ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรางจืดและลูกใต้ใบในการลดการหลั่ง IL-1β จากเซลล์ LPS-Activated THP-1 Macrophages เพาะเลี้ยง

Thunbergia laurifolia and Phyllanthus amarus Schum & Thonn. Extract decrease interleukin-1β levels secretion in LPS-Activated THP-1 Macrophages

อติตยา โรจนสโรช[1]*, พรพรรณ โพธิ์ไกร[2], ชญาภา พรหมเดชวัฒนา[3] และ ปิยะ วงศ์ญาณิน[4]*

[1,2,3,4] *สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา*

**Corresponding author: atitroce@gmail.com*

Atittaya Rocejanasaroj[1]*, Phornpun Phokrai[2], Chayapha Promdetvattana[3] and Piya Wongyanin[4]*

[1,2,3,4] *Department in Medical Technology Faculty of Science and Technology Bansomdejchaopraya Rajabhat University*

**Corresponding author: atitroce@gmail.com*

บทคัดย่อ

การอักเสบเป็นการตอบสนองขั้นพื้นฐานของร่างกายเพื่อป้องกันสิ่งที่อาจเป็นอันตราย หากเกิดขึ้นอย่างไม่เหมาะสมหรือควบคุมไม่ได้ ย่อมก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ และนำไปสู่พยาธิสภาพการเกิดโรคเสื่อมต่างๆ ยาต้านอักเสบที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันได้แก่ยาในกลุ่ม Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ซึ่งมีผลข้างเคียงมากโดยเฉพาะต่อระบบทางเดินอาหารและระบบหัวใจหลอดเลือด ทำให้มีการพัฒนาและค้นคว้าหาสารต้านอักเสบจากธรรมชาติเพื่อมาใช้ทดแทน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดรางจืดและลูกใต้ใบที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์ macrophage like-THP-1 ในการหลั่งไซโตไคน์ IL-1β โดยจะทำการเปรียบเทียบปริมาณ IL-1β ที่หลั่งจากเซลล์เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 200-800 µg/ml สารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 200-800 µg/ml สารต้านอักเสบอ้างอิง 2 ชนิดได้แก่ Epigallocatechin gallate (EGCG) (50 nM) และ IL-10 (10 ng/ml) ในสภาวะทดสอบร่วมกับสารก่ออักเสบ LPS (1,000 ng/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่า เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะหลั่ง IL-1β เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.000) จากนั้นเมื่อทำการทดสอบร่วมระหว่าง LPS กับสารสกัดสมุนไพรพบว่าสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 400-800 µg/ml และสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 200-800 µg/ml สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1β ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.000) โดยการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดเป็นไปในลักษณะ dose-dependent manner อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ EGCG (50 nM) และ IL-10 (10 ng/ml) ซึ่งเป็นสารต้านอักเสบอ้างอิงไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1β จาก THP-1 ที่กระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 1,000 ng/ml

Received: 3 October 2019
Revised: 6 December 2019
Accepted: 22 December 2019
Online publication date: 7 January 2020

ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบมีสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบที่อาจนำไปพัฒนาไปเป็นยาต้านการอักเสบชนิดใหม่จากธรรมชาติได้ในอนาคต

คำสำคัญ : รางจืด, ลูกใต้ใบ, อินเตอร์ลิวคิน 1-บี, แมคโครเฟจ, การอักเสบเรื้อรัง

Abstract

Inflammation is the complex immune response evoked by infections or tissue injury. When inappropriate or uncontrollable inflammation occurs, it acts as a strong disease-promoting factor in a number of pathological degenerative disorders. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been currently used to treat inflammatory based disorders but may cause complications and undesired adverse effects mainly on gastrointestinal system and cardiovascular system. As the result, increasing studies focusing on plant-derived natural products and their derivatives, many new plant-derived extracts and active compounds have been identified to exhibit anti-inflammatory effects. The aim of this study was to examine the effect of *Thunbergia laurifolia* extracts (TLE) and *Phyllanthus amarus* extracts (PAE) on pro-inflammatory cytokine IL-1β secretion in human macrophage-like THP-1 cells. Cells were treated with TLE 200-800 µg/ml, PAE 200-800 µg/ml, 2 well known anti-inflammatory agents : Epigallocatechin gallate (EGCG) (50 nM) and IL-10 (10 ng/ml) with LPS (1,000 ng/ml) used as inflammatory mediator for 24 hrs. Exposure cells with 1,000 ng/ml LPS was significantly induced IL-1β secretion (p=0.000). Co-treatment LPS with herbal extracts revealed that TLE 400-800 µg/ml and PAE 200-800 µg/ml significantly reduced IL-1β secretion in LPS-treated cells (p=0.000) in dose dependent fashion. However, we didn't find significant inhibitory effect of EGCG (50 nM) and IL-10 (10 ng/ml) on LPS induced IL-1β secretion. As such, TLE and PAE could be the potential therapeutic natural products for the treatment of inflammasome-dependent diseases and may serve as lead herb for the development of new anti-inflammatory drugs.

Keywords: *Thunbergia laurifolia*, *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn., Interleukin-1β, Macrophage, Chronic inflammation

บทนำ

ภาวการณ์อักเสบเป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายตอบสนองเพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมที่อาจก่อโทษให้หมดไปจากร่างกาย การอักเสบที่ดีจึงควรเป็นการตอบสนองที่สามารถตอบโต้แบบเฉียบพลันเพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นให้หมดไปจากร่างกายอย่างรวดเร็ว เมื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งหมดแล้ว ขบวนการอักเสบจะถูกยับยั้งมิให้ดำเนินต่อ เพื่อที่ร่างกายจะได้เริ่มต้นขบวนการซ่อมแซมเซลล์และเนื้อเยื่อที่เสียหายให้กลับคืนสภาพสมดุลดังเดิม อย่างไรก็ตาม หากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถขจัดสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดกระตุ้นขบวนการอักเสบให้ดำเนินต่อไปเรื่อยๆ เป็นระยะเวลานาน เรียกว่า ภาวะอักเสบแบบเรื้อรัง เมื่อถูก

กระตุ้นให้ทำงานตลอดเวลา เซลล์ที่ร่วมปฏิกิริยาการอักเสบ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เนื้อเยื่อ จะมีพฤติกรรมการทำงานที่เปลี่ยนไป อาทิเช่น มีการหลั่งไซโตไคน์และอนุมูลอิสระในปริมาณมากขึ้นจนก่อความเสียหายแก่เซลล์ เนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียงเสื่อมสภาพ ไม่สามารถเริ่มขบวนการซ่อมแซมอย่างควรจะเป็นได้ การศึกษาหลายฉบับพบว่า ความผิดปกติและโรคเสื่อมของระบบต่างๆ อาทิเช่น neurodegenerative diseases (Amor S and et al., 2010) metabolic syndrome (Monteiro R and et al., 2010) และการแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง (Multhoff G and et al., 2012) มีการอักเสบเรื้อรังเป็นกลไกพยาธิสภาพต้นกำเนิด นอกจากนี้ การอักเสบเรื้อรังยังเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สามารถเร่งขบวนการดำเนินของโรคเหล่านี้ให้มีความรุนแรงขึ้น (Willerson James T and et al., 2004)

ในขบวนการอักเสบเรื้อรังนั้น แมโครเฟจเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญ เนื่องจากทำหน้าที่ในการหลั่งไซโตไคน์ เช่น interleukin (IL)-1β, IL-6 และ TNF-α รวมถึง prostaglandins (PGs) เพื่อส่งสัญญาณควบคุมการอักเสบและส่งเสริมให้เกิดภาวะสมดุลของเนื้อเยื่อ ในบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบแบบเรื้อรังนั้นพบว่ามีแมโครเฟจจำนวนมากกว่าการอักเสบแบบทั่วไป แมโครเฟจเหล่านี้ส่วนหนึ่งจะถูกกระตุ้นจนมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปเรียกว่า granulomas มีพฤติกรรมการหลั่งสารก่ออักเสบที่แตกต่างจากแมคโครเฟจปกติทั้งชนิดของสารก่ออักเสบ ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาในการหลั่ง จึงสามารถกระตุ้นขบวนการอักเสบปริมาณน้อย ๆ และขับเคลื่อนให้การอักเสบมีการดำเนินไปเป็นระยะเวลานานเรียกว่า meta-inflammation ซึ่งมีรายงานการศึกษาที่ชี้ว่า ความผิดปกติในการทำงานของเซลล์หรือเนื้อเยื่อนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณแมคโครเฟจที่อยู่บริเวณอักเสบ (Wang B and et al., 2015 and Moore Kathryn J and et al., 2011) ความสัมพันธ์ดังกล่าวยังได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาฤทธิ์ของยา metformin ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติปรับการแสดงออกของแมคโครเฟจ ส่งผลลดระดับการอักเสบแบบเรื้อรังและสามารถลดความเสี่ยงในการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงหัวใจแข็งในผู้ป่วยได้ (Goldberg Ronald B. and et al., 2017)

แม้ยังไม่มีการศึกษากลไกหรือความเชื่อมโยงระหว่าง IL-1β กับพยาธิสภาพกำเนิดของการอักเสบเรื้อรังในมนุษย์ที่แน่ชัด แต่มีการศึกษาที่ชี้ว่า ในบริเวณที่มีการอักเสบแบบเรื้อรังนั้น เช่น โรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรัง (COPD) หรือภาวะต่อมลูกหมากอักเสบเรื้อรัง แมคโครเฟจในบริเวณอักเสบนี้จะหลั่ง IL-1β ออกมาในปริมาณมากผิดปกติ (Hammad DR and et al., 2015 and Ashok A and et al., 2019) IL-1β เป็นไซโตไคน์ที่ออกฤทธิ์ก่ออักเสบ (pro-inflammatory cytokine) ชนิดหนึ่งที่แมคโครเฟจและเซลล์ในร่างกายหลายชนิดสามารถสังเคราะห์และหลั่งออกมาได้ โดยในภาวะปกติ IL-1β จะกระตุ้นการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและส่งเสริมการแทรกผ่านของเซลล์เม็ดเลือดขาว อาทิเช่น T cells และ inflammatory leukocytes จากกระแสเลือดเข้าสู่ชั้นหนังแท้ (dermis) เพื่อตอบสนองต่อภาวการณ์เปลี่ยนแปลงต่าง ๆ มีการศึกษาที่ชี้ว่าการหลั่ง IL-1β ของเซลล์ในภาวะปกติและภาวอักเสบเรื่อรังนั้นมีกลไกที่แตกต่างกัน (Lopez-Castejon G and et al., 2011) ดังนั้นการปรับพฤติกรรมการหลั่ง IL-1β ที่ผิดปกติของแมคโครเฟจ จึงน่าจะ เป็นแนวทางใหม่ในการรักษาโรคอันเกิดจากการอักเสบเรื้อรัง เพื่อทดแทนการรักษาในปัจจุบันที่มักใช้ยาในกลุ่ม NSAIDs ซึ่งออกฤทธิ์ไม่จำเพาะ ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงจากการใช้ยา และไม่ตรงกับลักษณะของการอักเสบที่เกิดขึ้น โดยการศึกษายากลุ่ม NSAIDs เช่นยา Piroxicam ในหนูทดลองชี้ว่ายาออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันเท่านั้น ไม่มีประโยชน์ในการักษาโรคการอักเสบเรื้อรัง (Sigurdardottir SL and et al., 2008)

พืชเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์หรือยาที่มีการค้นพบและนำมาปรุงใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการไม่พึงประสงค์มาแต่อดีต สมุนไพร 2 ชนิดที่พบขึ้นมากในประเทศไทยคือ *Thunbergia laurifolia* และ *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. หรือรู้จักกันในชื่อสามัญคือ รางจืด และลูกใต้ใบ เป็นสมุนไพร

ไทยที่มีการนำส่วนประกอบมาใช้ในการรักษาตามวิถีแพทย์แผนไทยมานาน โดยตำรายาไทยได้บรรยายสรรพคุณไว้ว่า ใบรางจืดมีฤทธิ์ในการล้างพิษ สามารถแก้อาการเมา สรรพคุณทางการแพทย์ของรางจืดที่ได้รับการศึกษาแล้ว อาทิเช่น คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการทำงานของระบบขจัดสารพิษออกจากร่างกาย (Rocejanasaroj A and et al., 2014) สารสกัดรางจืดยังสามารถช่วยบรรเทาอาการอักเสบที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อ *Opisthorchis viverrini* ในสัตว์ทดลองได้ (Wonkchalee O and et al., 2012) สำหรับต้นลูกใต้ใบนั้นมีสรรพคุณในการลดไข้ ขับปัสสาวะ รักษาเบาหวาน สรรพคุณทางการแพทย์ของลูกใต้ใบที่ได้รับการศึกษาแล้ว อาทิเช่น ฤทธิ์ป้องกันตับสัตว์ทดลองจากพิษ ethanol (Pramyothin P and et al., 2007) และ aflatoxin B_1 (Naaz F and et al., 2007) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาคุณสมบัติและกลไกในการต้านการอักเสบแบบเรื้อรังของสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้ ดังนั้นในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบและทดสอบติดตามการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการหลั่งไซโตไคน์ IL-1β ของแมคโครเฟจเมื่อได้รับสารก่อการอักเสบร่วมกับสารสกัดสมุนไพรเปรียบเทียบกับสารที่มีคุณสมบัติต้านอักเสบที่มีงานวิจัยรองรับแล้ว ซึ่งผลการวิจัยที่ได้นี้สามารถใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงถึงคุณสมบัติต้านการอักเสบในมนุษย์ เพื่อใช้ในการพัฒนายาต้านการอักเสบแบบเรื้อรังชนิดใหม่ต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

ตัวอย่างสมุนไพร รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) และ ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schum & Thonn.) เก็บจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง และส่งระบุลักษณะทางพฤกษ-อนุกรมวิธาน เพื่อจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงในงานวิจัย ณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลังการทำความสะอาดและตากตัวอย่างใบรางจืดและต้นลูกใต้ใบจนแห้งแล้ว จะบดตัวอย่างจนละเอียดและสกัดด้วย 80% ethanol ด้วยเทคนิค cold refluxing ที่อุณภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะทำการสกัดสารออกฤทธิ์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นรวบรวมสารสกัดทั้งหมดนำมากรองเพื่อขจัดสิ่งสกปรกออกก่อนด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเทคนิค rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 45 °C ความดัน 200 mbar (Heidolph Instrument, Germany) และทำเป็นผงด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ณ อุณหภูมิ -50 °C ความดัน 400 mbar ด้วยเครื่อง Lyophilizer (Thermo Electron Corparation, USA) ก่อนเก็บตัวอย่างผงตัวอย่างสมุนไพรเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไปที่ -80 °C

2. เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ promonocytic cell line สายพันธุ์ THP-1 (ATCC® TIB-202™, Rockville, MD, USA) ได้รับอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วาริน แสงกิติโกมล คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยง RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) ที่ผสม 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) และ 1% v/v penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, USA) ในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 °C มีความเข้มข้น CO_2 5% และความชื้นในการเพาะเลี้ยงระหว่าง 80-90%

3. การทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยงกับสารสกัดสมุนไพรและสารมาตรฐาน

การทดสอบจะทำกับเซลล์ THP-1 ในถาดเพาะเลี้ยงขนาด 96 และ 6 หลุมทดลอง โดยกำหนดให้มีความหนาแน่นเซลล์ 1 x 10^6 cells/mL จากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วย phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 100 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เปลี่ยนรูปร่างลักษณะเป็นเซลล์แมค

โครเฟจ และทำการทดสอบเซลล์กับสารสกัดรางจืด สารสกัดลูกใต้ใบ ช่วงความเข้มข้นสารสกัดระหว่าง 200-800 μg/ml ตามการศึกษาในเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยร่วมกับ lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* serotype 0111: B4) (Sigma-Aldrich, USA) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นอักเสบความเข้มข้น 1,000 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผลที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารต้านอักเสบอ้างอิง 2 ชนิดคือ EGCG ความเข้มข้น 50 nM และ IL10 ความเข้มข้น 10 ng/ml epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 50 nM และ IL-10 ความเข้มข้น 50 ng/ml (Sigma-Aldrich, USA) ซึ่งสารทั้งสองชนิดเป็นสารที่มีการศึกษาที่พบว่ามีคุณสมบัติต้านการอักเสบ ในการทดลองนี้ จะกำหนดให้กลุ่มเซลล์ที่ไม่รับสารใด ๆ เป็นกลุ่มเซลล์ควบคุมและกำหนดให้ละลายสารสกัดสมุนไพร LPS และ IL-10 ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์โดยตรง สำหรับ EGCG นั้นจะละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และกำหนดความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ไม่เกิน 0.1%

4. การตรวจวัดความเป็นพิษของสารทดสอบที่มีต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อเซลล์ THP-1 จะใช้เทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ในการทดสอบนี้ จะทำการทดลองเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยกำหนดให้มีจำนวนเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อ 1 หลุม มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 85% ปริมาตร 100 μl จากนั้นกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนเป็นแมคโครเฟจเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบเซลล์กับสารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้นต่างๆ (200, 400, 600, 800 μg/ml) ปริมาตร 100 μl เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 20 μl ลงในทุกหลุมการทดสอบ ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาผลึก formazan ที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทำการล้างเซลล์ด้วย PBS และปั่นตกตะกอนผลึกที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 200 μl เพื่อละลายผลึก formazan ดังกล่าว แล้ววัดการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finland) โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในหลุมทดลอง ผลการทดสอบจะแสดงในรูป relative cell viability หรือ % ของเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มทดสอบนั้นเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ

5. การตรวจวัดปริมาณ IL-1β ที่เซลล์หลั่งด้วยเทคนิค ELISA

การตรวจวัดผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อพฤติกรรมการหลั่ง IL-1β จากเซลล์ THP-1 จะใช้เทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยในการทดลองนี้ จะทำการทดลองเซลล์ THP-1 ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม โดยกำหนดให้มีจำนวนเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อ 1 หลุม มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 85% ปริมาตร 2.5 ml จากนั้นกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนเป็นแมคโครเฟจเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบเซลล์กับสารสกัดสมุนไพรและสารต้านอักเสบอ้างอิงปริมาตร 2.5 ml ในสภาวะที่มีและไม่มี LPS ความเข้มข้น 1,000 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกำหนดให้เซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบใด ๆ เป็นกลุ่มควบคุมเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ เมื่อครบเวลาที่กำหนด ปั่นตกตะกอนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 °C เพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ตายและขจัดเศษสารรบกวน ก่อนดูดเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนมาตรวจวัดระดับ IL-1β ด้วยชุดการทดสอบ IL-1β Quantikine® colorimetric sandwich ELISA kits (R&D systems, USA) ซึ่งขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เป็นไปตามคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิต วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, USA) ผลการทดลองที่ได้จะแสดงในรูป relative IL-1β secretion หรือ % ของ

ระดับการหลั่ง IL-1β ที่ปรับตามปริมาณโปรตีนของเซลล์ในกลุ่มทดสอบนั้นเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ

6. การตรวจวัดปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในหลุมทดสอบด้วยวิธี BCA protein assay kit from Thermo Scientific® โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน

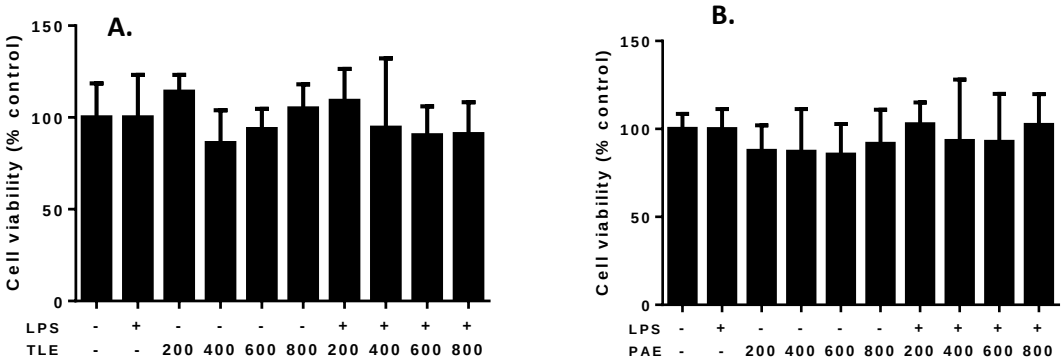
7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดสอบจะรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งเป็นผลจากการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ข้อมูลการทดลองทั้งหมดแสดงเป็นกราฟด้วยโปรแกรม GraphPad prism 6.0 (GraphPad Software, CA) และวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS v25.0 (IBM, USA) ซึ่งเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบต่างๆ ด้วย multiple comparison ANOVA และกำหนดให้ P values≤0.05 จึงจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

1. สารสกัดสมุนไพร TLE และ PAE ความเข้มข้นที่ใช้ไม่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ THP-1

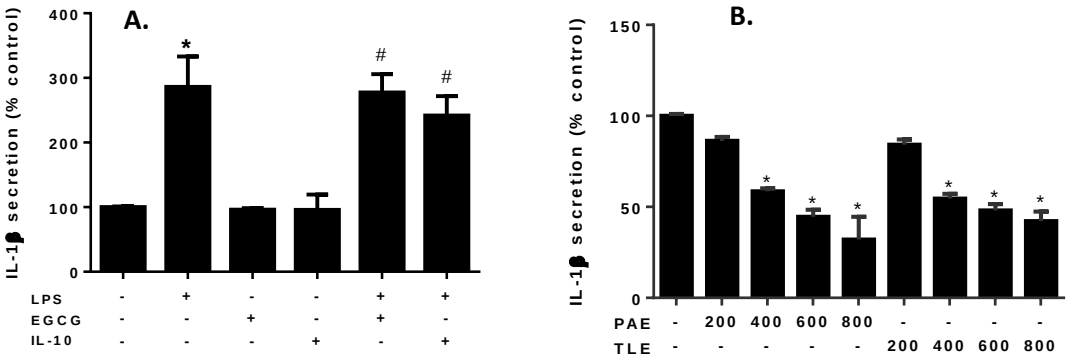
สารสกัดสมุนไพรรางจืด สารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบ รวมถึงสารกระตุ้นและต้านการอักเสบที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะทดสอบความเป็นพิษก่อนด้วยวิธี MTT assay ซึ่งผลที่ได้จากแต่กลุ่มจะเปรียบเทียบกับผลของกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบใด ๆ เมื่อทดสอบเซลล์กับ LPS ความเข้มข้น 1,000 ng/ml EGCG ความเข้มข้น 50 nM และ IL10 ความเข้มข้น 10 μg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารกระตุ้นและต้านการอักเสบที่ใช้ทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (96.76 ± 2.84% สำหรับ LPS, 107.36 ± 2.17% สำหรับ EGCG และ 98.61 ± 4.09% สำหรับ IL10 ตามลำดับ) เมื่อทดสอบเซลล์ THP-1 กับสารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 200, 400, 600 และ 800 μg/ml พบว่า สารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 μg/ml ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการทดสอบเซลล์ด้วยสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ LPS (1,000 ng/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 μg/ml ในสภาวะที่มี LPS ก็ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบใดๆ ดังแสดงใน ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบที่ใช้ทดสอบกับเซลล์โดยทดสอบด้วยวิธี MTT assay [A] ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดรางจืด (200, 400, 600, 800 μg/ml) ในภาวะที่มีและไม่มี LPS (1,000 ng/ml) กระตุ้นเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง **[B]** ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดลูกใต้ใบ (200, 400, 600, 800 μg/ml ในภาวะที่มีและไม่มี LPS กระตุ้นเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง การทดสอบจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.43 ± 0.04 สำหรับการทดสอบเซลล์กับสารสกัดรางจืด และ 0.64 ± 0.06 สำหรับการทดสอบเซลล์กับสารสกัดลูกใต้ใบ ซึ่งคำนวณให้เป็นมีค่าเท่ากับ 100% cell viability

2. สารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบมีผลต่อการหลั่ง IL-1β จากเซลล์ THP-1

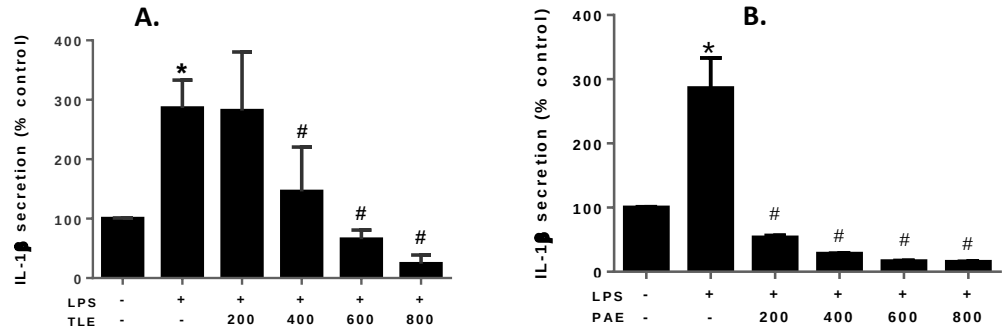
ก่อนทำการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS นั้น จะต้องทำการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการหลั่ง IL-1β ในสภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นเสียก่อน โดยทำการทดสอบ THP-1 กับสารสกัดสมุนไพรรางจืดและลูกใต้ใบ รวมทั้งสารก่ออักเสบ LPS สารต้านอักเสบ 2 ชนิด ได้แก่ EGCG และ IL10 เปรียบเทียบกับ IL-1β ที่หลั่งจากเซลล์ในภาวะควบคุมที่มิได้รับสารใด ผลการทดสอบหลังกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ความเข้มข้น 1,000 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า เซลล์มีการหลั่ง IL-1β เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 286.21±46.89 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p=0.00) ผลการทดสอบเซลล์กับ EGCG ความเข้มข้น 50 nM และ IL-10 ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดไม่ส่งผลให้เซลล์หลั่ง IL-1β แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (96.29 ± 2.27% และ 95.98 ± 23.64% ตามลำดับ) ผลการทดสอบเซลล์ THP-1 กับสารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 μg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดรางจืดความเข้มข้น 400, 600 และ 800 μg/ml มีผลลดการหลั่ง IL-1β จากเซลล์ได้อย่างมีนัยนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมเท่ากับ 54.61±2.91%, 48.11±3.41% และ 42.20±5.20% ตามลำดับ (p=0.00) เช่นเดียวกับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 400, 600 และ 800 μg/ml ซึ่งมีผลลดการหลั่ง IL-1β จากเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมเท่ากับ 58.60±1.57%, 44.53±3.84% และ 32.07±12.54% ตามลำดับ (p=0.00) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดรางจืด สารสกัดลูกใต้ใบ LPS และสารต้านอักเสบอ้างอิงที่มีต่อการหลั่ง IL1β จากเซลล์ THP-1 **[A]** ระดับ IL-1β ที่หลั่งจากเซลล์ที่ทดสอบกับ EGCG ความเข้มข้น 50 nM และ IL10 ความเข้มข้น 10 ng/ml ในภาวะที่มีและไม่มี LPS (1,000 ng/ml) กระตุ้นเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง **[B]** ระดับ IL-1β ที่หลั่งจากเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 200-800 μg/ml การทดสอบจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งการทดลองและแสดงระดับ IL-1β ที่เซลล์หลั่งตามอัตราส่วน IL-1β กับปริมาณโปรตีนจากเซลล์ในหลุมการทดสอบนั้น ๆ ก่อน โดยระดับ IL-1β ที่เซลล์กลุ่มควบคุมหลั่งเฉลี่ยเท่ากับ 5.62±0.06 pg/ml คำนวณให้เป็นมีค่าเท่ากับ 100% IL-1β secretion * แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบจากกลุ่มควบคุมและ # แสดงการความแตกต่างระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ทดสอบสารต้านการอักเสบร่วมกับ LPS จากกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ LPS โดยทุกการวิเคราะห์จะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3. สารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบสามารถลดการหลั่ง IL-1β จากเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าสารต้านอักเสบชนิดอื่น

เพื่อทดสอบว่าสารสกัดรางจืดและลูกใต้ใบมีความสามารถในการยับยั้งการกระตุ้นการอักเสบจากสารก่อการอักเสบได้หรือไม่ ในการศึกษานี้ จึงทำการทดสอบเซลล์กับสารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบร่วมกับ LPS ความเข้มข้น 1,000 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ LPS รวมถึงทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับสารที่มีงานวิจัยอ้างอิงคุณสมบัติต้านการอักเสบอีก 2 ชนิดคือ EGCG และ IL-10 ผลการทดสอบกับเซลล์พบว่า สารสกัดรางจืดความเข้มข้น 400, 600 และ 800 μg/ml สามารถลดระดับ IL-1β ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย LPS (286.21%) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (145.94±74.63%, 65.52±15.45% และ 24.22±14.49% ตามลำดับ) ($p \leq 0.05$) ในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้ดังแสดงในภาพที่ 4.3A สารสกัดลูกใต้ใบทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ความเข้มข้น 200 ถึง 800 μg/ml สามารถลดการหลั่ง IL-1β จากการกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (53.34±3.00%, 28.14±0.81%, 16.52±1.12% และ 15.62±0.48% ตามลำดับ) ($p \leq 0.05$) ในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้เช่นเดียวกับสารสกัดรางจืดดังแสดงในภาพที่ 4.3B อย่างไรก็ตาม การทดสอบนี้ พบว่า EGCG และ IL-10 ความเข้มข้นที่ใช้นั้นสามารถลดการหลั่ง IL-1β ได้เพียงเล็กน้อยและไม่พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.38$ และ $p=0.65$ ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ปริมาณ IL-1β ที่หลั่งจากเซลล์หลังการทดสอบเซลล์กับสารสกัดรางจืด สารสกัดลูกใต้ใบ ร่วมกับ LPS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง [A] ปริมาณ IL-1β ที่หลั่งจากเซลล์เมื่อทดสอบกับสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 200-800 μg/ml ร่วมกับ 1,000 μg/ml LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง **[B]** ปริมาณ IL-1β ที่หลั่งจากเซลล์เมื่อทดสอบกับสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 200-800 μg/ml ร่วมกับ 1,000 μg/ml LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทดสอบจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งการทดลอง และแสดงระดับ IL-1β ที่เซลล์หลั่งตามอัตราส่วน IL-1β กับปริมาณโปรตีนจากเซลล์ในหลุมการทดสอบนั้นๆ ก่อน โดยระดับ IL-1β ที่เซลล์กลุ่มควบคุมหลั่งเฉลี่ยเท่ากับ 5.62±0.06 pg/ml คำนวนให้เป็นมีค่าเท่ากับ 100% IL-1β secretion * แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบจากกลุ่มควบคุม # แสดงการความแตกต่างระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ทดสอบสารสกัดร่วมกับ LPS จากกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ LPS โดยทุกการวิเคราะห์จะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

Interleukin-1β (IL-1β) จัดเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบตัวมาแต่กำเนิดและแบบจำเพาะ (innate/adaptive immune responses) ทำหน้าที่เป็นสารเริ่มต้นขบวนการอักเสบเนื่องจากสามารถจับกับ Interleukin-1 receptor (IL-1R) ที่อยู่บนผิวเซลล์กระตุ้นการสังเคราะห์สารก่ออักเสบชนิดอื่น เหนี่ยวนำการสังเคราะห์และหลั่ง Nitric Oxide จากเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Sahni A and et al., 2005) และมีผลในการปรับเปลี่ยนควบคุมการแสดงออกของยีนของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและนิวโทรฟิว [17] โดยเฉพาะโปรตีน monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการเหนี่ยวนำเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ไหลเวียนในกระแสเลือดให้มาบริเวณที่มีสารกระตุ้นการอักเสบซึ่งพบในกรณีทั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (Parry GCN and et al., 1998) การกระตุ้นการหลั่ง IL-1β จะเริ่มขึ้นเมื่อมีสารกระตุ้นเข้าจับกับ Toll-like receptors (TLRs) ที่อยู่บนผนังเซลล์แมคโครเฟจ ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต่อเนื่องผ่านระบบโปรตีนสัญญาณ TRIF-RIPK1-FADD-CASP8 และเข้ากระตุ้นกลุ่มโปรตีนเชิงซ้อน NLRP3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน pro-IL-1β ให้เป็น IL-1β และปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ ในปัจจุบันพบว่าการกระตุ้นการหลั่ง IL-1β ของมนุษย์มีกลไกควบคุมการหลั่งที่แตกต่างจากสัตว์ทดลอง (Gaidt Moritz M and et al., 2016) และกลไกการหลั่งของ IL-1β นั้นมีความแตกต่างจากการหลั่งโปรตีนชนิดอื่น (Lévesque SA and et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ปริมาณ IL-1β ที่เซลล์หลั่งนั้นอาจมิได้สัมพันธ์กับระดับฤทธิ์ IL-1β เนื่องจากการออกฤทธิ์ของโปรตีนในกลุ่ม IL-1 จะมีการควบคุมอย่างเข้มงวดมาก

ร่างกายผลิตสารต้านการออกฤทธิ์ของโปรตีนในกลุ่ม IL-1 ออกมาหลายชนิด อาทิเช่น IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) และ IL-1 receptor type II (IL-1RII) เพื่อทำหน้าที่ในการจับและยับยั้งการทำงานของ IL-1β หากร่างกายไม่สามารถควบคุมปริมาณหรือการออกฤทธิ์ของ IL-1β ได้จะส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพโรคอักเสบเรื้อรัง ซึ่งปัจจุบันที่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง IL-1β ของกับพยาธิสภาพของโรคแล้วคือ โรคในกลุ่มการอักเสบด้วยตัวเองหรือ autoinflammatory diseases เช่น autoimmune encephalomyelitis[20], Alzheimer disease (Shaftel SS and et al., 2008) , Rheumatoid arthritis (Kay J and et al., 2004) และขบวนการเหนี่ยวนำการเกิดและแพร่กระจายของมะเร็ง (Lewis AM and et al., 2006) การศึกษาผลการใช้ยา canakinumab ซึ่งเป็น anti-IL-1β antibody ใช้ในการรักษากลุ่มอาการไข้กลับเป็นซ้ำบางชนิด (periodic fever syndromes) สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1β ในผู้ป่วยโรคที่มีการอักเสบเรื้อรัง เช่น เบาหวานประเภทที่ 2 โรคหลอดเลือดและหัวใจ (Peiró C and et al., 2017) มะเร็งเม็ดเลือด (Guo B and et al., 2016 and Arranz L and et al., 2017) รวมทั้งพบว่า สามารถช่วยบรรเทาอาการของโรค ทำให้ผู้ป่วยมีการดำเนินโรคที่ช้าลงและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น (Dinarello CA and et al., 2011)ในการศึกษาวิจัยนี้พบว่าสารสกัดรางจืดและสารสกัดลูกใต้ใบมีความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง IL-1β จากเซลล์แมคโครเฟจแม้อยู่ในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ได้ จึงอาจนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบเรื้อรังชนิดใหม่ในอนาคต

เมื่อศึกษาสารออกฤทธิ์องค์ประกอบในรางจืดพบว่าประกอบด้วยสารแอลคาลอยด์ iridoid glycosides และ grandifloric acid รวมถึงสารประกอบฟีโนลิกในกลุ่มของ apigenin และ delphinidin เป็นหลัก (Chan EWC and et al., 2011) ซึ่งนอกจากรางจืดแล้วยังพบในพืชอีกหลายสกุล สารเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ต้านการอักเสบได้ดี ดังเช่นการศึกษา iridoid glycosides ที่สกัดได้จากใบต้น *Folium syringae* พบว่ามีคุณสมบัติต้านการอักเสบ สามารถปรับลดการแสดงออกของยีน tumor necrosis factor-α (TNF-α) และ interleukin-6 (IL-6) ผ่านกลไกการปรับลดการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม NF-**K**B-p65 (Liu X and et al., 2011) สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ของ iridoid glycosides ที่สกัดจากต้น *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo ซึ่งพบว่าสามารถลดอาการอักเสบอันเกิดจากการกระตุ้นด้วย acetic acid ในหนูทดลอง (Li M and et al., 2010) นอกจากนี้ apigenin และ delphinidin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์หลักที่พบในใบรางจืดก็มีความสามารถในการยับยั้ง LPS มิให้กระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS, COX-2 และ pro-inflammatory cytokines อาทิเช่น IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, และ TNF-α (Patil RH and et al., 2016) สำหรับสารออกฤทธ์องค์ประกอบในต้นลูกใต้ใบนั้น จะเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ phyllantine และ hypophyllantine เป็นหลัก รวมถึงยังประกอบด้วยสารประกอบฟีโนลิก อาทิเช่น lignans, triterpenes, sterols และฟลาโวนอยด์ quercetin (Patel JR and et al., 2011) การศึกษากลไกต้านการอักเสบในเซลล์ U937 macrophages พบว่าสารประกอบ hypophyllantine สามารถปรับลดการสังเคราะห์ prostaglandin E2 (PGE2), cyclooxygenase-2 (COX-2), TNF-α และ IL-1β ลงได้ (Harikrishnan H and et al., 2018) นอกจากนี้ quercetin ซึ่งเป็นสารสำคัญอีกชนิดที่พบได้มากในต้นลูกใต้ใบยังมีการศึกษาที่บ่งชี้ว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์ nitric oxide และ IL-6 ผ่านการยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน NF-**K**B และ extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2) รวมถึง c-Jun N-terminal kinase (c-JNK) pathway (Lee HN and et al., 2018) จากทั้งหมดที่กล่าวมาอาจสามารถสรุปได้ว่า ใบรางจืดและต้นลูกใต้ใบประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ ซึ่งสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1β จากเซลล์แมคโครเฟจดังที่พบได้ในการศึกษาครั้งนี้

อย่างไรก็ตาม Epigallocatechin 3-gallate เป็นสารที่มีรายงานว่ามีคุณสมบัติยับยั้งการอักเสบอันเกิดจากการกระตุ้นด้วย LPS ได้ในสัตว์ทดลอง (Chen J and et al., 2015 and Lee YK and et al., 2009) ซึ่งเลือกใช้เป็นสารต้านการอักเสบมาตรฐานในการเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ระดับความเข้มข้น 50 nM ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นเฉลี่ยที่มีการศึกษาแล้วว่าเป็นระดับความเข้มข้นที่พบได้ในกระแสเลือดหลังดื่มน้ำชาเขียว (Casanova E and et al., 2019) กลับพบว่าไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1β จากเซลล์แมคโครเฟจได้ จึงเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นที่เลือกใช้นั้นอาจไม่มีความเหมาะสม การศึกษาฤทธิ์ของ catechin และอนุพันธ์จากชาเขียวที่มีต่อการสังเคราะห์สารก่ออักเสบในเซลล์ primary human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts พบว่า EGCG สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณกระตุ้นการสังเคราะห์สารก่ออักเสบในเซลล์ชนิดนี้ได้เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้น 5-20 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าที่คณะผู้วิจัยเลือกใช้ (Fechtner S and et al., 2017) นอกจาก EGCG แล้ว ในการศึกษานี้ยังได้ทำการทดสอบเซลล์กับ IL-10 ซึ่งจัดเป็นไซโตไคน์ที่มีมีคุณสมบัติลดการอักเสบ การควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมิให้มากเกินความต้องการ โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่า IL-10 ความเข้มข้น 10 ng/ml ไม่มีผลต่อการหลั่ง IL-1β ในเซลล์ THP-1 ในสภาวะถูกกระตุ้นด้วย LPS เช่นเดียวกับ EGCG ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าคณะผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม หรือกลไกในการยับยั้งการอักเสบของ IL10 นั้นเป็นกลไกที่มิเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านโปรตีนสัญญาณภายในเซลล์แต่อย่างใด การศึกษาคุณสมบัติของ IL-10 ในเซลล์ bone marrow-derived macrophages (BMDMs) พบว่าคุณสมบัติต้านอักเสบของ IL-10 เกิดจากการปรับขบวนการสันดาปของแมคโครเฟจมิให้มีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไป (Ip WKE and et al., 2017) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า กลไกที่ LPS กระตุ้นการอักเสบในเซลล์ THP-1 นั้นอาจมิได้เกิดจากกลไกการกระตุ้นผ่านระบบอนุมูลอิสระ แม้สารสกัดรางจืดและลูกใต้ใบนั้นจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ แต่กลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบนั้นคาดว่าน่าจะเป็นการออกฤทธิ์ผ่านกลไกการส่งสัญญาณอื่น การศึกษา Apigenin ซึ่งเป็นสารสำคัญในรางจืดพบว่า สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณการอักเสบผ่านหลายกลไก สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ IL-1β โดยผ่านกลไกการยับยั้ง caspase-1 activation จนส่งผลให้โปรตีน NLRP3 ไม่สามารถจับตัวเป็นโปรตีนเชิงซ้อน inflammasome (Zhang X and et al., 2014) เช่นเดียวกับผลการศึกษาสารสกัดลูกใต้ใบในเซลล์ U937 macrophages ที่พบว่านอกจากการออกฤทธิ์ยับยั้ง LPS มิให้กระตุ้นการอักเสบผ่านการส่งสัญญาณตาม NF-ΚB MAPK pathway แล้วยังสามารถลดการส่งสัญญาณผ่าน phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K-Akt) (Harikrishnan H and et al., 2018) ซึ่งเป็นกลไกที่ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงาน caspase-1 (Liang J and et al., 2015) ซึ่งต้องทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์กลไกในเชิงลึกต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การรักษาภาวะอักเสบด้วยยาในกลุ่ม NSAIDs และ corticosteroids นั้นแม้จะมีคุณสมบัติใช้ในการรักษาอาการอักเสบได้ดี แต่มักก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ได้บ่อย เนื่องจากการออกฤทธิ์ของยาที่ไม่จำเพาะ สารสกัดสมุนไพรไทย จากใบรางจืดและต้นลูกใต้ใบนั้นมีคุณสมบัติในการลดการหลั่ง IL-1β ซึ่งเป็นไซโตไคน์หลักที่พบได้ในการอักเสบเรื้อรังจากเซลล์แมคโครเฟจได้ สารสกัดสมุนไพรไทย รางจืดและลูกใต้ใบจึงสามารถใช้ในการส่งเสริมการบำรุงดูแลสุขภาพในเชิงป้องกัน หรือใช้ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคอันเกิดจากภาวะอักเสบเรื้อรังต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. (2010). **Inflammation in neurodegenerative diseases**. Immunology ;129(2): pp.154-69.

Ashok A, Keener R, Rubenstein M, Stookey S, Bajpai S, Hicks J, et al. (2019). Consequences of interleukin 1β-triggered chronic inflammation in the mouse prostate gland: Altered architecture associated with prolonged CD4+ infiltration mimics human proliferative inflammatory atrophy. **The Prostate**; 79(7): pp.732-45.

Arranz L, Arriero MdM, Villatoro A. (2017). Interleukin-1β as emerging therapeutic target in hematological malignancies and potentially in their complications. **Blood Reviews**; 31(5): pp.306-17.

Chan EWC, Eng SY, Tan YP, Wong ZC. (2011). Phytochemistry and Pharmacological Properties of Thunbergia laurifolia: **A Review. Pharmacognosy Journal**; 3(24): pp.1-6.

Casanova E, Salvadó J, Crescenti A, Gibert-Ramos A. (2019). Epigallocatechin Gallate Modulates Muscle Homeostasis in Type 2 Diabetes and Obesity by Targeting Energetic and Redox Pathways: A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**; 20(3).

Chen J, Xu J, Li J, Du L, Chen T, Liu P, et al. (2015). Epigallocatechin-3-gallate attenuates lipopolysaccharide-induced mastitis in rats via suppressing MAPK mediated inflammatory responses and oxidative stress. **International Immunopharmacology**; 26(1): pp.147-52.

Dinarello CA. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**; 117(14): pp.3720-32.

Fechtner S, Singh A, Chourasia M, Ahmed S. (2017). Molecular insights into the differences in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL-1β signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Toxicology and Applied Pharmacology**; 329: pp.112-20.

Goldberg Ronald B, Aroda Vanita R, Bluemke David A, Barrett-Connor E, Budoff M, Crandall Jill P, et al. (2017). Effect of Long-Term Metformin and Lifestyle in the Diabetes Prevention Program and Its Outcome Study on Coronary Artery Calcium. **Circulation**; 136(1): pp.52-64.

Gaidt Moritz M, Ebert Thomas S, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk Jonathan L, Rapino F, et al. (2016). Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. **Immunity**; 44(4): pp.833-46.

Guo B, Fu S, Zhang J, Liu B, Li Z. (2016). Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. **Scientific reports**; 6:36107-.

Hammad DR, Elgazzar AG, Essawy TS, Abd El Sameie SA. (2015). Evaluation of serum interleukin-1 beta as an inflammatory marker in COPD patients. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**; 64(2): pp.347-52.

Harikrishnan H, Jantan I, Haque MA, Kumolosasi E. (2018). Anti-Inflammatory Effects of Hypophyllanthin and Niranthin Through Downregulation of NF-**K**B/MAPKs/PI3K-Akt Signaling Pathways. **Inflammation**; 41(3): pp.984-95.

Harikrishnan H, Jantan I, Haque MA, Kumolosasi E. (2018). Anti-inflammatory effects of Phyllanthus amarus Schum. & Thonn. through inhibition of NF-**K**B, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages. **BMC complementary and alternative medicine**; 18(1):p.224.

Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**. (New York, NY); 356(6337):pp.513-9.

Liu X, Wang J. (2011). Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of Folium syringae leaves on TNBS-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**; 133(2): pp.780-7.

Liang J, Zhao H, Yao L, Tang H, Dong H, Wu Y, et al. (2015). Phosphatidylinositol 3-kinases pathway mediates lung caspase-1 activation and high mobility group box 1 production in a toluene-diisocyanate induced murine asthma model. **Toxicology Letters**; 236(1):pp.25-33.

Li M, Shang X, Zhang R, Jia Z, Fan P, Ying Q, et al. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of iridoid glycosides extract of Lamiophlomis rotata (Benth.) Kudo. **Fitoterapia**; 81(3): pp.167-72.

Lee HN, Shin SA, Choo GS, Kim HJ, Park YS, Kim BS, et al. (2018). Anti‐inflammatory effect of quercetin and galangin in LPS‐stimulated RAW264.7 macrophages and DNCB‐induced atopic dermatitis animal models. **Int J Mol Med**; 41(2): pp.888-98.

Lee YK, Yuk DY, Lee JW, Lee SY, Ha TY, Oh KW, et al. (2009). Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. **Brain Research**; 1250: pp.164-74.

Rocejanasaroj A, Tencomnao T, Sangkitikomol W. (2014). Thunbergia laurifolia extract minimizes the adverse effects of toxicants by regulating P-glycoprotein activity, CYP450, and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. **Genetics and Molecular Research**; 13(1): pp.205-19.

Kay J, Calabrese L. (2004). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**; 43(suppl_3): pp.iii2-iii9.

Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **Journal of translational medicine**; 4: p.48.

Lévesque SA, Paré A, Mailhot B, Bellver-Landete V, Kébir H, Lécuyer M-A, et al. (2016). Myeloid cell transmigration across the CNS vasculature triggers IL-1β–driven neuroinflammation during autoimmune encephalomyelitis in mice. **The Journal of Experimental Medicine**; 213(6): p.929.

Lopez-Castejon G, Brough D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1β secretion. **Cytokine Growth Factor Rev**; 22(4): pp.189-95.

Monteiro R, Azevedo I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. **Mediators of inflammation**; 2010:289645.

Multhoff G, Molls M, Radons J. (2012). Chronic inflammation in cancer development. **Frontiers in immunology**; pp.2:98-.

Moore Kathryn J, Tabas I. (2011). Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Cell**; 145(3): pp.341-55.

Naaz F, Javed S, Abdin MZ. (2007). Hepatoprotective effect of ethanolic extract of Phyllanthus amarus Schum. et Thonn. on aflatoxin B1-induced liver damage in mice. **Journal of Ethnopharmacology**; 113(3): pp.503-9.

Pramyothin P, Ngamtin C, Poungshompoo S, Chaichantipyuth C. (2007). Hepatoprotective activity of Phyllanthus amarus Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: In vitro and in vivo studies. **Journal of Ethnopharmacology**; 114(2): pp.169-73.

Parry GCN, Martin T, Felts KA, Cobb RR. (1998). IL-1b Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Expression in Endothelial Cells Is Blocked by Proteasome Inhibitors. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**; 18(6): pp.934-40.

Peiró C, Lorenzo Ó, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF. (2017). IL-1β Inhibition in Cardiovascular Complications Associated to Diabetes Mellitus. **Frontiers in pharmacology**; 8:363-.

Patil RH, Babu RL, Naveen Kumar M, Kiran Kumar KM, Hegde SM, Nagesh R, et al. (2016). Anti-Inflammatory Effect of Apigenin on LPS-Induced Pro-Inflammatory Mediators and AP-1 Factors in Human Lung Epithelial Cells. **Inflammation**; 39(1): pp.138-47.

Patel JR, Tripathi P, Sharma V, Chauhan NS, Dixit VK. (2011). Phyllanthus amarus: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**; 138(2): pp.286-313.

Shaftel SS, Griffin WST, O'Banion MK. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. **Journal of neuroinflammation**; pp.5:7-.

Sigurdardottir SL, Freysdottir J, Vikingsdottir T, Valdimarsson H, Vikingsson A. (2008). Do non-steroidal anti-inflammatory drugs influence chronic inflammation? The effects of piroxicam on chronic antigen-induced arthritis in rats. **Scandinavian Journal of Rheumatology**; 37(6): pp.469-76.

Sahni A, Sahni Sanjeev K, Francis Charles W. (2005). Endothelial Cell Activation by IL-1β in the Presence of Fibrinogen Requires αVβ3. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**; 25(10): pp.2222-7.

Wonkchalee O, Boonmars T, Aromdee C, Laummaunwai P, Khunkitti W, Vaeteewoottacharn K, et al. (2012). Anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects of Thunbergia laurifolia Linn. on experimental opisthorchiasis. **Parasitology Research**; 111(1): pp.353-9.

Williams MR, Kataoka N, Sakurai Y, Powers CM, Eskin SG, McIntire LV. (2008). Gene Expression of Endothelial Cells due to Interleukin-1 Beta Stimulation and Neutrophil Transmigration. **Endothelium**; 15(1-2): pp.73-84.

Willerson James T, Ridker Paul M. (2004). Inflammation as a Cardiovascular Risk Factor. **Circulation**; 109 (21_suppl_1):II-2-II-10.

Wang B, Miao Y, Zhao Z, Zhong Y. (2015). Inflammatory Macrophages Promotes Development of Diabetic Encephalopathy. **Cellular Physiology and Biochemistry**; 36(3): pp.1142-50.

Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H. (2014). Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. **PloS one**; 9(9):e107072-e.