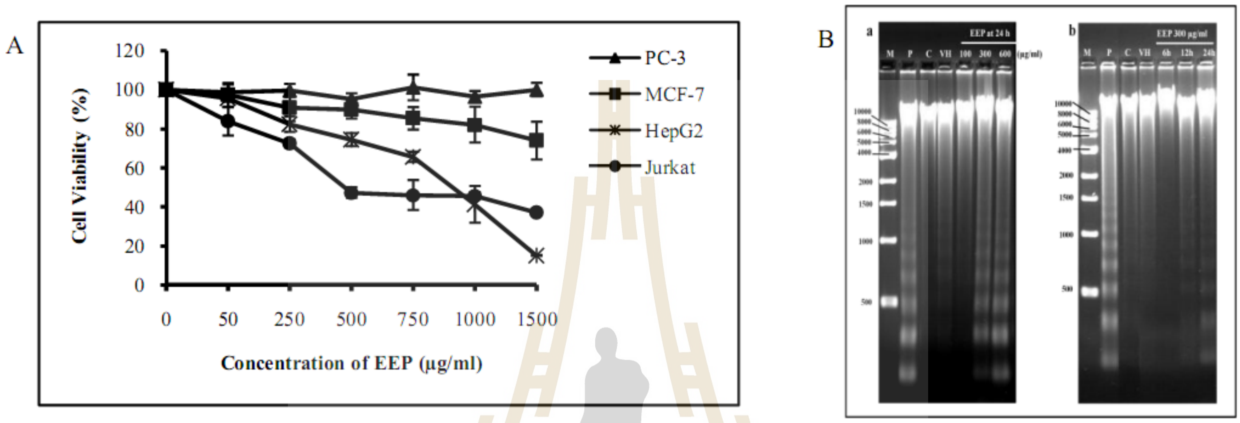


Figure 1. (A) Cytotoxic effect of EEP against different human cancer cell lines, PC-3, MCF-7, HepG2 and Jurkat cells. The cells were exposed to various concentrations of EEP for 24 h and were assessed for cell viability by MTT assay. Reported means ± SD values (n=4) are from a representative of three independent experiments. (B) DNA fragmentation in Jurkat cells exposed to EEP for 24h. Lane M, 1 kb DNA marker; lane P, 40 µg/ml of etoposide (positive control); lane C, media alone (negative control); lane VH, 0.1% DMSO (vehicle control).

The DNA fragmentation analysis (Figure 1B) showed that EEP induced the apoptotic cell death in both concentration- and time-dependent manners. The fragmented DNA was clearly observed in Jurkat cells after exposure to EEP at 300 and 600 µg/ml for 24 h and at 300 µg/ml for 12 and 24 h, respectively. No DNA fragmentation was observed in both negative and vehicle control cells, whereas the DNA ladder formation was clearly observed in the positive control group (40 µg/ml etoposide) at 24 h of exposure.

The nuclear morphological changes of Jurkat cells after EEP treatment were observed by Hoechst 33258 staining. The extent of apoptotic cell death induced by EEP was dose- and time- dependent (Figure 2A). At 300 and 600 µg/ml, EEP induced apoptotic cell death in Jurkat cells, but had no effect at 100 µg/ml. The time course study revealed that Jukat cells exposed to 300 µg/ml of EEP showed nuclear condensation and DNA fragmentation at 12 and 24 h post exposure, but no alteration of nuclear morphological changes was observed at the earlier time point (6 h). As expected, non-treated cells showed normal nuclear morphology.

The Annexin V-PI assay was further performed to confirm the apoptotic cell death induced by EEP. AnnexinV-PI staining was used to evaluate early and late apoptotic cell death. The percentage of EEP-induced apoptosis in Jurkat cells were increased in both dose- and time-dependent manners (Figure 2B). The percentages of early apoptotic in EEP-treated Jurkat cells were 5.21%, 7.93%, and 14.24% upon treatment with 100, 300, and 600 µg/ml of EEP for 24 h, respectively. Likewise, the percentages of early apoptotic in Jurkat cells after treatment with 300µg/ml of EEP for 6, 12, and 24h were 6.93%, 8.44%, and 11.42%, respectively.

The mutagenicity of EEP was evaluated by the Ames test using *S. typhimurium* strains TA98 and TA100. The assays were performed in both absence and presence of S9 mix. A compound tested with a mutagenic index of 2.0 or more is regarded as a potent mutagen. EEP ranging from 150 µg/plates up to 600 µg/plates had the mutagenic index of less than 2.0 on both tested strains, regardless the presence or absence of S9 mix (Table 1). Therefore, EEP in the range of 150 - 600 µg/plates had no mutagenic activity, whereas all positive controls always induced a clear mutagenic response with high values of mutagenic indexes (13.6-50.6).

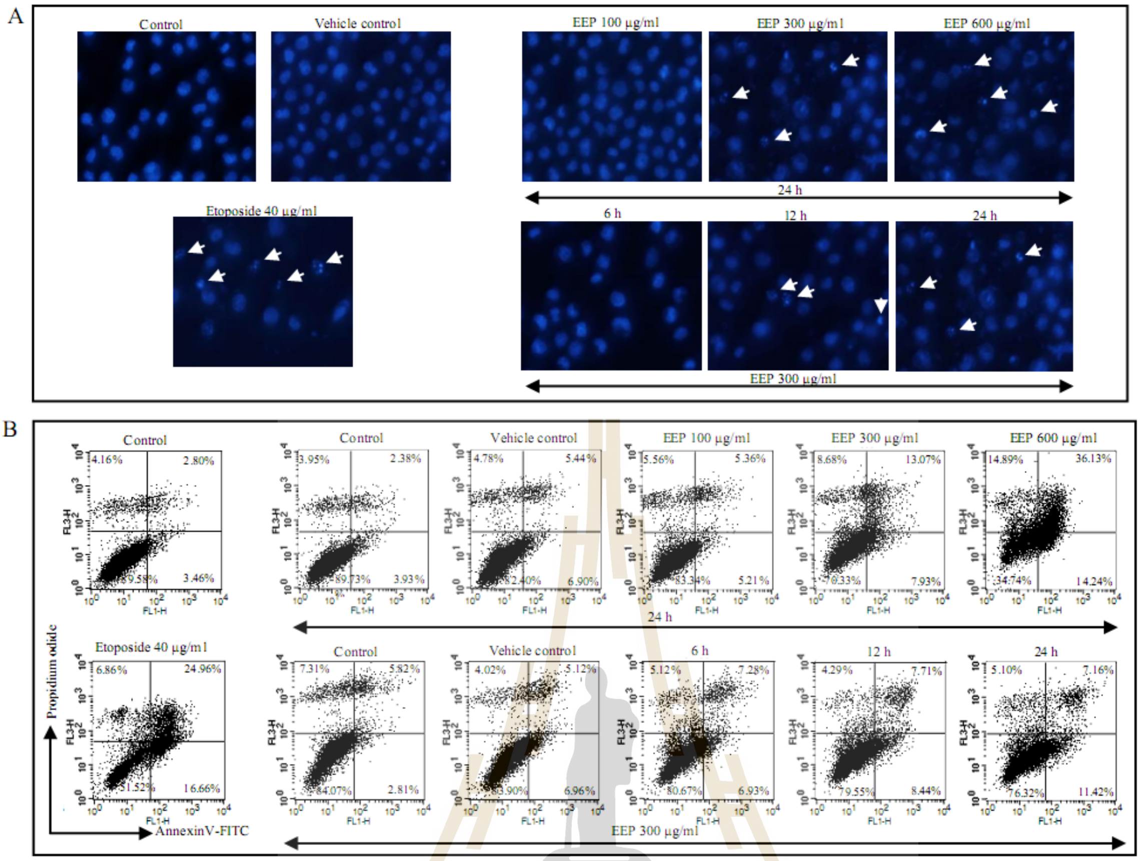


Figure 2. (A) Effect of EEP on nuclear morphological changes in Jurkat cells. The nuclear morphological changes were evaluated by staining with Hoechst 33258 and visualized under fluorescence microscopy at 400 ×magnification. The fragmented or condensed nuclei are indicated as white arrows. (B) Flow cytometric analysis of apoptosis in Jurkat cells exposed to various concentrations of EEP for 24 h and kinetics of apoptosis induction in Jurkat cells exposed to 300 μg/ml of EEP. The apoptosis of Jurkat cells was detected by flow cytometry using AnnexinV-PI staining method. Data are a representative of two independent experiments.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 1. Mutagenic effect of EEP on the *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 in the absence and presence of S9 mix

Sample	Number of revertants/plate (Mean±SD), (Mutagenic Index)			
	TA98		TA100	
	(-) S9 mix	(+) S9 mix	(-) S9 mix	(+) S9 mix
Control	22±2	24±5	117±6	111±5
Vehicle control(1.4%DMSO)	20±5	26±8	121±10	112±9
2-NF(10µg/plate)[PC]	1,012±225,(50.6)	-	-	-
Sodium azide(10µg/plate)[PC]	-	-	1,587±7,(13.56)	-
2-AA(2.5µg/plate)[PC]	-	903±28,(34.74)	-	4,691±473,(41.88)
EEP (150µg/plate)	24±2, (1.20)	25±5, (0.96)	131±29, (1.08)	115±11, (1.03)
EEP (300µg/plate)	20±4, (1.00)	26±4, (1.00)	105±10, (0.87)	92±7, (0.82)
EEP (600µg/plate)	20±3, (1.00)	22±1, (0.85)	108±23, (0.89)	82±20, (0.73)

PC, positive control. Data were expressed as means ± SD of two independent experiments (n=3). Mutagenic Index (MI) = Number of revertant colonies of the extract/Number of revertant colonies of the vehicle control (spontaneous revertant). Values in brackets (MI) ≥2 indicate mutagenicity.

4. CONCLUSIONS

The current study demonstrated that the ethanolic extract of *Pseuderanthemum palatiferum* exerts the most potent antiproliferative effect on human T cell leukemia Jurkat cells, and its cytotoxicity is mediated through apoptosis pathway. The extract in the range of 150 to 600 µg/plate has no mutagenicity in the Ames assay.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the National Research Council of Thailand through Suranaree University of Technology.

REFERENCES

1. Chayarop1 K., Temsiririrkkul R., Peungvicha P., Wongkrajang Y., Chuakul W., Amnuoypol S., Ruangwises N. 2011. Antidiabetic effects and *in vitro* antioxidant activity of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.ex Lindau leaf aqueous extract, Mahidol J Pharm Sci. 38 (3-4), 13-22.
2. Khumpook T, Chomdej S, Saenphet S, Amornlerdpison D, Saenphet K. 2012. Anti-inflammatory activity of ethanol extract from the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. Chiang Mai J. Sci. 40(3), 321-331.
3. Nguyen QV, Eun JB. 2013. Antimicrobial activity of some Vietnamese medicinal plants extracts, J Med Plant Res. 7(35), 2597-2605.
4. Huynh Kim D, 2008. KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA LÁ XUÂN HOA *(Pseuderanthemum palatiferum)*, Tạp chí Khoa học. 9, 232-240.
5. Ramos S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. J Nutr Biochem. 18(7), 427-442.
6. Moon DO,Lee KJ, Choi YH,Kim GY. 2007. β-Sitosterol-induced-apoptosis is mediated by the activation of ERK and the down regulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells, Int Immunopharmacol. 7(8), 1044-1053.
7. Shim HY, Park JH, Paik HD, Nah SY, Kim DS, Han YS. 2007. Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. Mol. Cells. 24(1), 95-104.
8. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res. 113, 173-215.

Food and Chemical Toxicology 97 (2016) 11–22

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Pseuderanthemum palatiferum leaf extract inhibits the proinflammatory cytokines, TNF-α and IL-6 expression in LPS-activated macrophages

Patcharawan Sittisart [a, b], Benjamart Chitsomboon [c], Norbert E. Kaminski [d, *]

[a] *Division of Environmental Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Sisaket Rajabhat University, Sisaket 33000, Thailand*
[b] *School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, NaKhon Ratchasima 30000, Thailand*
[c] *School of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, NaKhon Ratchasima 30000, Thailand*
[d] *Department of Pharmacology and Toxicology and Institute for Integrative Toxicology, Michigan State University, East Lansing, MI, USA*

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 30 March 2016
Received in revised form
15 August 2016
Accepted 16 August 2016
Available online 19 August 2016

Keywords:
Pseuderanthemum palatiferum
TNF-α
IL-6
NF-κB
C/EBP
AP-1

A B S T R A C T

The anti-inflammatory potential and underlying mechanisms of an ethanol extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (EEP) leaves was investigated using LPS-activated macrophages. Our results show EEP produced a concentration-dependent suppression of TNF-α and IL-6 secretion by LPS-activated mouse peritoneal macrophages. EEP also suppressed LPS-induced TNF-α and IL-6 protein and mRNA levels in mouse-derived myeloid cell line RAW264.7. To further elucidate the molecular mechanisms responsible for impaired TNF-α and IL-6 regulation by EEP, the activation of transcription factors, NF-κB, C/EBP, and AP-1, was monitored using electrophoretic mobility shift assays. EEP suppressed LPS-induced NF-κB DNA binding activity within both the TNF-α and IL-6 promoters in RAW264.7 cells with impairment being more pronounced in the IL-6 promoter. In addition, EEP exhibited a concentration-dependent suppression of C/EBP and AP-1 DNA binding activity within the IL-6 promoter. Concordantly, IL-6 luciferase promoter reporter activity was also suppressed by EEP in transiently transfected RAW264.7 cells, upon LPS activation. EEP analysis by GC-MS and HPLC DAD-MSD revealed the presence of β-sitosterol and various polyphenols, respectively, which are known to possess anti-inflammatory activity. Collectively, these results suggest that the anti-inflammatory effects of EEP are mediated, at least in part, by modulating TNF-α and IL-6 expression through impairment of NF-κB, C/EBP, and AP-1 activity.
© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. (PP), known as Hoan-Ngoc, is a native plant of Vietnam. PP leaves have long been traditionally used by Thais and Vietnamese for the prevention or treatment of hypertension, diabetes, cancer, as well as inflammation associated with wound healing, general trauma, colitis and nephritis (Dieu et al., 2006; Padee et al., 2010). Khumpook et al. (2013) also demonstrated the acute and chronic anti-inflammatory property of ethanol extract from PP leaves in albino rats by using the ethyl phenylpropiolate-induced ear edema test and the cotton pellet-induced granuloma model, respectively. Giang et al. (2003) found that fractional extracts of PP leaves contain several compounds, such as phytosterols, lipids, saponins and flavonoids. PP leaf extracts display both in *vitro* (Giang et al., 2005) and in *vivo* (Khumpook et al., 2013) antioxidant activity. Likewise, we have also found that an ethanol extract of PP leaves containing phenols and flavonoids exhibited potent antioxidant activity as assessed by various *in vitro* models. In addition, the extract also displayed *in vitro* anti-inflammatory properties as suggested by suppression of NO production concomitant with iNOS and COX-2 expression in LPS plus IFN-γ-stimulated RAW264.7 cells (Sittisart and Chitsomboon, 2014). Many investigators have also demonstrated that numerous antioxidant medicinal plants possess anti-inflammatory property (de las Heras et al., 1998; Dufour et al., 2007; Sheeja et al., 2006).

LPS is an endotoxin that activates a variety of mammalian cell-types including macrophages to produce proinflammatory cytokines (Guha and Mackman, 2001). TNF-α and IL-6 are among the most important cytokines released by activated macrophages. TNF

* Corresponding author.
E-mail address: kamins11@msu.edu (N.E. Kaminski).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.021
0278-6915/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviation

AP-1	activator protein-1
AP	*Andrographis paniculata*
BSA	bovine serum albumin
C/EBPs	CCAAT/enhancer binding proteins
DMSO	dimethyl sulfoxide
EEP	ethanol extract of *Pseuderanthemum palatiferum*
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FBS	fetal bovine serum
HBSS	Hank's balanced salt solution
IL-6	interleukin-6
LPS	lipopolysaccharide
NA	naïve
NF-κB	nuclear factor-kappaB
PP	*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription PCR
RLU	relative light units
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
VH	vehicle

is a pleiotropic and multifunctional proinflammatory cytokine. It can mediate both growth promotion and inhibitory activities in many cell-types (Liu and Han, 2001) and exerts a wide spectrum of biological effects, including inflammation, lipid metabolism, coagulation, insulin resistance and endothelial functions (Founds et al., 2008). TNF-α is a regulatory factor involved in many inflammatory mediated diseases, such as septic shock, cancer, multiple sclerosis, diabetes and rheumatoid arthritis (Vassalli, 1992). Conversely, blocking elevation of TNF-α or interfering with binding to its cognate receptor can alleviate the severity of the inflammatory response (Colon et al., 2001; Mohler et al., 1993; Scallon et al., 2002). Similarly, IL-6 is a cytokine that is also induced by a variety of stimuli, including LPS and is also a major initiating stimulus of the acute phase response. In addition, IL-6 plays important roles in the immune response during chronic inflammation. Elevated IL-6 levels have also been identified in many inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis (RA), systemic juvenile idiopathic arthritis, systemic lupus erythematosus, ankylosing spondylitis, psoriasis and Crohn's disease (Gabay, 2006; Kishimoto, 2010).

LPS induces the expression of numerous genes involved in the inflammatory process by activating several types of transcription factors (Van Miert, 2002). NF-κB is an important transcription factor playing crucial roles in the inflammatory response by regulating the gene expression of proinflammatory cytokines (e.g., IL-1, IL-2, IL-6, TNF-α, etc), chemokines, adhesion molecules, inducible enzymes (COX-2 and iNOS), growth factors, some acute phase proteins and immune receptors (Calixto et al., 2003). The mouse TNF promoter contains several LPS-inducible NF-κB binding sites (Kuprash et al., 1999). Recently, numerous plant-derived substances have been investigated for their potential to impair NF-κB binding with the intent to identify their therapeutic benefits in treating various inflammatory diseases (Calixto et al., 2003). Also involved in the regulation of inflammatory responses are CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) which are a family of six proteins containing basic leucine Zipper (bzip) motifs. The C/EBPs are critical regulators of cellular differentiation and function in multiple tissues. Among these proteins, C/EBP β and C/EBP δ are involved in the regulation of gene expression during inflammation (Poli, 1998). A third transcription factor also critically involved in regulating the inflammatory response is activator protein-1 (AP-1). AP-1 consists of either Jun homodimers or Fos/Jun heterodimeric complexes. This transcription factor binds to the TPA DNA response element (TRE) appearing in various mammalian promoters, including those of acute phase proteins and cytokines involved in mediating inflammation (Koj, 1996). Furthermore, NF-κB, C/EBP, and AP-1 are critical for transcriptional regulation of the mouse IL-6 promoter (Baccam et al., 2003). The mouse IL-6 promoter also contained the same DNA binding sequences for NF-κB and AP-1 as the human IL-6 promoter (Allen et al., 2010).

Currently, natural substances derived from plants are of potential interest for therapeutic intervention in the treatment of a variety of inflammatory diseases. Though the anti-inflammatory activities of the ethanol extract of PP leaves were demonstrated both *in vitro* and *in vivo* (Khumpook et al., 2013; Sittisart and Chitsomboon, 2014) to date, the molecular mechanisms responsible for the anti-inflammatory properties of the extract remain unknown. The objective of the present study was to investigate the anti-inflammatory effects of PP by examining its modulation of macrophage-derived TNF-α and IL-6. Here we demonstrated for the first time that EEP decreases the levels of TNF-α and IL-6 at the protein and mRNA level in LPS-activated macrophages as well as provide a partial mechanism for the immunomodulatory activity.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Autoradiography film was purchased from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). DNA binding sequences of NF-κB, C/EBP, and AP-1 were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). pGL2-basic luciferase reporter gene vector and the pmIL-6.Luc(-231) promoter/luciferase reporter gene were gifts from Dr. Gail Bishop from the University of Iowa. All cell culture media and supplements were purchased from Gibco-BRL (Grand Island, NY). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) unless otherwise indicated.

2.2. Plant material

Fresh leaves of PP were purchased from Yasothon province, Thailand. The plant was identified and authenticated by Dr. Kongkanda Chayamarit, Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand. A voucher specimen (BKF 174009) was deposited at the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.

2.3. Plant extract preparation

One and a half kilograms of fresh PP leaves were cut into small pieces and blended in 6 L of 95% ethanol. The extract was centrifuged for 10 min at 3500g at 4 °C and the supernatant was filtered through Whatman No. 1 filter paper. The ethanolic filtrate was concentrated using a vacuum rotary evaporator and dried by lyophilization to obtain ethanol extract of *Pseuderanthemum palatiferum* leaves (EEP; 60.41 g). The EEP was stored at −80 °C and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) for use in experiments.

2.4. Determination of proximate compositions

Protein (991.20) was analyzed by in-house method based on Association of Analytic Chemists AOAC (2010). Total fat (922.06), ash (942.05), and moisture (934.01), were determined according to the method of AOAC International (2005). Carbohydrate content

was estimated by difference of the other components using the following formula: Carbohydrate content = 100%–(%moisture + % protein + %fat + %ash). Energy was expressed as kilocalories, using the factors mentioned in the Portuguese Legislation (Decreto-Lei no. 167/2004): Energy (Kcal) = 4 × (g protein + g carbohydrate) + 9 × (g lipid).

2.5. HPLC DAD-MS analysis

Polyphenols from EEP containing the active immunomodulatory activity were characterized by high performance liquid chromatography (HPLC) diode array detection (DAD) mass spectrometry (MS) analysis. HPLC was performed using an Agilent 1100 series instrument (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany), diode array detection, and Purospher STAR RT-18 endcapped (5 μm) LiChroCART (4.6 × 150 mm) column (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). EEP (20 μl) was injected onto analytical reverse C-18 column. The mobile phases were: A, acetonitrite; and B, 10 mM ammonium formate buffer, pH 4 with formic acid. The elution gradient was linear; at 0 min 100% solvent B held for 5 min, from 5 to 10 min 20% A was reached and held constant until 20 min, from 20 min to 60 min 40% A was reached. Other HPLC conditions were as follows: flow rate 1 ml/min; column temperature, 40 °C; detections, 270, 330, 350, 370 nm; and sample size 20 μL. The mass spectrometer used was an Agilent mass spectrometer detector (MSD) equipped with an electrospray ionization source and ion trap mass parameters were as follows: capillary potential, 4000 v; drying gas temperature, 320 °C; gas flow (N_2), 13 l/min; nebulizer pressure, 60 psi. The instrument was operated in the positive ion mode scanning from m/z 100 to 700. The mass spectral characteristics of polyphenols were compared to chemical standards. Quantification was performed by comparison of retention times, and diode array spectra were matched against chemical standards.

2.6. GC-MS analysis

The *n*-hexane and chloroform soluble fractions from EEP was used for determining β-sitosterol. GC-MS analyses were performed on an Agilent gas chromatograph 6890 equipped with an electronically controlled splitless injection port and interfaced to a MSD-5973N mass selective detector. The chromatograph was equipped with DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 mm film thickness) coupled directly to the mass detector. The injection was performed at 270 °C in the splitless mode (ratio 15:1). Helium was used as carrier gas, with a constant flow rate of 1 ml/min. The column temperature was 270 °C during the entire run and the transfer line temperature was 280 °C. Quantification was carried out in selective ion monitoring (SIM) mode. The identification of β-sitosterol was based mostly on mass spectra compared to a library standard and by direct comparison of a reference standard of β-sitosterol.

2.7. Animals

Pathogen-free female C57BL/6 mice, 5–8 weeks of age (17–20 g), were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Portage, MI). On arrival, mice were randomized, transferred to plastic cages containing sawdust bedding (5 animals/cage) and acclimatized for at least 1-week prior to experimentation. Mice were provided food (Purina Certified Laboratory Chow) and water *ad libitum*. Animal holding rooms were maintained at 21–24 °C and 40–60% relative humidity with a 12-h light/dark cycle. All procedures involving mice were in accordance with the Michigan State University Institutional Animal Care and Use Committee.

2.8. Cell culture

The murine macrophage cell line, RAW264.7, was purchased from Cell Lines Service (Eppelheim, Germany). RAW264.7 cells were cultured at 37 °C in a 5% CO_2 incubator in RPMI-1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin.

2.9. Sample preparations for mRNA and ELISA studies

RAW264.7 cells were seeded in a 6-well culture plate at 2×10^6 cells/well and incubated overnight at 37 °C, 5% CO_2. After incubation, cells were pretreated with various concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) or DMSO vehicle control (0.125%) for 1 h. Cells were activated with 100 ng/ml of LPS (*E. coli* O111: B4, Sigma-Aldrich) for 8 h. The supernatants were then collected after centrifugation at 300*g* for 5 min and stored at −80 °C for further analysis of TNF-α and IL-6 by ELISA. For RNA isolation, the adherent cells were lysed with 175 μl lysis buffer from SV Total RNA Isolation kit (Promega, Madison, WI) in a 6-well plate and stored at −80 °C until further use.

2.10. Isolation and culture of mouse peritoneal macrophages

Murine peritoneal macrophages were obtained by injection of 10 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS) into the peritoneal cavity of C57BL/6 mice. The abdominal area was gently massaged for 1 min to ensure uniform distribution of free cells in the HBSS and peritoneal cells were harvested by using a 16-gauge (B-D, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 1-inch needle as described previously (Kaminski et al., 1982). A 4 ml aliquot of collected peritoneal cell suspension was immediately transferred to a 50 ml tube on ice. The isolated cells were then washed and resuspended in complete culture medium. Cells were seeded in a 96-well culture plate at 2.5×10^5 cells/well in a final volume of 200 μl and cultured at 37 °C for 2 h to allow macrophages to adhere to the plate. Non-adherent cells were removed by washing once with warm HBSS and the adherent cells were cultured in complete RPMI 1640 medium. After an overnight culture period at 37 °C, 5% CO_2 in a humidified incubator, culture medium was removed, replaced with fresh medium, and then the adhered peritoneal macrophages were exposed to various concentrations of EEP or vehicle control for 1 h before stimulation with 100 ng/ml LPS. After an 8 h incubation, the supernatants were collected and stored at −80 °C for quantification the levels of TNF-α and IL-6 cytokines.

2.11. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Cytokine levels were quantified by ELISA as previously described (Condie et al., 1996).

Briefly, Immuno strip plates (Thermo, York, PA) were coated with 50 μl/well of 1 μg/ml purified anti-mouse/rat TNF-α (clone#TN3-19.12, eBioscience, San Diego, CA) or purified anti-mouse IL-6 (clone#MP5-20F3, eBioscience) and incubated overnight at 4 °C. Wells were then washed three times with 250 μl PBST (0.02% Tween 20 in phosphate buffered saline pH 7.4) to remove excess unbound antibody. The non-specific sites were blocked for 1 h at room temperature with 300 μl/well of 3% bovine serum albumin (BSA, Calbiochem, La Jolla, CA) in PBST followed by three additional washes. Fifty μl/well of sample or standard, mouse TNF-α recombinant protein (eBioscience) or mouse IL-6 recombinant protein (eBioscience) were added to respective wells. After washing, 1 μg/ml biotinylated anti-mouse/rat TNF-α (Polyclonal Ab, eBioscience) or biotinylated anti-mouse IL-6 (clone#MP5-32C11, eBioscience), diluted in 3% BSA-PBST, was added to the corresponding wells and

allowed to incubate at room temperature for 1 h. After washing, 50 μl of streptavidin peroxidase (Sigma-Aldrich) diluted 333.3-fold was added followed by incubation at room temperature for 1 h. After washing, TMB substrate [12.5 ml citric-phosphate buffer pH 5.0 + 200 μl of 3, 3′, 5, 5′-tetramethyl-benzidine stock solution (6 mg/ml in DMSO) + 50 μl 1% H_2O_2] was added. The reaction was terminated by the addition of 100 μl 6 N H_2SO_4. Optical density was determined at 450 nm using an EL-808 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).

2.12. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from RAW264.7 cells using SV Total RNA Isolation kits (Promega) according to the manufacturer's instructions. The isolated RNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. qRT-PCR was performed on an Applied Biosystems 7900 PRISM Thermocycler (ABI, Foster City, CA) using a Taqman assay system. Briefly, total RNA (250 ng) in a total reaction volume of 25 μl was reverse transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (AB Applied Biosystems) as described by the manufacturer's instructions. Two μl of the generated cDNA were used as a template in a 20 μl PCR reactions containing 1 μl of the target gene primers (TNF-α, and IL-6, AB Applied Biosystems), 1 μl endogenous reference primers (18S ribosomal RNA, Applied Biosystem), 10 μl Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 6 μl of water to bring final volume to 20 μl. The amount of target gene mRNA was normalized to 18S ribosomal RNA and relative to the calibrator was calculated by using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ and are expressed as fold change compared to naïve control.

2.13. Electrophoretic mobility shift assay

Nuclear extracts from RAW264.7 cells were prepared as described previously (Condie et al., 1996). Briefly, cells were seeded at 1×10^7 cells/ml in a 150 mm^2 petri dish and cultured for 48 h. Culture medium was removed at the end of 48 h and replaced with fresh media. Cells were pretreated with EEP (50, 150, or 250 μg/ml) or vehicle for 1 h and then stimulated with 100 ng/ml of LPS for 30 min (for NF-κB in mTNF-α and NF-κB and AP-1 in mIL-6 promoters) or 2 h (for C/EBP in mIL-6 promoter). Cells were then isolated by scraping, resuspended in fresh media, transferred to 50 ml tubes, and centrifuged at 300*g* for 5 min. Cell pellets were resuspended in cold 1X PBS, centrifuged at 300*g* for 5 min, and resuspended in 500 μl of hypotonic buffer (10 mM HEPES and 1.5 mM $MgCl_2$) supplemented with 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl, 0.2 μg/ml aprotinin, and 0.2 μg/ml leupeptin and transferred to a 1.5 ml eppendorf tube. After 15 min on ice, cell pellets were centrifuged at 1000 *g* for 5 min at 4 °C. The cell pellets were vortex mixed in 100 μl of ice cold buffer C (30 mM HEPES, 1.5 mM $MgCl_2$, 450 mM NaCl, 0.3 mM EDTA, 10% glycerol, and 0.1% Igepal) added with 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, and 0.2 μg/ml of leupeptin and aprotinin and incubated on ice for 30 min. Cellular debris was removed by centrifugation at 14,500 rpm, 15 min at 4 °C. Then, 100 μl supernatant was transferred and combined with 100 μl buffer D (30 mM HEPES, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.3 mM EDTA, and 10% glycerol). The protein concentration of the supernatant was quantified using the bicinchoninic acid (BCA) assay (Sigma-Aldrich). The binding reaction was performed by incubating nuclear protein extracts (1 μg for NF-κB, C/EBP, and AP-1 in mIL-6 promoters and 0.5 μg for NF-κB in mTNF-α promoter) with poly dI-dC (1 μg for NF-κB in mTNF-α and mIL-6 promoters and 0.2 μg for AP-1 and C/EBP in mIL-6 promoters) (Roche, Indianapolis, IN) on ice for 10 min. The final concentrations were 50 mM (for NF-κB in mTNF-α and NF-κB and C/EBP in mIL-6 promoters) and 100 mM (for AP-1 in mIL-6 promoter). After incubation, 45,000 cpm of the double-stranded ^{32}P-labeled probes was added to the reaction and incubated at room temperature for another 20 min. Pairs of complementary oligonucleotides with 2 nucleotide overhangs were used to generate double-stranded DNA probes (Table 1). To assess the specificity of DNA binding activity, the nuclear extracts were incubated with a 25-fold excess of unlabeled probe (NF-κB in mTNF-α and AP-1 in mIL-6 promoters), or a 10-, 25-, 50-, 100- and 250-fold excess of unlabeled probe (NF-κB and C/EBP in mIL-6 promoters) prior to addition of the radiolabeled probe. The resulting protein-DNA complexes were resolved on a 5% polyacrylamide gel in 0.5X TBE buffer (1X = 89 mM Tris, 89 mM borate, and 2 mM EDTA). The gel was then dried on 3 mm filter paper (Whatman, Hillsboro, OR) and autoradiographed.

2.14. Transient transfection assays

RAW264.7 cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, RAW264.7 cells were preseeded in a 6-well plate at 5×10^5 cells/well in high glucose DMEM medium with 10% FBS followed by overnight incubation. Culture medium was then removed and replaced with fresh medium with 5% FBS. After 24 h incubation, culture medium was removed, replaced with fresh medium without serum and antibiotics, and incubated overnight. Before transfection, culture medium was removed and replaced with fresh medium without serum and antibiotics at 2 ml/well. Cells were then incubated for 4 h with transfection mixture (8 μg of pGL2-basic in 16 μL of lipofectamine 2000 or 8 μg of pmIL-6.Luc (−231) [generously provided by Dr. Gail Bishop] in 16 μL of lipofectamine 2000 per well). The medium containing the transfection mixture was removed by centrifugation for 3 min at 700 rpm and replaced with fresh medium containing 2% FBS and the cells were allowed to recover for 4 h. Then, transfected cells were scraped and distributed to a 48-well plate at 4×10^5 cells/1 ml/well. After overnight incubation, culture medium was removed by centrifugation and replaced with fresh media containing 2% FBS. The transfected RAW264.7 cells were then pretreated with increasing concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) or vehicle for 1 h before stimulation with 700 ng/ml LPS. It is correct that 700 ng/ml of LPS only modestly enhanced IL-6 reporter activity compared to 100 ng/ml of LPS. The rationale for using 700 ng/ml is two-fold. The first pertains to the fact that leukocytes are very difficult to transfect and the amount of plasmid that would be taken up by the cells. By using 700 ng/ml of LPS we hoped to induce as strong as possible reporter activity in order to also maximize the sensitivity of detecting effects by EEP. Second, we wanted to ensure that the effects of EEP on IL-6 reporter activity were real and hence we chose to drive the reporter as strongly as possible, without deleterious effects on the transfected cells. Treatments were performed in 4 replicates. Eighteen hours after stimulation, luciferase activity was determined using the luciferase assay system and reporter lysis buffer from Promega (Madison, WI). Protein determinations were performed using a Bradford protein assay. The luciferase activity was normalized to the determined amount of total protein. Results of luciferase expression were expressed as a relative light units (RLU)/μg protein.

2.15. Statistical analysis

All statistical significance (GraphPad Prism 5, USA) was determined by performing a one-way analysis of variance (ANOVA) with a *post hoc* Tukey's analysis to determine differences between treatment and control groups. Values were considered statistically significant when $p < 0.05$. Data were presented as the mean ± SEM (n = 3 for ELISA and qRT-PCR analysis, n = 4 for transient

Table 1
Sequences of oligonucleotide probes used in the EMSA assay. The putative transcription factor binding sequence is in bold for each probe.

Transcription factors	Mouse promoter	Oligonucleotide probes	Position relative to transcription start
NF-κB	TNF-α	5′-GT AAA CA**GGGGGCT TTCCC**T CCT CAA-3′ 5′-GT TTG AGG A**GGGAAAGCCCC C**TG TTT-3′	−510
NF-κB	IL-6	5′-TC AAA T**GTGGG ATT TTCCCA** TGA G-3′ 5′-GA CTC A**TGGGA AAA TCCCAC** ATT T-3′	−64
C/EBP	IL-6	5′-AG C**ACATT GTG CAA TCT** TAA-3′ 5′-TA TTA **AGA TTG CAC AATGT**G-3′	−147
AP-1	IL-6	5′-TT CCC A**TG AGT CT**C AAA ATT-3′ 5′-CT AAT TTT G**AGACTCA**T GGG-3′	−55

transfection analysis) and were representative of at least three independent experiments. EMSA analysis experiments were repeated at least 2 times with similar results.

3. Results

3.1. Content of proximate compositions

Proximate compositions of PP leaves are shown in Table 2. The chemical composition, moisture, ash, protein, fat, carbohydrate, and crude fiber, of PP leaves, were 10.12%, 17%, 21.86%, 2.79%, 48.23%, and 10.31%, respectively. The results also show that the energetic value of PP leaves was 305.47 Kcal. It was found that protein and carbohydrate were the major component in PP leaves.

3.2. Identification and quantification of polyphenols in EEP

The analytical plot of polyphenols in EEP containing the immune modulatory activity is shown in Fig. 1. The peaks were corresponding to reference standards with retention time as 6.58 and 7.28 min for gallic acid isomeric from, 12.43 min for tannic acid, 12.83 min for catechin, 14.88 min for rutin, 15.90 min for isoquercetin, 29.85 min for quercetin, and 42.07 for kaempferol. By calculating from a standard curve, the content of gallic acid, tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin, quercetin and kaempferol was 364.31 μg/ml, 791.69 μg/ml, 1098 μg/ml, 385.7 μg/ml, 4790 μg/ml, 572.13 μg/ml, and 86.46 μg/ml, respectively. The results indicate that the major constituents of EEP is isoquercetin and catechin. The other constituents shown in this chromatogram could not be analyzed and identified in the current experimental system. The HPLC profile indicated that EEP contained other unknown compounds.

3.3. Identification and quantification of β-sitosterol in EEP

The analytical plot of β-sitosterol in *n*-hexane and chloroform fractions from EEP are shown in Fig. 2. The peak of *n*-hexane fraction (A) and chloroform fraction (B) was corresponding to β-sitosterol standard with retention time as 58.05 and 58.24 min. By calculating from a standard curve, the content of β-sitosterol was 257.04 mg/kg for *n*-hexane and 525.90 mg/kg for chloroform fractions. The results indicated that the chloroform fraction had a higher content of β-sitosterol than the *n*-hexane fraction. The GC-MS profile also suggested that both fractions contained other unknown compounds.

Table 2
Proximate composition (grams per 100 g of dry weigh) of EEP leaves.

Percent compositions	Contents
Moisture	10.12
Ash	17
Protein	21.86
Fat	2.79
Carbohydrate	48.23
Crude fiber	10.31
Energy (Kcal)	305.47

3.4. The suppression of EEP on TNF-α and IL-6 release in LPS-stimulated macrophages

To investigate the anti-inflammatory activity of EEP, freshly isolated peritoneal macrophages were activated with LPS in the presence of EEP. ELISA was performed to quantify secreted proinflammatory cytokines TNF-α and IL-6. EEP at 150 and 250 μg/ml significantly decreased TNF-α production induced by LPS, when compared to the vehicle control (Fig. 3A). Likewise, and at the same concentrations, EEP also significantly suppressed LPS-induced IL-6 production (Fig. 3B). The suppressive effect of EEP on TNF-α and IL-6 was not due to direct cytotoxicity as cell viability of peritoneal murine macrophages was ≥ 80%, and there was no difference in cell viability among naïve (NA), vehicle (VH), and all EEP treatment groups, as assessed by trypan blue exclusion staining (data not shown). Thus, EEP suppressed both LPS-induced TNF-α and IL-6 secretion by mouse peritoneal macrophages with IL-6 exhibiting more sensitivity to suppression. Reduced TNF-α and IL-6 production by EEP treatment was also observed in the LPS-activated mouse macrophage cell line, RAW264.7 (Fig. 4A and B). Cellular viability of RAW264.7 cells was ≥ 85% for all treatment groups and no differences in cell viability were observed among NA, VH, and EEP (data not shown). Thus, EEP was capable of impairing proinflammatory cytokine levels of TNF-α and IL-6 produced by both peritoneal macrophages and RAW264.7 macrophage cell line.

3.5. EEP suppressed TNF-α and IL-6 proinflammatory cytokines mRNA levels in LPS-stimulated RAW264.7 cells

To determine if suppression of TNF-α and IL-6 production by EEP was related to changes in mRNA levels for both inflammatory cytokines, qRT-PCR was performed. Increasing concentrations of EEP produced a concomitant decrease in mRNA levels for both TNF-α and IL-6 in LPS-activated RAW264.7 cells (Fig. 5A and B). The profile of TNF-α and IL-6 suppression by EEP at both the protein and mRNA level was remarkably similar with EEP exerting a more pronounced effect on IL-6 than TNF-α.

3.6. EEP suppressed LPS-induced NF-κB DNA binding activity in the TNF-α and the IL-6 promoters

In order to gain further insight into the molecular mechanisms of EEP-mediated suppression of TNF-α and IL-6 production, EMSAs were conducted to examine EEP modulation of transcription factor DNA binding activity. As previously reported (Kuprash et al., 1999), the mouse TNF-α promoter contains several key NF-κB elements

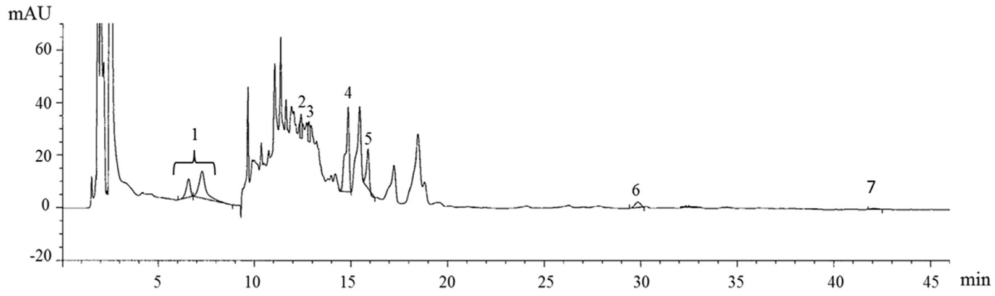


Fig. 1. Typical HPLC profile of EEP at 270 nm. Peaks: 1, gallic acid; 2, tannic acid; 3, catechin; 4, rutin; 5, isoquercetin; 6, quercetin; 7, kaempferol.

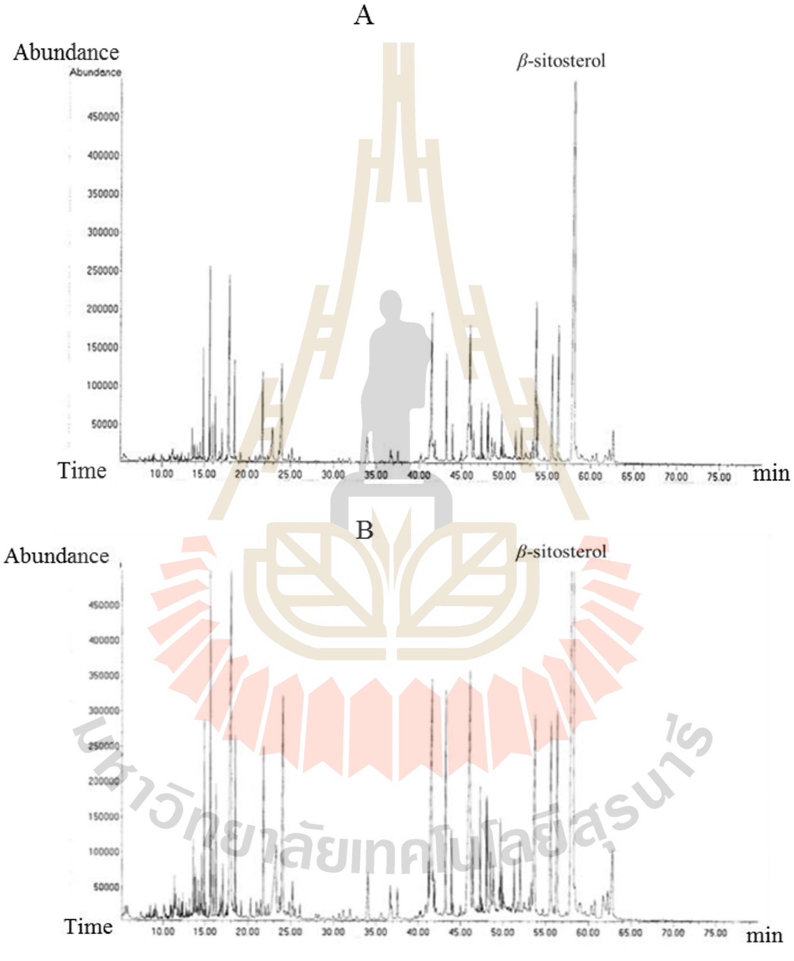


Fig. 2. Typical GC-MS profile of *n*-hexane fraction (A) and chloroform fraction (B) from EEP.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

that are critically involved in regulating transcription (−860, −660, −630, and −510). Of these four κB sites, the κB element located at −510 was reported to exhibit the strongest DNA binding activity. Based on these prior findings, the effect of EEP on LPS-induced NF-κB DNA-binding activity was investigated by EMSA using nuclear extracts from RAW264.7 cells. Initially, kinetic studies were conducted to identify the peak time of κB binding after LPS activation using RAW264.7 cells. As shown in Figs. 6A and 7A, NF-κB DNA binding activity in the mouse TNF-α and mouse IL-6 promoter was similarly induced with 100 ng/ml of LPS within 30 min and remained elevated throughout the 4 h time period. Exposure to various concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) for 1 h prior to LPS (100 ng/ml) activation suppressed the induced NF-κB binding activity observed at 30 min post activation, in a concentration-

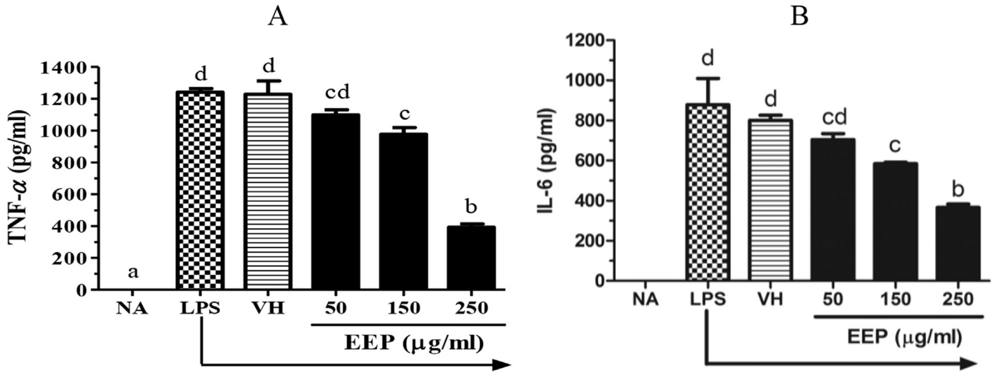


Fig. 3. EEP suppressed TNF-α (A) and IL-6 (B) release in LPS-activated mouse peritoneal macrophages. Mouse peritoneal macrophages (2.5×10^5 cells/well) were pretreated with various concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) or vehicle control for 1 h. Cells were then activated with 100 ng/ml LPS for 8 h. The supernatants were harvested and measured for TNF-α and IL-6 productions by ELISA. Values shown are the mean ± SEM (n = 3) and are representative of three independent experiments. Bars marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

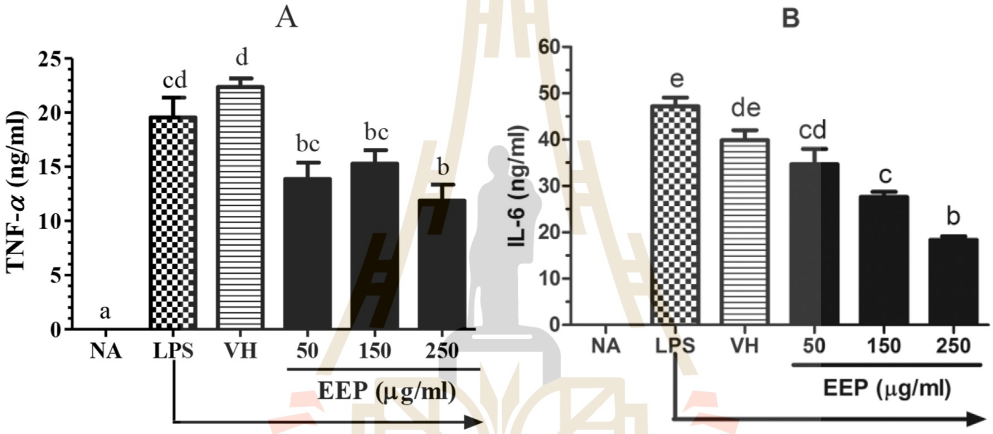


Fig. 4. EEP suppressed TNF-α (A) and IL-6 (B) release in LPS-activated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (2×10^6 cells/well) were pretreated with various concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) or vehicle control for 1 h prior to activation with 100 ng/ml LPS for 8 h. The supernatants were harvested. TNF-α and IL-6 production was quantified by ELISA. Data are presented as mean ± SEM (n = 3) and are representative of three independent experiments. Bars marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

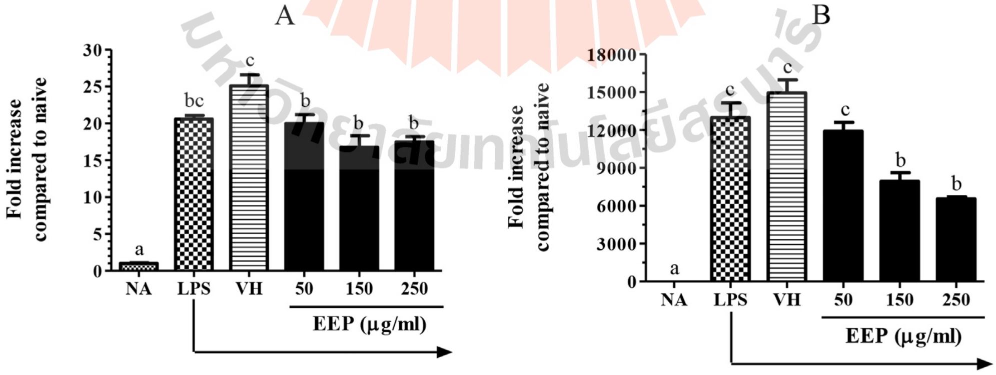


Fig. 5. EEP suppressed TNF-α (A) and IL-6 (B) proinflammatory cytokine gene expressions in LPS-activated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (2×10^6 cells/well) were pretreated with various concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) or vehicle control for 1 h followed by activation with 100 ng/ml LPS. Cells were then incubated for 8 h after-activation, at which time total RNA was isolated. TNF-α and IL-6 mRNA levels were determined by qRT-PCR using Taqman primers and probes. Endogenous 18S rRNA was used as a control and fold changes were obtained using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data are presented as mean ± SEM (n = 3) and are representative of three independent experiments. Bars marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

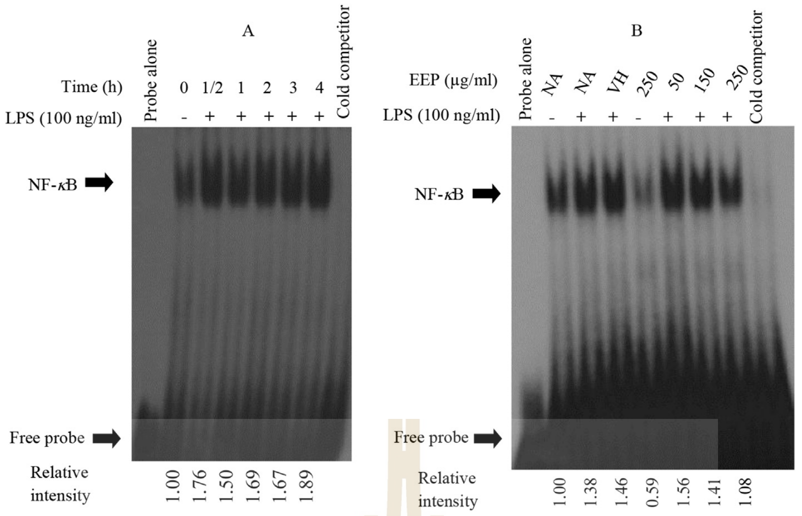


Fig. 6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of NF-κB DNA binding activity in the mouse TNF-α promoter. (A) Time course for LPS-induced NF-κB DNA binding activity in RAW264.7 cells. (B) The effect of EEP on NF-κB binding activity in LPS-activated RAW264.7 cells. Cells were pretreated with increasing concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) for 1 h and then activated with 100 ng/ml LPS for 30 min. The nuclear protein (0.5 μg) was resolved by EMSA as described in the materials and methods. 25-fold excess of unlabeled probe was used to compete with the labeled oligonucleotide and it their NF-κB binding activity was compared at 30 min time point. The data shown are representative of 3 independent experiments.

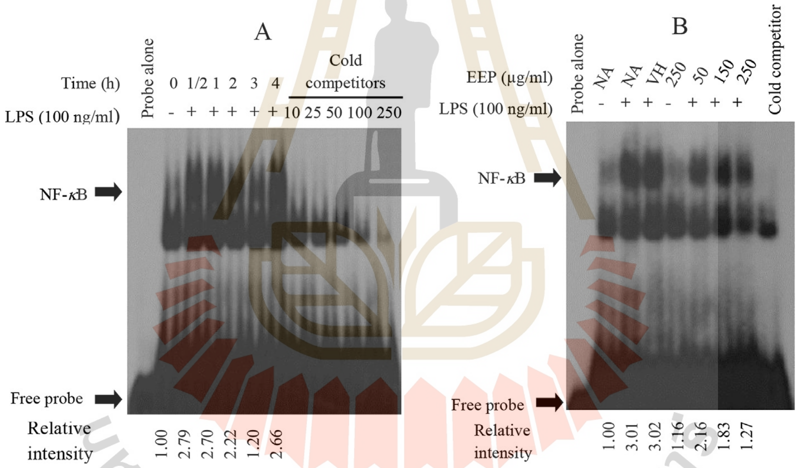


Fig. 7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of NF-κB DNA binding activity in the mouse IL-6 promoter. (A) Time course for LPS-induced NF-κB DNA binding activity in RAW264.7 cells. (B) The effect of EEP on NF-κB binding activity in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pretreated with increasing concentrations of EEP (50, 150, or 250 μg/ml) for 1 h and then activated with 100 ng/ml LPS for 30 min. The nuclear protein (1 μg) was resolved by EMSA as described in the materials and methods. The binding specificity was determined using an unlabeled probe (10–250 fold in excess) to compete with the labeled oligonucleotide and their NF-κB binding activity was compared at 30 min time point. The data shown are representative of 3 independent experiments.

dependent manner (Figs. 6B and 7B).

3.7. EEP suppressed LPS-induced C/EBP DNA binding activity in IL-6 promoter

To further investigate transcription factor responses modulated by EEP, gel shift assays of C/EBP binding to the IL-6 promoter were performed on RAW264.7 cell extracts. We first examined the peak time of C/EBP DNA binding activity in 100 ng/ml of LPS-stimulated RAW264.7 cells. As presented in Fig. 8A, C/EBP DNA binding activity in the mIL-6 promoter was induced by LPS within 30 min, reaching a peak at 2 h, decreasing thereafter and almost returned to basal level by 4 h. Exposure to increasing EEP concentrations (50, 150, or 250 μg/ml) produced a concentration-dependent suppression of C/EBP DNA binding activity in mIL-6 promoter, as observed at 2 h post activation (Fig. 8B).

3.8. EEP suppressed LPS-induced AP-1 DNA binding activity in IL-6 promoter

Gel shift analysis was also conducted to determine whether EEP alters AP-1 DNA binding activity in LPS-activated RAW264.7 cells.

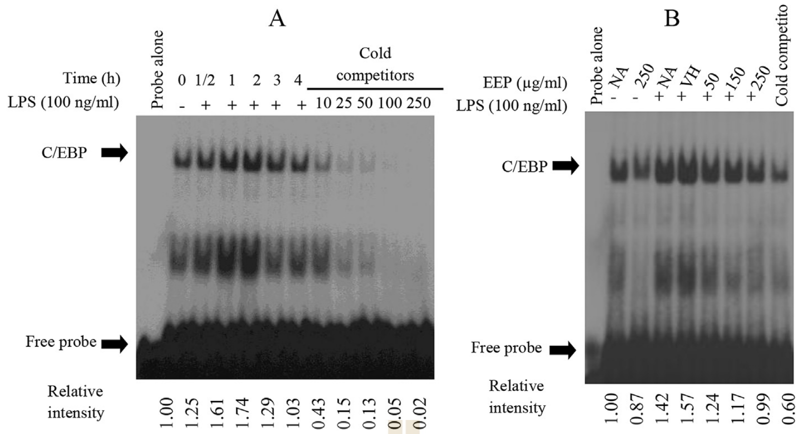


Fig. 8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of C/EBP DNA binding activity in the mouse IL-6 promoter. (A) Time course for LPS-induced C/EBP DNA binding activity in RAW264.7 cells. (B) The effect of EEP on C/EBP binding activity in LPS-activated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pretreated with increasing concentrations of EEP (50, 150, or 250 µg/ml) for 1 h and then activated with 100 ng/ml LPS for 2 h. The nuclear protein (1 µg) was resolved by EMSA as described in the materials and methods. The binding specificity was determined using an unlabeled probe (10–250 fold in excess) to compete with the labeled oligonucleotide and their C/EBP binding activity was compared at 30 min time point. The data shown are representative of 3 independent experiments.

Kinetic analysis revealed the peak time of AP-1 DNA binding activity was at 30 min (Fig. 9A). The potency of EEP on AP-1 DNA binding activity in activated RAW264.7 cell was evidenced by a concentration-dependent decrease of both upper and lower bands of AP-1 DNA binding activity at the 30 min post activation (Fig. 9B).

3.9. EEP-mediated suppression of pmIL-6.Luc(-231) reporter activity in LPS-activated RAW264.7 cells

To further investigate whether the impairment of NF-κB, C/EBP, and AP-1 DNA binding activity in LPS activated RAW264.7 cells by EEP resulted in suppression of IL-6 transcription, transient transfection experiments were performed using an IL-6 promoter reporter. Previously, Baccam and coworkers showed the activation of 5′truncation mutants of the mIL-6 [pmIL-6.Luc(-231), pmIL-6.Luc(-161), pmIL-6.Luc(-84)] promoter/luciferase reporter with CD40 in CD154.CH12.LX B cells resulted in strongest luciferase activity with pmIL-6.Luc(-231). In fact, pmIL-6.Luc(-231) exhibited comparable activity to the original full length mIL-6 promoter (pmIL-6.Luc(-1277)) (Baccam et al., 2003). Based on these prior findings, we

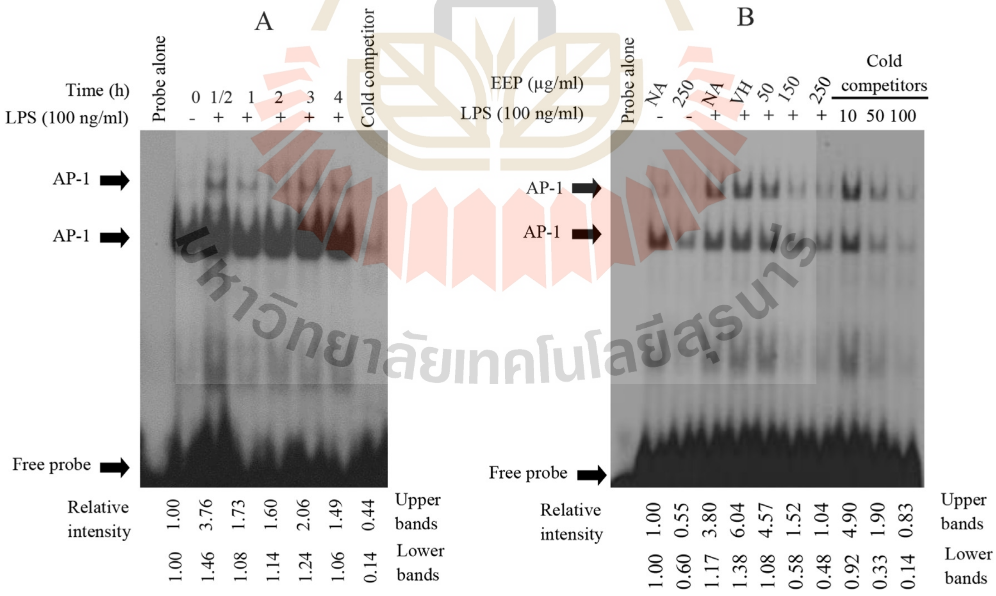


Fig. 9. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of AP-1 DNA binding activity in the mouse IL-6 promoter. (A) Time course for LPS-activated AP-1 DNA binding activity in RAW264.7 cells. (B) The effect of EEP on AP-1 binding activity in LPS-activated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pretreated with increasing concentrations of EEP (50, 150, or 250 µg/ml) for 1 h and then activated with 100 ng/ml LPS for 30 min. The nuclear protein (1 µg) was resolved by EMSA as described in the materials and methods. The binding specificity was determined using an unlabeled probe (10–100 fold in excess) to compete with the labeled oligonucleotide and their AP-1 binding activity was compared to VH control. The data shown are representative of 3 independent experiments.

investigated whether EEP suppression on IL-6 induction in LPS-activated RAW264.7 cells occurred at the level of transcription by using the IL-6 promoter-reporter possessing the 5′ truncation, pmIL-6.Luc(-231) (Baccam et al., 2003) (Fig. 10A). As presented in Fig. 10B, pmIL-6.Luc(-231)–transfected RAW264.7 cells expressed higher luciferase activity upon LPS induction for 18 h, suggesting that the LPS regulatory elements present within the 231 base pairs upstream of transcription start site were functionally active. However, preliminary LPS concentration-response range finding studies using 100 to 1000 ng/ml did not produce significant differences in luciferase activity in RAW264.7 cells. Fig. 10C shows that EEP treatment of transiently transfected RAW264.7 cells with pmIL-6 followed by activation with increasing concentrations of LPS demonstrated a dependent decrease in luciferase activity. It is noteworthy that IL-6 reporter activity was greatly reduced with EEP treatment (150 and 250 μg/ml).

4. Discussion

Natural products derived from plants have long been used for medicinal purposes and are also potentially important sources of anti-inflammatory therapeutic agents (Gautam and Jachak, 2009). The present study reports on the immune modulatory activity of EEP as evidenced by suppression of the proinflammatory cytokines, TNF-α and IL-6, by LPS-activated murine peritoneal macrophages and RAW264.7 cells. Because high levels of TNF-α and IL-6 play a critical role in acute and chronic inflammatory diseases, both cytokines are prime targets for intervention by anti-inflammatory therapeutic agents. Thus, suppression of elevated TNF-α and IL-6, induced by LPS, has served as a biological model for evaluating anti-inflammatory drug candidates (Hüll et al., 1996; Wang et al., 2007; Wu and Gu, 2009).

Certain phytochemicals, especially polyphenols, have been known to possess immune suppressive activity. Characterization of EEP constituents in the present study revealed that the extract contained phytosterol (β-sitosterol) and polyphenols. The detected polyphenols were identified as gallic acid, isoquercetin, kaempferol, quercetin, rutin, catechin and tannic acid. Many studies have demonstrated that these polyphenols possess anti-inflammatory property by suppressing pro-inflammatory mediators including TNF-α and IL-6. For example, treatment of RAW264.7 cells with quercetin suppressed LPS-induced TNF-α (K. R. M. and Ghosh, 1999; Xagorari et al., 2001) and IL-6 production (Xagorari et al., 2001). Rutin and quercetin isolated from *Phyllanthus urinaria* Linnea also suppressed IL-6 and TNF-α production from peritoneal macrophages activated using LPS and IFN-γ in combination (Fang et al., 2008). Likewise, treatment of primary macrophages with (+)-catechin suppressed LPS-induced TNF-α production (Guruvayoorappan and Kuttan, 2008). Moreover, kaempferol glycosides isolated from the leaves of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh suppressed LPS plus IFN-γ-induced TNF-α (Fang et al., 2005).

It is possible that polyphenols in EEP such as quercetin, catechin, rutin or kaempferol represent the major active constituents responsible for anti-inflammatory activity by down regulating TNF-α and IL-6 released from RAW264.7 cells. Interestingly, PP belongs to the Acanthaceae plant family like *Andrographis paniculata* (AP) and whose extracts displayed a wide spectrum of bioactivities, including impairment of inflammatory responses (Akbar, 2011). Indeed, TNF-α and IL-6 mRNA expression were down regulated by andrograpanin isolated from AP (Liu et al., 2008), mirroring the profile of suppression by EEP in LPS-activated macrophages, as observed in the present study.

To further gain insight into the molecular mechanisms by which EEP impairs TNF-α and IL-6, the effects of EEP on the activation of

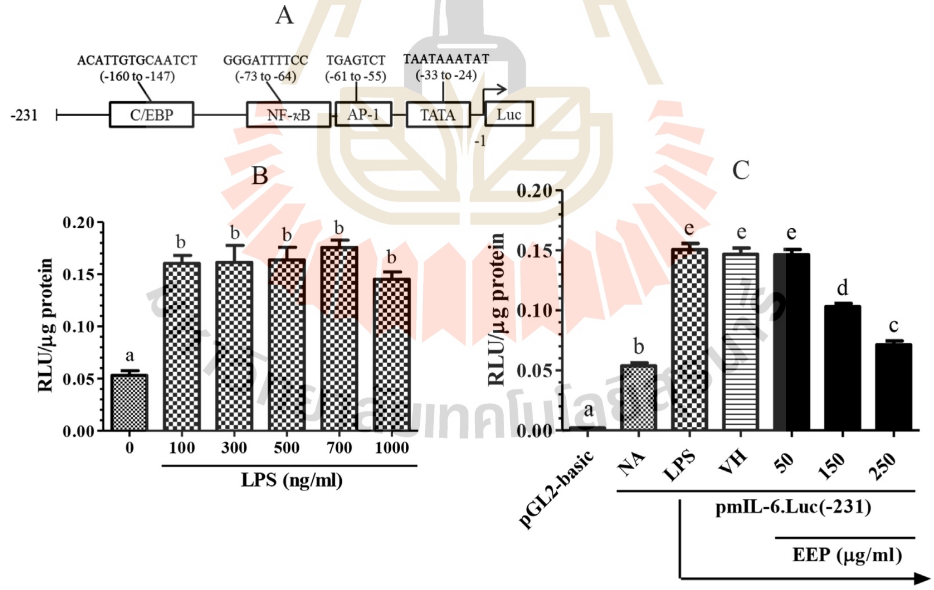


Fig. 10. IL-6 promoter reporter luciferase activity in transient transfected RAW264.7 cells. (A) a schematic diagram of −231 IL-6 promoter reporter construct. Transcriptional response elements of AP-1, NF-κB, and C/EBP. (B) IL-6 promoter reporter activity in RAW264.7 cells transiently transfected with pmIL-6.Luc(-231) construct and treated with or without LPS at indicated concentrations for 18 h (C) pmIL-6.Luc(-231) reporter activity in RAW264.7 cells treated with EEP. RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were preseeded in a 6-well plate and then transiently transfected with pGL2-basic and pmIL-6.Luc(-231). Transfected cells were scraped and distributed to a 48-well plate (4×10^5 cells/well) and incubated overnight. Cells were then pretreated with indicated concentrations of EEP or vehicle for 1 h, followed by addition of 700 ng/ml LPS. Eighteen hours after LPS treatment, luciferase activity was quantified in relative light units (RLU) by chemiluminescence assay. The luciferase activity was then normalized to the determined amount of total protein. Results of luciferase expression are expressed as a RLU/μg protein. The results are presented as mean ± SEM (n = 4) and are representative of three independent experiments. Bars marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

key transcription factors involved in TNF-α and mIL-6 regulation, principally NF-κB, C/EBP, and AP-1, were examined. The present study demonstrated that EEP decreased activation of NF-κB DNA binding activity in both mTNF-α and mIL-6 promoters in a concentration-dependent manner. In fact, decreased NF-κB DNA binding activity to its cognate DNA response element in both the mTNF-α and mIL-6 promoters, respectively, was consistent with decreased TNF-α and IL-6 protein synthesis and mRNA expression in LPS-activated RAW264.7 cells. In addition, *cis*-acting elements for C/EBP and AP-1 are present within the murine IL-6 promoter region (Baccam et al., 2003). Both C/EBP and AP-1 are required for IL-6 induction by LPS in RAW264.7 macrophages. Our results show that EEP also suppressed C/EBP and AP-1 DNA binding activity to their respective sites within the mIL-6 promoter. It is important to emphasize that although many studies have shown various natural products can impair LPS-induced DNA binding activity of both AP-1 and C/EBP to probes barring consensus sequences (Cho et al., 2003, 2004; Lee et al., 2003), the results here demonstrate decreased DNA binding activity to a bona fide NF-κB *cis*-element within the mTNF-α promoter and NF-κB, C/EBP, and AP-1 binding sites present in the mIL-6 promoter. In the absence of LPS, EEP-exposed RAW264.7 cells also displayed lower background mRNA levels of both mTNF-α and mIL-6, when compared to naïve resting cells (Figs. 6B, 8B and 9B). These results suggested that EEP could have therapeutic utility by decreasing transcription of proinflammatory cytokines. Furthermore, the present study also showed that EEP suppressed LPS-induced IL-6 reporter activity in a concentration-dependent manner suggesting the suppression of IL-6 occurred at the transcription level. As the activation of NF-κB, C/EBP and AP-1 results in the expression of the gene encoding IL-6 (Baccam et al., 2003), the suppression of IL-6 mRNA expression by EEP is mediated, at least in part, through decreased transcriptional activity regulated by NF-κB, C/EBP, and AP-1.

The suppression of NF-κB, C/EBP and AP-1 transcriptional activity leading to a reduction of proinflammatory cytokines by constituents isolated from the Acanthaceae plant family has been demonstrated previously. For example, the ethyl acetate extract from AP significantly suppressed NF-κB luciferase activity resulting in a reduction of TNF-α and IL-6 production in LPS/IFN-γ stimulated RAW264.7 macrophages (Chao et al., 2011). In addition, a mixture of β-sitosterol and stigmasterol isolated from AP significantly suppressed NF-κB luciferase activity and TNF-α and IL-6 productions in LPS/IFN-γ stimulated RAW264.7 macrophages (Chao et al., 2010). Likewise, gallic acid can also suppress LPS-induced NF-κB luciferase reporter expression in RAW264.7 cells (Huang et al., 2005). In addition, catechin in tea can suppress LPS-induced proinflammatory TNF-α mRNA expression, its protein synthesis, and NF-κB DNA binding in RAW264.7 cells (Yang et al., 1998). In this study, PP contains β-sitosterol, gallic acid, catechin, as well as other polyphenols. All of the aforementioned compounds either possess known or have been implicated in anti-inflammatory activity.

In conclusion, this study demonstrates that EEP-mediated suppression of LPS-induced TNF-α and IL-6 protein synthesis and mRNA expression in murine macrophages occurs, at least in part, through suppression of NF-κB (−510) in the mTNF-α and NF-κB, C/EBP and AP-1 activation and DNA binding in the mIL-6 promoters. Furthermore, LPS activation of IL-6 reporter activity in transfected RAW264.7 cells was also suppressed by EEP. Although the therapeutic benefits of various herbal medicines have, for the most part, been anecdotal in nature rather than scientifically validated, PP leaves have long been traditionally used by Thai and Vietnamese people for prevention and treatment of various inflammatory diseases. Considering its long historical use in folk medicine, its potential bioactive constituents, and the anti-inflammatory evidence provided by this study, components of the PP leaf possess strong potential to be further developed as a therapeutic for the prevention and/or treatment of inflammatory diseases.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

This study was financially supported by the Royal Golden Jubilee Scholarship (Grant No. PhD/0208/2548) and by National Research Council of Thailad (NRCT) through Suranaree University of Technology (SUT-104-53-36-09).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.021.

References

Akbar, S., 2011. *Andrographis paniculata*: a review of pharmacological activities and clinical effects. Altern. Med. Rev. 16, 66–77.

Allen, D.L., Uyenishi, J.J., Cleary, A.S., Mehan, R.S., Lindsay, S.F., Reed, J.M., 2010. Calcineurin activates interleukin-6 transcription in mouse skeletal muscle *in vivo* and in C2C12 myotubes *in vitro*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 298, R198–R210. http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00325.2009.

AOAC, 2010. Official Methods of Analysis. Gaithersburg, MD.

AOAC International, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International, eighteenth ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Baccam, M., Woo, S.-Y., Vinson, C., Bishop, G.A., 2003. CD40-mediated transcriptional regulation of the IL-6 gene in B lymphocytes: involvement of NF-κB, AP-1, and C/EBP. J. Immunol. 170, 3099–3108.

Calixto, J.B., Otuki, M.F., Santos, A.R., 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). Planta Med. 69, 973–983. http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-45141.

Chao, W.W., Kuo, Y.H., Lin, B.F., 2010. Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-kappaB transactivation inhibition. J. Agric. Food Chem. 58, 2505–2512. http://dx.doi.org/10.1021/jf903629j.

Chao, W.W., Kuo, Y.H., Hsieh, S.L., Lin, B.F., 2011. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Andrographis paniculata* on NF-kappaB trans-activation activity and LPS-induced acute inflammation in mice. Evid.-Based Complement. Altern. Med. 2011, 1–9. http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep120.

Cho, Y.H., Lee, C.H., Kim, S.G., 2003. Potentiation of lipopolysaccharide-inducible cyclooxygenase 2 expression by C2-ceramide via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of CCAAT/enhancer binding protein β in macrophages. Mol. Pharmacol. 63, 512–523.

Cho, M.K., Jang, Y.P., Kim, Y.C., Kim, S.G., 2004. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF-alpha inhibition. Int. Immunopharmacol. 4, 1419–1429. http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2004.06.011.

Colon, A.L., Menchen, L.A., Hurtado, O., De Cristobal, J., Lizasoain, I., Leza, J.C., Lorenzo, P., Moro, M.A., 2001. Implication of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) in inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in an experimental model of colitis. Cytokine 16, 220–226. http://dx.doi.org/10.1006/cyto.2001.0969.

Condie, R., Herring, A., Koh, W.S., Lee, M., Kaminski, N.E., 1996. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase-mediated signal transduction and interleukin 2 (IL-2) expression in the murine T-cell line, EL4. IL-2. J. Biol. Chem. 271, 13175–13183.

de las Heras, B., Slowing, K., Benedí, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., Bermejo, P., Iglesias, I., Abad, M.J., Gómez-Serranillos, P., Liso, P.A., Villar, A., Chiriboga, X., 1998. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. J. Ethnopharmacol. 61, 161–166. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00029-4.

Decreto-Lei no. 167/2004 de 7 de Julho.

Dieu, H.K., Loc, C.B., Yamasaki, S., Hirata, Y., 2006. The effects of *Pseuderanthemum palatiferum*, a new medicinal plant, on growth performances and diarrhea of piglets. Jpn. Agric. Res. Q. 40, 85–91.

Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hebert, M.E., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C., Legault, J., 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. J. Ethnopharmacol. 111, 22–28. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.021.

Fang, S.-H., Rao, Y.K., Tzeng, Y.-M., 2005. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN-γ-activated murine macrophages. Bioorg. Med. Chem. 3, 2381–2388. http://

dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.01.050.
Fang, S.-H., Rao, Y.K., Tzeng, Y.-M., 2008. Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. J. Ethnopharmacol. 116, 333–340. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.040.
Founds, S.A., Powers, R.W., Patrick, T.E., Ren, D., Harger, G.F., Markovic, N., Roberts, J.M., 2008. A comparison of circulating TNF-alpha in obese and lean women with and without preeclampsia. Hypertens. Pregnancy 27, 39–48. http://dx.doi.org/10.1080/10641950701825838.
Gabay, C., 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res. Ther. 8 (Suppl. 2), 1–6. http://dx.doi.org/10.1186/ar1917.
Gautam, R., Jachak, S.M., 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. Med. Res. Rev. 29, 767–820. http://dx.doi.org/10.1002/med.20156.
Giang, P.M., Bao, H.V., Son, P.T., 2003. Phytochemical study on *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., Acanthaceae. J. Chem. 41, 115–118.
Giang, P.M., Bao, H.V., Son, P.T., 2005. Study on anti-oxidative activities and preliminary investigation on antibacterial, antifungal of extracted fraction rich in flavonoids from leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. TC Dược-choc 9, 9–12 ([In Vietnamese with English Summary]).
Guha, M., Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell. Signal 13, 85–94. http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00149-2.
Guruvayoorappan, C., Kuttan, G., 2008. (+)-Catechin inhibits tumor angiogenesis and regulates the production of nitric oxide and TNF-α in LPS-stimulated macrophages. Innate Immun. 14, 160–174. http://dx.doi.org/10.1177/1753425908093295.
Huang, T.H.W., Pharm (Hons), B., Yang, Q., Harada, M., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D., Li, Y., 2005. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. J. Cardiovasc. Parmacol. 46, 856–862.
Hüll, M., Fiebich, B.L., Lieb, K., Strauss, S., Berger, M., Volk, B., Bauer, J., 1996. Interleukin-6-associated inflammatory processes in Alzheimer's disease: new therapeutic options. Neurobiol. Aging 17, 795–800. http://dx.doi.org/10.1016/0197-4580(96)00107-8.
Kaminski, N.E., Roberts, J.F., Guthrie, F.E., 1982. The effects of DDT and dieldrin on rat peritoneal macrophages. Pestic. Biochem. Physiol. 17, 191–195. http://dx.doi.org/10.1016/0048-3575(82)90025-6.
Khumpook, T., Chomdej, S., Saenphet, S., Amornlerdpison, D., Saenphet, K., 2013. Anti-inflammatory activity of ethanol extract from the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. Chiang Mai J. Sci. 40, 321–331.
Kishimoto, T., 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. Int. Immunol. 22, 347–352. http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxq030.
Koj, A., 1996. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. Biochim. Biophys. Acta 1317, 84–94. http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4439(96)00048-8.
Kuprash, D.V., Udalova, I.A., Turetskaya, R.L., Kwiatkowski, D., Rice, N.R., Nedospasov, S.A., 1999. Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide. J. Immunol. 162, 4045–4052.
Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G., 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. Br. J. Pharmacol. 139, 11–20. http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705231.
Liu, Z.-g., Han, J., 2001. Cellular responses to tumor necrosis factor. Curr. Issues Mol. Biol. 3, 79–90.
Liu, J., Wang, Z.T., Ge, B.X., 2008. Andrograpanin, isolated from *Andrographis paniculata*, exhibits anti-inflammatory property in lipopolysaccharide-induced macrophage cells through down-regulating the p38 MAPKs signaling pathways. Int. Immunopharmacol. 8, 951–958. http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2007.12.014.
Manjeet, K.R., Ghosh, B., 1999. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor Necrosis factor-α production in murine macrophages. Int. J. Immunopharmacol. 21, 435–443. http://dx.doi.org/10.1016/S0192-0561(99)00024-7.
Mohler, K.M., Torrance, D.S., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Stremler, K.E., Fung, V.P., Madani, H., Widmer, M.B., 1993. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. J. Immunol. 151, 1548–1561.
Padee, P., Nualkaew, S., Talubmook, C., Sakuljaitrong, S., 2010. Hypoglycemic effect of a leaf extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 132, 491–496. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.056.
Poli, V., 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. J. Biol. Chem. 273, 29279–29282.
Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X.-Y., Shealy, D., Wagner, C., 2002. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. J. Pharmacol. Exp. Ther. 301, 418–426.
Sheeja, K., Shihab, P.K., Kuttan, G., 2006. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 28, 129–140. http://dx.doi.org/10.1080/08923970600626007.
Sittisart, P., Chitsomboon, B., 2014. Intracellular ROS Scavenging activity and downregulation of Inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage by fresh leaf extracts of *Pseuderanthemum palatiferum*. Evid.-Based Complement. Altern. Med. 2014, 1–11. http://dx.doi.org/10.1155/2014/309095.
Van Miert, A.S.J.P.A.M., 2002. Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. Vet. Res. Commun. 26, 111–126. http://dx.doi.org/10.1023/A:1014043601287.
Vassalli, P., 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Annu. Rev. Immunol. 10, 411–452. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.002211.
Wang, Q., Zhang, Y., Hall, J.P., Lin, L.L., Raut, U., Mollova, N., Green, N., Cuozzo, J., Chesley, S., Xu, X., Levin, J.I., Patel, V.S., 2007. A rat pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 56, 67–71. http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2007.02.001.
Wu, M., Gu, Z., 2009. Screening of bioactive compounds from moutan cortex and their anti-inflammatory activities in rat synoviocytes. Evid.-Based Complement. Altern. Med. 6, 57–63. http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem066.
Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T., Roussos, C., 2001. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. J. Pharmacol. Exp. Ther. 296, 181–187.
Yang, F., de Villiers, W.J., McClain, C.J., Varilek, G.W., 1998. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. J. Nutr. 128, 2334–2340.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2014, Article ID 309095, 11 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2014/309095

Research Article

Intracellular ROS Scavenging Activity and Downregulation of Inflammatory Mediators in RAW264.7 Macrophage by Fresh Leaf Extracts of *Pseuderanthemum palatiferum*

Patcharawan Sittisart[1] and Benjamart Chitsomboon[2]

[1] *School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*
[2] *School of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

Correspondence should be addressed to Benjamart Chitsomboon; benja@sut.ac.th

Received 18 December 2013; Accepted 5 February 2014; Published 16 March 2014

Academic Editor: Yoshiji Ohta

Copyright © 2014 P. Sittisart and B. Chitsomboon. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Beneficial antioxidant phytochemicals are found in many medicinal plants. *Pseuderanthemum palatiferum* (PP), a well-known Vietnamese traditional medicinal plant in Thailand, has long been used in folk medicine for curing inflammatory diseases, often with limited support of scientific research. Therefore, this study aimed to determine antioxidant and modulation of inflammatory mediators of ethanol and water extracts of PP (EEP and WEP, resp.). WEP had significantly higher phenolic and flavonoid levels and DPPH radical scavenging activity than EEP. However, EEP exhibited greater reducing power than WEP. A greater decrease of *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in RAW264.7 macrophage cells was also observed with EEP. Modulation of inflammatory mediators of EEP and WEP was evaluated on LPS plus IFN-γ-stimulated RAW264.7 cells. EEP more potently suppressed LPS plus IFN-γ-induced nitric oxide (NO) production than WEP. Both EEP and WEP also suppressed the expression of iNOS and COX-2 protein levels. Collectively, these results suggest that PP possesses strong antioxidant and anti-inflammatory properties.

1. Introduction

Oxidative stress is known to cause cellular damage linked to various degenerative processes and diseases, such as aging, ischemic injury, atherosclerosis, cancer, diabetes, and various inflammatory diseases [1]. Macrophages are key players in inflammation and their activation is crucial in inflammatory processes [2]. Many inflammatory stimuli including bacterial lipopolysaccharide (LPS) and IFN-γ can stimulate macrophages to produce proinflammatory cytokines and small mediators, such as nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE_2) [3]. Excess levels of NO produced by activated macrophages reflect the inflammation process and are regulated by inducible nitric oxide synthase (iNOS) [4]. Overproduction of NO has been known to be associated with various diseases, such as cancer, rheumatoid arthritis, septic shock, autoimmune disease, and chronic inflammation [5]. PGE_2, the key player in inflammatory response, is produced from arachidonic acid by prostaglandin synthase or cyclooxygenase (COX) enzymes. COX exists as two isoforms: COX-1 and COX-2. COX-1 is constitutively expressed and is a housekeeping enzyme required for normal physiological functions. COX-2 is considered as the inducible isoform and is primarily involved in inflammation [6]. Linkage and cross talk among NO, iNOS, and COX-2 during the inflammation process are well established. NO directly enhances COX-2 activity which results in a remarkable synthesis of PGE_2. iNOS and COX-2 can work together in a variety of similar pathophysiological actions and inflammatory diseases [5, 7]. In addition, many inflammatory effects have been reported to be associated with high productions of NO, iNOS, and COX-2 [8]. Therefore, an agent with inhibitory effects on excess levels of NO, iNOS, and COX-2 expression would be highly beneficial and part of an effective strategy in the treatment of inflammatory diseases.

Over the last decade medicinal plants as potential sources of naturally occurring antioxidants have been the focus of intense research. Moreover, phytochemicals such as flavonoids and other polyphenolics with high reactive oxygen species (ROS) scavenging activities have been shown to exhibit multiple biological effects, including antiallergic, antibacterial, antidiabetic, anticancer, and anti-inflammatory activities [9]. As oxidative stress and inflammation are closely linked and are implicated in many diseases [10], plants that possess both antioxidant and anti-inflammatory properties have always attracted considerable research interest. *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. (PP), a member of the Acanthaceae plant family and commonly called Hoan-Ngoc, is one of the most popular medicinal plants in both Thailand and Vietnam. Phytochemical analysis of PP leaf extracts suggests many high potential antioxidant and anti-inflammatory constituents [11]. In fact, PP has been referred to as a miracle plant in folk medicine to cure or prevent various maladies and inflammatory related diseases such as diarrhea, sore throat, hypertension, gastric ulcer, diabetes, and cancer [12, 13]. Nevertheless, the scientific evidence to support its multiple biological effects is still limited, particularly related to anti-inflammation. Although the antioxidant property of PP leaf extracts has been previously shown [14, 15], its intracellular ROS scavenging activity has never been assessed. To date, there is only one study reporting the anti-inflammatory activity of PP leaf extract [13], and the mechanism responsible for the anti-inflammation remains largely unknown. This study further compares antioxidant activity between ethanol and water extracts of PP leaves using various *in vitro* antioxidant evaluation methods including the assessment in the cell-based DCFH-DA assay. The modulation of PP leaf extracts in NO production, iNOS, and COX-2 expression during the inflammatory response was also investigated in the murine macrophage-like cell line RAW264.7 stimulated with LPS plus IFN-γ.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Materials. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), (+)-catechin hydrate, and vitamin C were purchased from Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland). 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), penicillin G, streptomycin sulfate, resveratrol, N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED), sodium nitrite, LPS (*Escherichia coli* O111:B4), $2',7'$-dichlorofluorescin-diacetate (DCFH-DA), and *tert*-butyl hydroperoxide (tBuOOH) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Amresco Inc. (Solon, OH, USA). Quercetin dihydrate was obtained from INDOFINE Chemical Company, Inc. (Hillsborough, NJ, USA). 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) was purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Mouse interferon gamma (mIFN-γ) and ECL Western blotting substrate were purchased from Pierce Protein Research Products (Rockford, IL, USA). RPMI medium 1640, Hank's balanced salt solution (HBSS), and penicillin-streptomycin were obtained from Gibco Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Hyclone (Logan, UT, USA). Anti-iNOS and anti-tubulin mouse monoclonal antibodies and secondary antibody goat-anti-mouse-HRP conjugate for iNOS and tubulin were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-COX-2 mouse polyclonal antibody and secondary antibody goat-anti-rabbit IgG-HRP conjugate for COX-2 were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). The mouse macrophage cell line (RAW264.7 cells) was purchased from Cell Lines Service (Eppelheim, Germany). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise indicated.

2.2. Plant Material. Fresh leaves of PP were purchased from producers in Yasothon province, Thailand. The plant was identified and authenticated by Dr. Kongkanda Chayamarit, Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand. A voucher specimen (BKF 174009) was deposited at the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.

2.3. Plant Extract Preparation. Fresh leaves (1.5 kg) were cut into small pieces and blended in 6 L of 95% ethanol. The extract was centrifuged at 3,500 g for 10 min at 4°C and the supernatant was filtered through Whatman number 1 filter paper. The ethanolic filtrate was then concentrated using a vacuum rotary evaporator and lyophilized to obtain the ethanol extract of PP (EEP; 60.41 g). Forty grams of EEP were further partitioned between hexane and water (1 : 1) using a separatory funnel. The water fraction was collected, centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4°C, evaporated, and lyophilized to obtain a water extract of PP (WEP; 32.71 g). The EEP and WEP were stored at −20°C until they were needed in subsequent experiments. The EEP and WEP were dissolved in DMSO and water, respectively, when used in experiments. For cell cultures, the WEP was dissolved in phosphate buffered saline (PBS).

2.4. Total Phenolic Content. The total phenolic content of the individual extract was determined by the method of Folin-Ciocalteu [16]. Briefly, 100 μL of test solution was added to 2 mL of 2% Na_2CO_3 and mixed thoroughly. After 2 min, 100 μL of 50% Folin-Ciocalteu reagent was added, mixed, and allowed to stand at room temperature (RT) for 30 min. The absorbance of extracts was measured at 750 nm by a Cecil 1000 series spectrophotometer (Cecil Instruments, Cambridge, UK) against a blank consisting of only reagents and solvents without the extract. Gallic acid solutions ranging from 0.05 to 0.3 mg/mL were used to prepare a standard curve. The concentration of phenolic compounds in the extracts is expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE) per g of dry extract.

2.5. Total Flavonoid Content. The total flavonoid content was determined using a colorimetric method [17]. Briefly, 250 μL of sample was diluted with 1.25 mL of distilled water

(DI). Then 75 μL of 5% $NaNO_2$ solution was added to the mixture. After 6 min, 150 μL of a 10% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ solution was added, and the mixture was allowed to stand for another 5 min. One half mL of 1 M NaOH was added, and the total volume was brought up to 2.5 mL with DI water. The solution was thoroughly mixed, and the absorbance was measured immediately against the prepared blank at 510 nm. Catechin standard solutions (0.05–0.4 mg/mL) were used to prepare a standard curve. The concentration of flavonoids in the extracts is expressed as mg of catechin equivalent (CAE) per g of dry extract.

2.6. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) Assay. The ferric reducing ability of the extracts was measured colorimetrically according to the method developed by Benzie and Strain [18]. The FRAP reagent consisted of 0.1 M acetate buffer (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) solution in 40 mM HCl, and 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ solution. The fresh working solution was prepared by mixing the acetate buffer, the TPTZ solution, and the $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ solution in a 10 : 1 : 1, v/v/v, ratio. The FRAP reagent (3 mL) was added to 0.1 mL of the extract and mixed. Readings were recorded on the spectrophotometer at 593 nm, and the reaction was monitored for 10 min. A standard curve of 100–1,000 μmol $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ was prepared. Vitamin C (10–90 μg/mL), Trolox (10–160 μg/mL), and catechin (10–90 μg/mL) were used as standard antioxidants. The antioxidant power of the extracts is expressed as mmol ferrous ion (Fe^{2+}) per g of dry extract and also mg of vitamin C equivalent (VCE), Trolox equivalent (TRE), and catechin equivalent (CAE) per g of dry extract.

2.7. DPPH Assay. The scavenging activity of DPPH radicals was determined as described by Sánchez-Moreno et al. [19]. Briefly, 100 μL of extract at different concentrations was added to 3.9 mL of methanolic DPPH solution (63 mM). The mixture was shaken vigorously and left to stand at RT for 45 min in the dark. Samples that are able to scavenge DPPH free radicals reduce the purple DPPH radicals into the light yellow colored product of corresponding hydrazine $DPPH_2$. Decreasing DPPH solution absorption (measured spectrophotometrically at 515 nm) indicates an increase of DPPH radical scavenging activity [20]. DPPH solution plus methanol were used as negative control, and vitamin C, Trolox, and catechin were used as positive controls. The percent inhibition of DPPH radicals by test samples was determined by comparison with the methanol-treated control. The free radical scavenging activity which is the percentage inhibition of free radical is calculated as follows:

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right] \times 100, \quad (1)$$

where A_{sample} and A_{control} are absorbances of the sample and the control, respectively. The IC_{50} of DPPH radicals was determined from a dose response of inhibitory curve using linear regression analysis.

2.8. Cell Culture. The RAW264.7 macrophage cells were cultured at 37°C, 5% CO_2 in an RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin. Exponentially growing cells were used for experiments when they reached about 80% confluence.

2.9. Cell Viability (MTT Assay). A tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay was used to determine the viability of RAW264.7 cells as described by Chun et al. [21]. Briefly, RAW 264.7 cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well in a 96-well plate and incubated overnight at 37°C under 5% CO_2. After incubation, the cells were exposed to various concentrations of EEP or WEP for 24 h. Then, MTT (0.5 mg/mL) dye solution was added in each well and further incubated at 37°C, 5% CO_2 for 4 h. The media was removed and DMSO was added to each well to dissolve formazan crystals giving a uniform dark purple color before reading at 540 nm by the Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The percentage of cell viability was calculated by the following equation:

$$\text{Percent cell viability} = \frac{\text{OD}_{\text{test group}}}{\text{OD}_{\text{control group}}} \times 100. \quad (2)$$

2.10. Assessment of Intracellular ROS Scavenging Activity. Intracellular oxidative stress was detected using DCFH-DA as described by Kim et al. [22] with slight modification. Briefly, RAW264.7 cells (4×10^4 cells/well) were plated in a Costa 96-well black clear bottom plate (Corning Inc., Corning, NY, USA) and incubated for 16–18 h at 37°C and 5% CO_2. After incubation, the cells were washed with PBS twice. To assess antioxidant activity, the cells were preexposed to different concentrations of EEP, WEP (50, 150, or 250 μg/mL) or the antioxidant positive controls, catechin (250 μM), resveratrol (20 μM), or quercetin (10 μM), for 24 h. After washing twice with PBS, the cells were exposed to 20 μM DCFH-DA in HBSS and further incubated in the dark for another 30 min. The DCFH-DA was removed by washing the cells with PBS two times. Then, 500 μM tBuOOH was added. The unstimulated DCFH-DA (no tBuOOH) in the unexposed RAW264.7 cells served as the naive control (NA). The intensity of the fluorescence signal was detected time dependently with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm using a Gemini EM fluorescence microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.11. Nitrite Assay. The level of NO in the culture media was detected as nitrite, a major stable product of NO, using Griess reagent [23]. RAW264.7 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/well in a 96-well plate. The cells were grown for 3 h to allow plate attachment prior treating with the antioxidant positive control vitamin C (500 μM) or various concentrations (50, 100, 150, 200, or 250 μg/mL) of EEP or WEP. After 1 h incubation, the RAW264.7 cells were stimulated with 1 μg/mL LPS plus 25 U/mL IFN-γ. The activated cells were further incubated for 24 h. Then, 100 μL of supernatant was mixed with an equal volume of Griess

Table 1: The percentage of recovery of crude extracts from fresh leaves of PP.

Extracts	Amount and source of preparation	Yield (g)	Percentage of recovery
EEP	1,500 g of fresh leaves	60.41	4.03 (from fresh leaves)
WEP	40 g of EEP	32.71	81.77 (from EEP)
	(993.21 g of fresh leaves)		3.29 (from fresh leaves)

Table 2: Total phenolic and flavonoid contents and total antioxidant (FRAP) activity of EEP and WEP.

Extracts	TPC	TFC	FRAP values			
	(mg GAE/g)	(mg CAE/g)	(mmol Fe^{2+}/g)	(mg VCE/g)	(mg TRE/g)	(mg CAE/g)
EEP	200.14 ± 0.77^a	109.67 ± 0.35^a	2.87 ± 0.01^a	213.23 ± 1.09^a	292.54 ± 1.53^a	133.25 ± 0.67^a
WEP	212.47 ± 0.52^b	118.06 ± 0.36^b	2.61 ± 0.04^b	193.40 ± 2.65^b	264.70 ± 3.71^b	121.05 ± 1.63^b

Values are mean ± SEM ($n = 3$) and are representative of three independent experiments with similar results. Different letters within the same column are significantly different at $P < 0.05$ as determined by a Student's t-test.

reagent (1% sulfanilamide, 0.1% NED, and 3% phosphoric acid). After 10 min of incubation in the dark, the absorbance of samples was measured at 540 nm using a Microplate Spectrophotometer System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). A fresh culture medium was used as the blank in all experiments. The amount of nitrite in the samples was derived from a standard curve of sodium nitrite.

2.12. Western Blot Analysis. RAW264.7 cells were plated at a density of 2×10^6 cells/well in a 6-well plate. After an attachment period of approximately 3 h, the cells were treated with various concentrations (50, 100, 150, 200, or 250 μg/mL) of EEP or WEP for 1 h. 50 μg/mL Trolox or 500 μM vitamin C was used as antioxidant positive controls. The cells were then stimulated with 1 μg/mL LPS plus 25 U/mL IFN-γ for 18 h. After incubation, the cells were washed three times with PBS and placed in 150 μL of ice-cold lysis buffer (1 mL RIPA buffer supplemented with 2 mM PMSF, 2 μM leupeptin, and 1 μM E-64) for 20 min. Then the disrupted cells were transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 14,000 g at 4°C for 30 min. The supernatant was collected and the protein concentration of cell lysate was estimated by the Lowry method [24]. Cell lysate was then boiled for 5 min in a 6X sample buffer (50 mM Tris-base, pH 7.4, 4% SDS, 10% glycerol, 4% 2-mercaptoethanol, and 0.05 mg/mL of bromophenol blue). Thirty micrograms of cellular proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 7.5% and 10% polyacrylamide gels for iNOS and COX-2, respectively (125 volts, 120 min). The proteins in the gel were transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Pittsburgh, PA, USA) at 80 volts for 1 h. The membrane was blocked overnight at 4°C with 5% nonfat milk in 0.1% Tween 20 in a PBS buffer (TPBS). The membranes were then incubated with a 1 : 1,000 dilution of the primary antibody anti-iNOS mouse monoclonal or a 1 : 2,000 dilution of the primary antibody anti-COX-2 mouse polyclonal at RT for 2 h. After extensive washing with TPBS, the membranes were incubated with a 1 : 10,000 dilution of the secondary antibody goat-anti-mouse-HRP conjugate for iNOS and goat-anti-rabbit IgG-HRP conjugate for COX-2 at RT for 1 h. To control equal loading of total protein in all lanes, blots were also stained with primary antibody anti-tubulin mouse monoclonal at a dilution of 1 : 2,000 at RT for 2 h. After washing, the membranes were incubated with a 1 : 10,000 dilution of the secondary antibody goat-anti-mouse-HRP conjugate. The membranes were washed three times, for 10 min each time, with TPBS. The blots were incubated for 3 min in ECL Western blotting substrate and exposed to film. The relative expression of proteins was quantified densitometrically using the software imageJ and calculated according to the reference band of tubulin.

2.13. Statistical Analysis. All statistical analyses were conducted using GraphPad software (GraphPad Prism 5, USA). The data from the total phenolic and flavonoid contents as well as FRAP value results were analyzed by a Student's t-test to determine the statistical significance between two groups. DPPH, MTT, and nitrite assays were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a *post hoc* Tukey's analysis to determine differences between treatment and control groups [25]. The data from intracellular ROS scavenging were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonfferonni's *post hoc* test [26].

3. Results

3.1. The Percentage of Recovery of Crude Extracts from Fresh Leaves of PP. The percentages of recovery of crude extracts from fresh leaves of PP are shown in Table 1. EEP exhibited a percentage of recovery of 4.03%, while WEP had percentage of recovery of 3.29% based on the original weight of fresh leaves. WEP was prepared from the water fraction of EEP that was partitioned with hexane and water (1 : 1, v/v) with a percentage of recovery of 81.77% based on EEP.

3.2. Phenolic and Flavonoid Contents. WEP had a significantly higher level ($P < 0.05$) of total phenolic and flavonoid content than that of EEP (Table 2), and more than half of the phenolics in WEP and EEP are flavonoids.

3.3. Ferric Reducing Antioxidant Power. EEP and WEP were analyzed for their reducing ability along with three standard

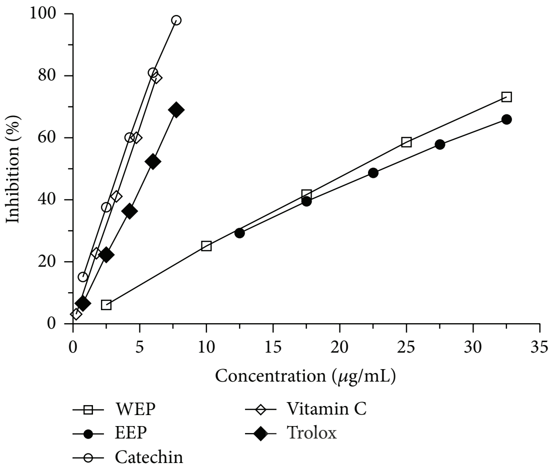


FIGURE 1: DPPH radical scavenging activity of PP leaf extracts (EEP and WEP) and positive controls (vitamin C, Trolox, and catechin). Values are means ± SEM ($n = 3$) and are representative of three independent experiments with similar results.

antioxidants, vitamin C, Trolox, and catechin. The results of FRAP values in terms of ferrous ion (Fe^{2+}) and vitamin C, Trolox, and catechin equivalents are shown in Table 2. EEP exhibited a higher degree of electron donating capacity than WEP as suggested by the significantly higher FRAP values ($P < 0.05$) of EEP when compared with WEP.

3.4. DPPH Free Radical Scavenging Activity. The free radical scavenging capacities of EEP and WEP are shown in Figure 1. The results show that both EEP and WEP exhibit the ability to scavenge DPPH free radicals. The scavenging activity against DPPH radicals of WEP (IC_{50} = 21.55 ± 0.06 μg/mL) is significantly greater ($P < 0.001$) than EEP (IC_{50} = 23.45 ± 0.12 μg/mL) by 1.9 ± 0.15%, but the scavenging capacity of these is not as effective as the other positive antioxidant controls. 12.5 μg/mL EEP and 2.5 μg/mL WEP scavenged the DPPH radicals by 29.27 ± 0.20% and 6.12 ± 0.15%, respectively, and the scavenging capacities of both are more pronounced at higher concentrations. The highest concentration (32.5 μg/mL) of EEP and WEP could scavenge the DPPH radicals by 65.96 ± 0.21% and 73.19 ± 0.09%, respectively. In the present study, the scavenging abilities of vitamin C (IC_{50} = 3.94 ± 0.01 μg/mL) and catechin (IC_{50} = 3.55 ± 0.01 μg/mL) were similar, and both are significantly higher ($P < 0.001$) than Trolox (IC_{50} = 5.90 ± 0.27 μg/mL).

3.5. Effect of EEP and WEP on RAW264.7 Cell Viability. The cell viability of RAW264.7 cells exposed to EEP or WEP was determined by MTT assay. The cells were incubated for 24 h with various concentrations of EEP (0.05, 0.25, 0.5, 1.0, or 1.50 mg/mL) or WEP (0.10, 0.50, 1.50, or 4.50 mg/mL). As shown in Figure 2, both EEP and WEP displayed low toxicity towards RAW264.7 cells as evidenced by an apparent lack of effect on cell viability until the concentration of each extract reached 1.5 mg/mL. At 1.5 mg/mL, EEP and WEP decreased the viability of RAW264.7 cells by 34.14 ± 9.69% and 21.58 ± 1.66% ($P < 0.05$), respectively. However, the cytotoxic effect is more pronounced at higher concentrations. WEP at 4.5 mg/mL decreased the cell viability by as much as 54.21 ± 1.74% ($P < 0.05$). The effect of EEP and WEP on RAW264.7 cell viability was also confirmed by trypan blue exclusion and propidium iodide staining methods, which exhibited similar results (data not shown). Therefore, a nontoxic concentration range of 0–0.25 mg/mL of both EEP and WEP was selected for RAW264.7 cell treatment in the subsequent studies.

3.6. EEP and WEP as Intracellular ROS Scavengers. The direct scavenging effect of EEP and WEP on intracellular free radical stress was investigated in RAW264.7 cells using the DCFH-DA assay. The increment of DCF fluorescence emission following ROS-mediated oxidation of DCFH was followed for 240 min. As shown in Figure 3(a), standard antioxidant positive controls, catechin (250 μM), resveratrol (20 μM), and quercetin (10 μM), could scavenge ROS significantly ($P < 0.05$) throughout the incubation time when compared to the vehicle control (VH). With as little as 30 min of incubation, catechin, resveratrol, and quercetin showed considerable radical scavenging activity. EEP (Figure 3(b)) and WEP (Figure 3(c)) decreased the DCF fluorescent emission in a dose- and time-dependent manner. Again, with as little as 30 min of incubation, both EEP and WEP at low concentration (50 μg/mL) showed similar radical scavenging activity as the antioxidant controls. Various concentrations of EEP significantly decreased ($P < 0.05$) the DCF fluorescent emission throughout the incubation time when compared to the VH control. At high concentration (150 μg/mL), EEP exhibited a strong scavenging activity as suggested by the capability to lower fluorescent intensity to below basal level of the unstimulated DCFH-DA control at 180–240 min. In addition, the highest concentration of EEP (250 μg/mL) significantly lowered ($P < 0.05$) DCF fluorescent intensity to below the basal level at all time points. Similarly, 150 and 250 μg/mL of WEP also significantly decreased ($P < 0.05$) the DCF fluorescent emission throughout the incubation time compared to the tBuOOH control. However, the lowest concentration of WEP (50 μg/mL) significantly reduced ($P < 0.05$) the DCF fluorescent emission until 210 min only.

3.7. NO Suppression by EEP and WEP in LPS Plus IFN-γ-Activated RAW264.7 Cells. RAW264.7 cells were pretreated with antioxidants, vitamin C, EEP, or WEP for 1 h, then stimulated with LPS plus IFN-γ, and measured for NO production using the Griess assay. As shown in Figure 4, unstimulated RAW264.7 cells (NA) secreted basal levels of NO, while the production of NO was increased to about 43 μM in LPS plus IFN-γ-activated RAW264.7 cells. The antioxidant control, 500 μM vitamin C, decreased the NO production by almost 35%. Pretreatment of RAW264.7 cells with EEP or WEP significantly suppressed ($P < 0.05$) the induction of NO in a dose-related manner (Figures 4(a) and 4(b)), and the suppression was observed in all EEP- and WEP-treated groups. These results also clearly indicate that

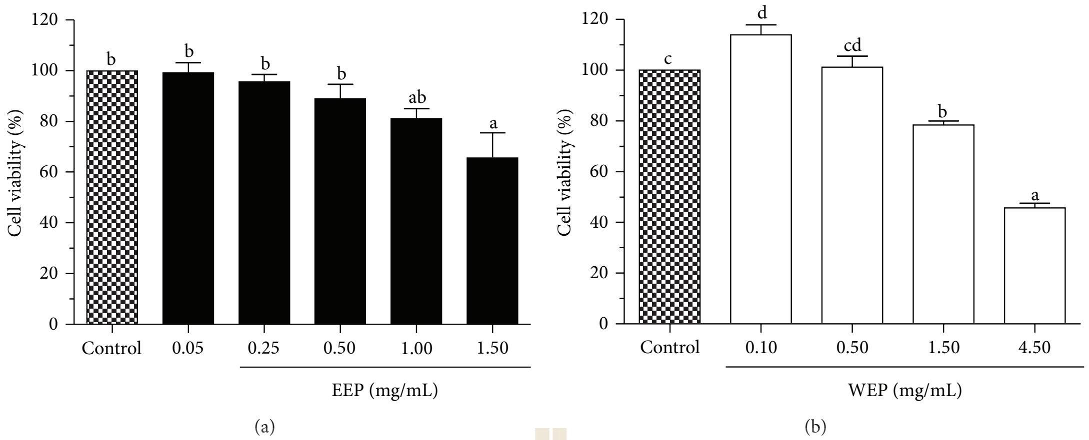


FIGURE 2: Effect of EEP and WEP on cell viability of RAW264.7 cells. The effect of EEP (a) and WEP (b) on cell viability was assessed by MTT. Values are expressed as means ± SEM ($n = 3$) and are representative of three independent experiments with similar results. Bars marked with different letters are significantly different at $P < 0.05$ as determined by one-way ANOVA.

EEP is a stronger suppressant of NO induction than WEP. Concentrations of 50 μg/mL of EEP and 150 and 200 μg/mL of WEP were required to exhibit the NO suppression with the same efficiency as 500 μM (88.06 μg/mL) vitamin C.

3.8. Suppression of iNOS and COX-2 Protein Expression by EEP and WEP in LPS Plus IFN-γ-Activated RAW264.7 Cells. To determine if suppression of NO production by EEP or WEP was related to changes in iNOS as well as COX-2 protein levels, Western blotting analysis was performed. RAW264.7 cells were pretreated with antioxidants, Trolox (50 μg/mL), vitamin C (500 μM), or PP extracts (EEP or WEP) at 50–250 μg/mL for 1 h prior activation with LPS (1 μg/mL) plus IFN-γ (25 U/mL) for 18 h. Total proteins were extracted and analyzed for the expression of iNOS and COX-2 by Western blotting. LPS plus IFN-γ induced increases in iNOS (Figures 5(a) and 5(b)) and COX-2 (Figures 5(c) and 5(d)) expression compared to the unstimulated cultures. Antioxidant controls (Trolox and vitamin C) decreased LPS plus IFN-γ-induced iNOS and COX-2 protein levels. The data also suggested that the suppression by 500 μM (88.06 μg/mL) vitamin C is more pronounced than 50 μg/mL Trolox. Compared to the corresponding controls, both EEP and WEP produced a dose-dependent suppression of iNOS level in LPS plus IFN-γ-activated RAW264.7 cells (Figures 5(a) and 5(b)), suggesting that the suppression of NO production by EEP and WEP is mediated by decreasing the expression of iNOS. In agreement with the result of NO suppression, 50–200 μg/mL EEP was probably more efficient than WEP in iNOS suppression. The iNOS expression was almost completely eliminated at 200 μg/mL EEP and was barely observed at 250 μg/mL WEP. The inflammatory modulation of EEP and WEP was also further supported by the dose-dependent suppression of the COX-2 level by both EEP and WEP (Figures 5(c) and 5(d)) in the activated RAW264.7 cells. Notably, EEP and WEP exhibited higher suppression of iNOS than COX-2.

4. Discussion

It is well known that major phytochemicals of plant leaf extracts possessing antioxidant activity are flavonoids and other phenolic compounds. Researchers have found that flavonoids from PP leaves display antioxidant activity and all ethyl acetate, chloroform, and *n*-butanol-soluble fractions of PP contain flavonoids [11, 15]. In addition, Nguyen and Eun [14] found phenolics and flavonoids in extracts of PP leaves when assessed with Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride. PP leaf extracts also have antioxidant activities when evaluated with DPPH and FRAP assays. Similarly, the present study also showed that both EEP and WEP contain high levels of flavonoids and phenolics and exhibit antioxidant activity. The most frequently used antioxidant standards for food samples (vitamin C, Trolox, catechin, resveratrol, and quercetin) were used as positive antioxidant controls in the present study.

This study revealed that DPPH radical scavenging capacity of WEP is greater than that of EEP (Figure 1). In contrast, EEP has higher ferric reducing power than WEP (Table 2). Such contradictory results between DPPH and FRAP assays are not unusual. Though both assays are based on a single electron transfer reaction [27], their characteristics, sensitivities, mechanisms of the reaction, and endpoints are totally different. For instance, the DPPH method is based on the free radical scavenging activity, while FRAP measures the capability of reducing Fe^{3+} to Fe^{2+}. Depending on what specific phytochemical constituents present in the extract are providing the antioxidant activity, their discrete chemical structures, positions, numbers, and types of substitutions can influence their redox properties and hence their antioxidant potentials [28].

Though both DPPH and FRAP assays are frequently used for assessing antioxidant capacity, they have some drawbacks. In the DPPH assay, interfering compounds may have significant absorption at the same measured wavelength. In

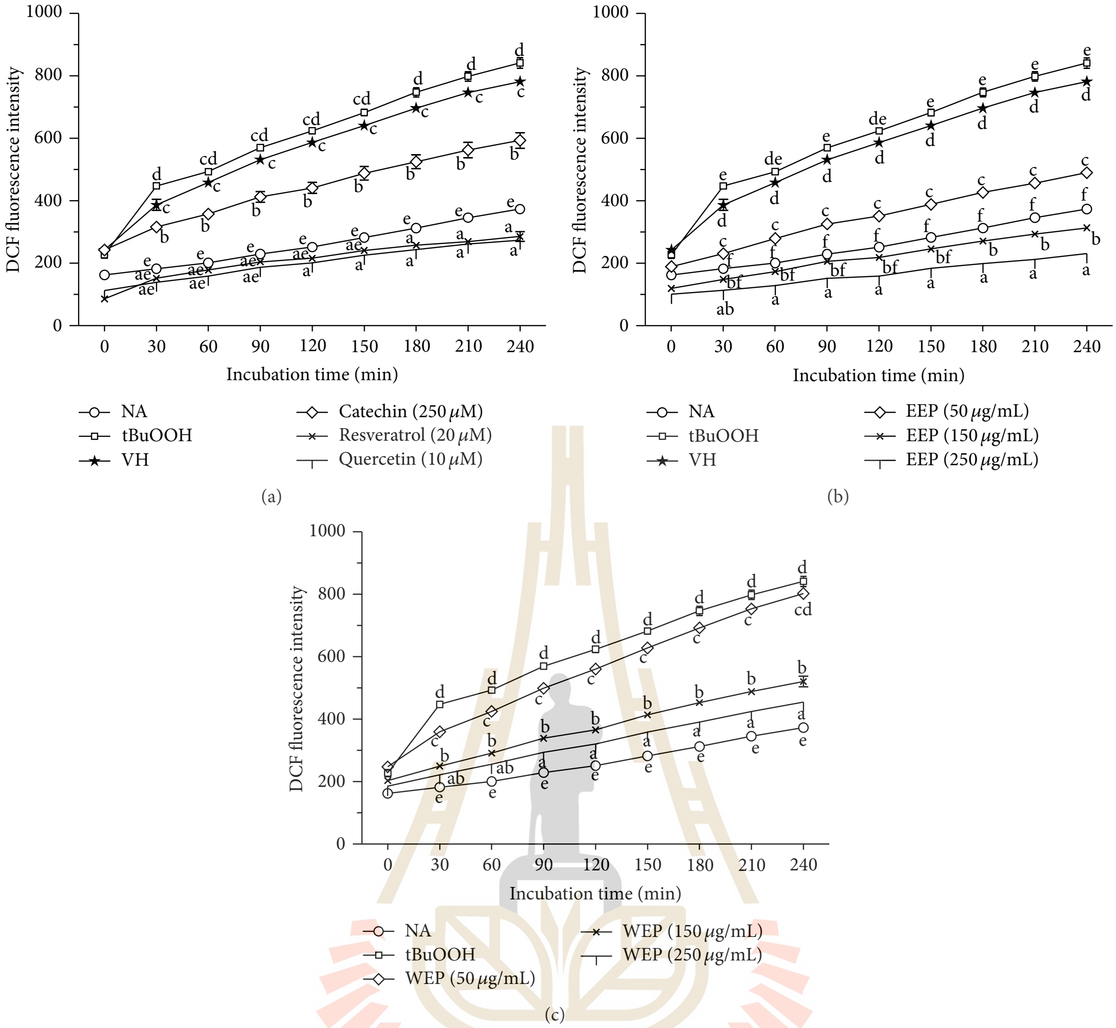


FIGURE 3: Cellular radical scavenging activity in tBuOOH-activated RAW264.7 cells. Intracellular ROS level generated in cells was measured by the DCFH-DA. RAW264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of antioxidants (a), EEP (b) or WEP (c), for 24 h prior to take-up of 20 μM DCFH-DA for 30 min. Results are mean ± SEM ($n = 4$) and are representative of three independent experiments with similar results. Points marked with different letters are significantly different at $P < 0.05$ when compared at the same time point as determined by two-way ANOVA.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

addition, the DPPH radical is not present in living organisms. For the FRAP method, compounds with low redox potential, which probably do not serve as antioxidants *in vivo*, still can reduce the Fe^{3+}. Interfering compounds may also absorb at the same wavelength, and the assay is also performed at a nonphysiological pH [29]. Therefore, antioxidant activities of EEP and WEP were also evaluated by the cell-based assay using an intracellular fluorescent probe, DCFH-DA. When the nonfluorescent DCFH-DA is taken up into cells, its diacetate moiety will be hydrolyzed by cellular esterases to generate the more polar DCFH which is trapped inside the cells. In the presence of ROS, intracellular DCFH is further oxidized to form the fluorescent DCF product [30]. The macrophage cell line RAW264.7 is usually the cell of choice in studying ROS-mediated cellular events since it can generate high amounts of ROS following an oxidant challenge. Catechin, resveratrol, and quercetin, at the level of concentration used in this study, have been shown and optimized to exhibit a strong suppression of intracellular ROS generation [22, 31, 32]. Therefore, the present study selected these compounds as antioxidant positive controls for the DCFH-DA assay. The present study demonstrated that all antioxidant standards, 250 μM catechin, 20 μM resveratrol, and 10 μM quercetin, exerted a strong inhibition of ROS generation induced by tBuOOH over a period of 30 to 240 min. In addition to extracellular antioxidant capacity,

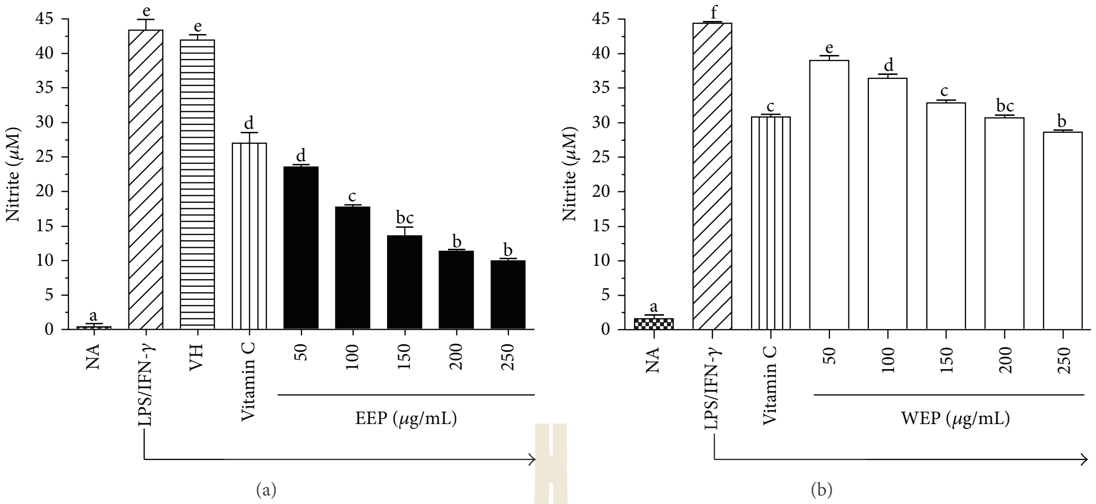


Figure 4: EEP (a) and WEP (b) suppressed LPS plus IFN-γ-induced nitrite production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated for 24 h with LPS (1 μg/mL) plus IFN-γ (25 U/mL) in the presence or absence of indicated concentrations of vitamin C (500 μM), EEP, or WEP. Accumulated nitrite in the culture medium was determined by the Griess reaction. The values are means ± SEM ($n = 3$) and are representative of three independent experiments with similar results. Bars marked with different letters are significantly different at $P < 0.05$ as determined by one-way ANOVA.

EEP and WEP also served as intracellular ROS scavengers and subsequently decreased the oxidation of DCFH (Figures 3(b) and 3(c)). Both EEP and WEP were as efficient as the antioxidant standards in scavenging ROS. Notably, EEP was a better reducer of DCF fluorescence than WEP. The reduction of DCF fluorescence by EEP and WEP is not due to direct cytotoxicity as the range of concentration used in the studies had no effect on RAW264.7 cell viability (Figure 2).

Although the current study shows that an ethanol extract from PP leaves has *in vivo* anti-inflammatory activities [13], its mechanism of anti-inflammation is still unrevealed. Inflammatory disorders are characterized, among other events, by the production of significant amounts of free radicals, nitrogen reactive species, and pro-inflammatory cytokines [10]. High NO concentration combines with superoxides to form peroxynitrite ions ($OONO^-$) which are responsible for cell and tissue damage from inflammation [33]. Therefore, we investigated inflammatory effects of EEP and WEP on the suppression of NO production in LPS plus IFN-γ-activated RAW264.7 cells. At the concentration range of 50–250 μg/mL, both EEP and WEP dose-dependently suppressed NO production, and the suppression was more pronounced in EEP than WEP (Figure 4). These results agreed with the observation that EEP was also a better scavenger of intracellular ROS than WEP (Figures 3(b) and 3(c)).

As enhanced NO production by LPS and IFN-γ-stimulated RAW264.7 cells mainly occurs via increased intracellular content of iNOS [3, 4], the effect of EEP and WEP on iNOS expression was investigated. The present study clearly indicates that the suppressive effect of EEP and WEP on NO production was mediated through the inhibition of iNOS expression (Figures 5(a) and 5(b)). In agreement with the study of NO suppression, the suppressive effect of EEP (50–200 μg/mL) on iNOS was more remarkable than that of WEP.

In addition to iNOS induction, LPS and IFN-γ also efficiently enhance COX-2 expression in RAW264.7 cells [3, 5]. An increased level of COX-2 expression is also known to account for the excessive production of PGE_2 in most, if not all, inflammatory cells and tissues [34]. This study shows that both EEP and WEP can exhibit anti-inflammatory activity by reducing high COX-2 protein levels in a dose-related manner (Figures 5(c) and 5(d)). Thus EEP and WEP might play important roles in attenuating inflammation and cellular damage through their extra- and intracellular ROS scavenging activity and downregulation of NO, iNOS, and COX-2. Concordantly, Khumpook et al. [13] recently reported the *in vivo* anti-inflammatory activity of PP leaves as evidenced by decreased lipid peroxidation and NO level in concomitance with increased superoxide dismutase in the cotton-induced chronic inflammation in Albino rats, upon exposure to an ethanol extract of PP leaves for 17 days.

In fact, several medicinal plant extracts with natural antioxidant properties together with suppressive effects on NO, iNOS, and/or COX-2 expression in RAW264.7 have been reported to display a wide spectrum of bioactivities. These activities include anti-inflammation, such as curcumin from *Curcuma longa*, resveratrol from grape skins, red wines, and other plants, and a mixture of β-sitosterol and stigmasterol from *Andrographis paniculata* [8, 35, 36]. Previous investigators demonstrated that pretreatment of RAW264.7 with flavonoids such as apigenin, genistein, and kaempferol suppressed LPS-stimulated expression of NO, iNOS, and COX-2

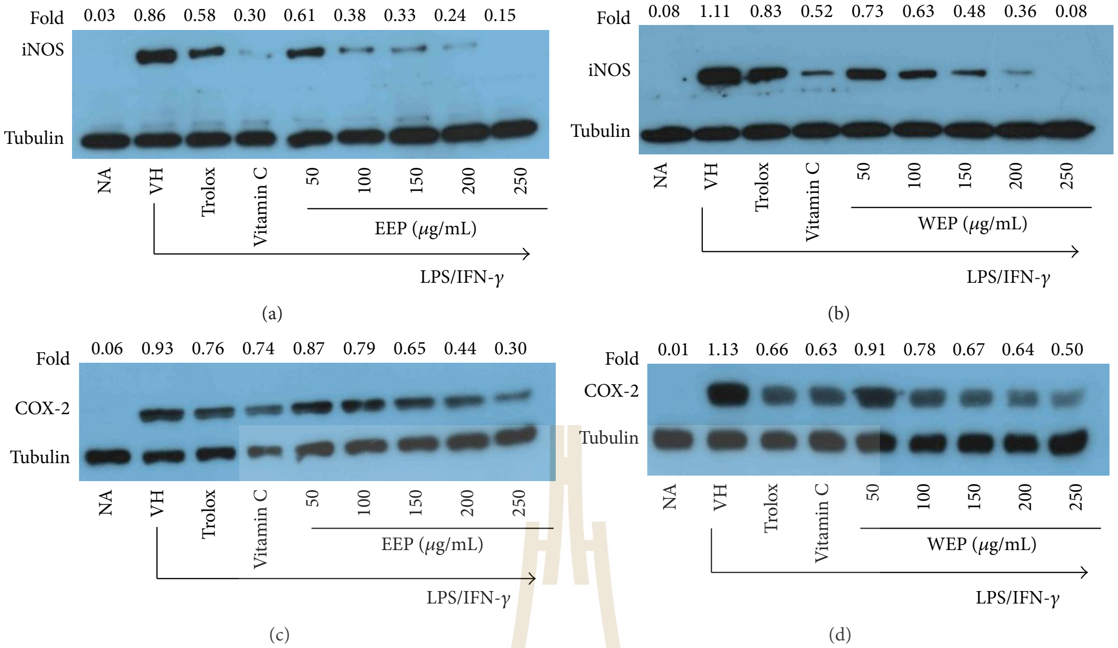


Figure 5: Effect of EEP on LPS plus IFN-γ-induced iNOS (a) and COX-2 (c) and WEP on LPS plus IFN-γ-induced iNOS (b) and COX-2 (d) protein levels in RAW264.7 cells. The relative expression of proteins was quantified densitometrically using ImageJ software and normalized to tubulin reference bands. Data are representative of at least two independent experiments.

protein production [37]. Major chemical constituents of PP leaves consist of β-sitosterol, stigmasterol, kaempferol 3-methyl ether 7-O-β-glucoside, and apigenin 7-O-β-glucoside [11]. All aforementioned compounds have been shown to possess anti-inflammatory properties. Both kaempferol 3-methyl ether 7-O-β-glucoside and apigenin 7-O-β-glucoside may be metabolized into kaempferol and apigenin which also have antioxidant and anti-inflammatory activities. Thus, it is possible that phenolic and flavonoid compounds in both EEP and WEP provide substantial antioxidant and anti-inflammatory activities.

In summary, the cytoprotective effects of EEP and WEP is due to their abilities to decrease ROS generation and NO radical production in cells. In addition, both EEP and WEP exert anti-inflammatory effects through the suppression of NO release and decrease the protein expression of iNOS and COX-2. Thus, PP leaves possess high potential for further exploration in the research development of anti-inflammatory medicine.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study was financially supported by a Royal Golden Jubilee Scholarship Grant (PhD/0208/2548) and by the National Research Council of Thailand (NRCT) through Suranaree University of Technology (SUT-104-53-36-09).

References

[1] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 1999.

[2] N. Fujiwara and K. Kobayashi, "Macrophages in inflammation," *Current Drug Targets—Inflammation and Allergy*, vol. 4, no. 3, pp. 281–286, 2005.

[3] S. I. Jang, Y.-J. Kim, W.-Y. Lee et al., "Scoparone from *Artemisia capillaris* inhibits the release of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon-γ plus LPS," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 28, no. 2, pp. 203–208, 2005.

[4] R. Korhonen, A. Lahti, H. Kankaanranta, and E. Moilanen, "Nitric oxide production and signaling in inflammation," *Current Drug Targets—Inflammation and Allergy*, vol. 4, no. 4, pp. 471–479, 2005.

[5] E. Karpuzoglu and S. A. Ahmed, "Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis," *Nitric Oxide*, vol. 15, no. 3, pp. 177–186, 2006.

[6] S. G. Harris, J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps, "Prostaglandins as modulators of immunity," *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 3, pp. 144–150, 2002.

[7] I.-N. Hsieh, A. S.-Y. Chang, C.-M. Teng, C.-C. Chen, and C.-R. Yang, "Aciculatin inhibits lipopolysaccharide-mediated

inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression via suppressing NF-κB and JNK/p38 MAPK activation pathways," *Journal of Biomedical Science*, vol. 18, no. 1, article 28, 2011.

[8] J. B. Calixto, M. F. Otuki, and A. R. S. Santos, "Anti-inflammatory compounds of plant origin—part I: action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF-κB)," *Planta Medica*, vol. 69, no. 11, pp. 973–983, 2003.

[9] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Current understanding of dietary polyphenols and their role in health and disease," *Current Nutrition and Food Science*, vol. 5, no. 4, pp. 249–263, 2009.

[10] S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, and B. B. Aggarwal, "Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?" *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 49, no. 11, pp. 1603–1616, 2010.

[11] P. M. Giang, H. V. Bao, and P. T. Son, "Phytochemical study on *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk, Acanthaceae," *Journal of Chemistry*, vol. 41, no. 2, pp. 115–118, 2003.

[12] H. K. Dieu, C. B. Loc, S. Yamasaki, and Y. Hirata, "The ethnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam," *Japan Agricultural Research Quarterly*, vol. 39, no. 3, pp. 191–196, 2005.

[13] T. Khumpook, S. Chomdej, S. Saenphet, D. Amornlerdpison, and K. Saenphet, "Anti-inflammatory activity of ethanol extract from the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.," *Chiang Mai Journal of Science*, vol. 40, no. 3, pp. 321–331, 2013.

[14] Q.-V. Nguyen and J.-B. Eun, "Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants," *Journal of Medicinal Plant Research*, vol. 5, no. 13, pp. 2798–2811, 2011.

[15] P. M. Giang, H. V. Bao, and P. T. Son, "Study on anti-oxidative activities and preliminary investigation on antibacterial, antifungal of extracted fraction rich in flavonoids from leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.," *TC Duoc Hoc*, vol. 9, no. 9, pp. 9–12, 2005, (In Vietnamese with English summary).

[16] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," *Methods in Enzymology*, vol. 299, pp. 152–178, 1998.

[17] M. Liu, X. Q. Li, C. Weber, C. Y. Lee, J. Brown, and R. H. Liu, "Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 10, pp. 2926–2930, 2002.

[18] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay," *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, 1996.

[19] C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, "Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents," *Food Research International*, vol. 32, no. 6, pp. 407–412, 1999.

[20] M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200, 1958.

[21] S.-C. Chun, S. Y. Jee, S. G. Lee, S. J. Park, J. R. Lee, and S. C. Kim, "Anti-inflammatory activity of the methanol extract of Moutan Cortex in LPS-activated Raw264.7 cells," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 327–333, 2007.

[22] G.-N. Kim, Y.-I. Kwon, and H.-D. Jang, "Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride or Cu^{2+}-induced oxidative stress in HepG2 cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 1, pp. 138–144, 2011.

[23] M. G. B. de Oliveira, R. B. Marques, M. F. de Santana et al., "α-Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response," *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 111, no. 2, pp. 120–125, 2012.

[24] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.

[25] A. K. L. Nascimento, R. F. Melo-Silveira, N. Dantas-Santos et al., "Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 950272, 10 pages, 2013.

[26] A. Muthuraman, N. Singh, and A. S. Jaggi, "Protective effect of *Acorus calamus* L. in rat model of vincristine induced painful neuropathy: an evidence of anti-inflammatory and anti-oxidative activity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 10, pp. 2557–2563, 2011.

[27] A. Bunea, D. O. Rugină, A. M. Pintea, Z. Sconţa, C. I. Bunea, and C. Socaciu, "Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania," *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, vol. 39, no. 2, pp. 70–76, 2011.

[28] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584, 2002.

[29] J. Pérez-Jiménez, S. Arranz, M. Tabernero et al., "Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results," *Food Research International*, vol. 41, no. 3, pp. 274–285, 2008.

[30] K. L. Wolfe and R. H. Lui, "Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 22, pp. 8896–8907, 2007.

[31] M. Okawara, H. Katsuki, E. Kurimoto, H. Shibata, T. Kume, and A. Akaike, "Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults," *Biochemical Pharmacology*, vol. 73, no. 4, pp. 550–560, 2007.

[32] H. Nishikawa, K. Wakano, and S. Kitani, "Inhibition of NADPH oxidase subunits translocation by tea catechin EGCG in mast cell," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 362, no. 2, pp. 504–509, 2007.

[33] J. Fang, T. Seki, and H. Maeda, "Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 4, pp. 290–302, 2009.

[34] K. Subbaramaiah and A. J. Dannenberg, "Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 24, no. 2, pp. 96–102, 2003.

[35] Y.-J. Surh, K.-S. Chun, H.-H. Cha et al., "Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation," *Mutation Research*, vol. 480-481, pp. 243–268, 2001.

[36] W.-W. Chao, Y.-H. Kuo, and B.-F. Lin, "Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-κB transactivation inhibition," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 4, pp. 2505–2512, 2010.

[37] Y.-C. Liang, Y.-T. Huang, S.-H. Tsai, S.-Y. Lin-Shiau, C.-F. Chen, and J.-K. Lin, "Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages," *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 10, pp. 1945–1952, 1999.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ผศ.ดร.เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์ เกิดวันที่ 25 พฤษภาคม จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2516-2520) ได้รับทุนการศึกษารัฐบาลไทย (กรรมการข้าราชการพลเรือน) ไปศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชา Environmental Health (Toxicology) ที่ University of Michigan ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2521-2523) และทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชา Toxicology ของมหาวิทยาลัย Utah State University ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2525-2629) ก่อนปฏิบัติงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เคยเป็นผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล (พ.ศ. 2525-2529) นักวิจัยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2523-2525) postdoctoral fellow ที่ Medical College of Virginia (พ.ศ. 2529-2532) special fellow ที่ Cleveland Clinic Foundation (พ.ศ. 2529-2532) และ research associate ที่ Case Western Reserve University (พ.ศ. 2533-2537) ประเทศสหรัฐอเมริกา มีความชำนาญพิเศษทางด้าน Immunology และ immunotoxicology

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี