

ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์
เคอราติโนไซต์ของมนุษย์: การศึกษาด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์



นายณัฐพงศ์ ขาวจิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556


ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

EFFECTS OF THAI HERBAL EXTRACTS WITH ANTI-PSORIATIC ACTIVITY ON
EXPRESSION OF PROTEINS IN HUMAN KERATINOCYTES: A PROTEOMICS STUDY

The emblem of Chulalongkorn University, featuring a central tiered structure with a sunburst above it, all rendered in a light, faded style.

Mr. Natapong Kawjit

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and

Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เคอราติโนไซต์ของ
โดย	มนุษย์: การศึกษาด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์
สาขาวิชา	นายณัฐพงศ์ ขาวจิตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา
	อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรณะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชี้อชวลกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.อรภัค เรียมทอง)

ณัฐพงศ์ ขาวจิตร : ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์: การศึกษาด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์. (EFFECTS OF THAI HERBAL EXTRACTS WITH ANTI-PSORIATIC ACTIVITY ON EXPRESSION OF PROTEINS IN HUMAN KERATINOCYTES: A PROTEOMICS STUDY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.ศิริพร แสงสุวรรณ, 124 หน้า.

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังซึ่งมีการอักเสบแบบเรื้อรัง มีการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่มากกว่าปกติและพัฒนาการของเซลล์ผิดปกติ ในปัจจุบัน ยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคนี้แน่ชัด การรักษาจึงเป็นการรักษาตามอาการ ซึ่งเมื่อใช้ยาเป็นเวลานานก็ทำให้เกิดผลข้างเคียงและอาการดื้อยา คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของปัญหาดังกล่าวและเนื่องจากประเทศไทยมีสมุนไพรมากมาย สมุนไพรไทยจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินให้เกิดประสิทธิภาพ ซึ่งในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ได้มีเป้าหมายศึกษาสารสกัดน้อยหน่า ข่า ขมิ้น และสารเคอเวอซิทีน (Quercetin) ว่ามีกลไกต้านโรคสะเก็ดเงินอย่างไรในระดับโมเลกุล เนื่องจากระบบการทำงานของเซลล์ต้องอาศัยโปรตีนเป็นตัวตอบสนองจากการกระตุ้นด้วยสัญญาณต่างๆ โปรตีนจึงมีบทบาทสำคัญ คือการเป็นเป้าหมาย (Target protein) ในการรักษา ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อจำแนกชนิดโปรตีนเป้าหมายที่ตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน่า ข่า ขมิ้นและสารเคอเวอซิทีนที่เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง (Human Keratinocyte Cell Line, HaCaT cells) ซึ่งนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาในครั้งนี้ลดจำนวนลงได้โดยใช้เทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์ ซึ่งประกอบด้วย Two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE) และ tandem-mass spectrometry (MS/MS) จากการศึกษาพบว่า Cathepsin D, Enoyl-CoA hydratase, Heat shock protein beta-1 และ Peroxiredoxin-4 เป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมที่ตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน่า ข่า และขมิ้น และสำหรับ Cathepsin D นั้นพบว่าเป็นโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่สามารถตอบสนองต่อการใช้สารสกัดน้อยหน่า ข่า ขมิ้นและสารเคอเวอซิทีน โดยที่โปรตีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ พัฒนาการของเซลล์ การอักเสบ และการตายของเซลล์แบบ apoptosis เป็นหลัก นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารสกัดจากขมิ้นมีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และแปรผันตรงกับการลดลงของจำนวนเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ทราบโปรตีนเป้าหมายใหม่ๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินต่อไปในอนาคต

ภาควิชา	เคมีคลินิก	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5476652537 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: PSORIASIS / ALPINIA GALANGA / ANNONA SQUAMOSA / CURCUMA LONGA / 2D-GE / PROTEOMIC / QUERCETIN

NATAPONG KAWJIT: EFFECTS OF THAI HERBAL EXTRACTS WITH ANTI-PSORIATIC ACTIVITY ON EXPRESSION OF PROTEINS IN HUMAN KERATINOCYTES: A PROTEOMICS STUDY. ADVISOR: ASST. PROF. DR.TEWIN TENCOMNAO, CO-ADVISOR: DR.SIRIPORN SANGSUTHUM, 124 pp.

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disorder, which is characterized by cutaneous inflammation, hyperproliferation and abnormal differentiation of keratinocytes. The exact cause of psoriasis remains to be elucidated. The current treatment of psoriasis is to deal with the symptoms point by point. Psoriatic patients are still unsatisfied with the treatment due to drug resistance and side effects, especially when taking a medication for a long time. The researchers have recognized the importance of these issues, thus aiming to study Thai herbs as new alternatives for therapy. Thai herbs (*Annona squamosa*, *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*) and quercetin were included in this current study since they were demonstrated to exhibit the anti-psoriatic activity. Since the cellular system is known to respond to stimuli via signaling cascades, target proteins play significant roles and have become targets for treatment. The objective of the present study is to identify the target proteins of psoriasis upon treatment with *Annona squamosa*, *Alpinia galanga*, *Curcuma longa* and quercetin using an in vitro model, human keratinocyte cell line (HaCaT). Employing proteomics tools including two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE) and liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), we found that Cathepsin D, Enoyl-CoA hydratase, Heat shock protein beta-1 and Peroxiredoxin-4 were common target proteins in response to the extracts derived from *Annona squamosa*, *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. Cathepsin D was the one also responded to *Annona squamosa*, *Alpinia galanga*, *Curcuma longa* and quercetin treatment, that signifying its role in psoriatic treatment. This protein has been shown to be involved in cell proliferation, differentiation, inflammation and apoptosis. In addition, the researchers determined phenolic compound and flavonoid content to study the potential of antioxidants of these herbal extracts, which were expected to play a role in inhibiting proliferation of keratinocytes. The results showed that *curcuma longa* extracts have the highest antioxidant activity, which was directly proportional to the anti-psoriatic activity. Therefore, this study suggested the target proteins, which can be further elucidated and applied for psoriatic treatment in the future.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and
Molecular Medicine

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2013

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาว่า ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาในระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนถึงโอกาสดีๆทางการศึกษาที่ท่านอาจารย์ได้แนะนำ ศิษย์ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ผศ.ดร.ศิริพร ชื่อชวาลกุลและอาจารย์ ดร.อรภักดิ์ เรี่ยมทอง ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เกิดขึ้นได้เพราะคณะผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 21 ครั้งที่ 2/2556 และทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จ.ระยอง ที่มอบตัวอย่างสมุนไพรเพื่อให้ใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. พลฤกษ์ แสงวณิช (หัวหน้าสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์) โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยีและโครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษาสำหรับตัวข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว อาจารย์และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่มอบซึ่งกำลังใจ มิตรภาพและความช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 โรคสะเก็ดเงิน.....	3
2.2 ความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน.....	3
2.3 ชนิดของโรคสะเก็ดเงิน (Types of Psoriasis).....	3
2.4 สาเหตุการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	5
2.5 แนวทางการรักษาโรคสะเก็ดเงิน.....	6
2.6 น้อยหน้า.....	8
2.7 ข่า.....	9
2.8 ขมิ้น.....	10
2.9 เควอซีทิน (quercetin).....	11
2.10 ความสำคัญของโปรตีโอมิคส์.....	11
2.11 ความก้าวหน้าในการศึกษาด้านโปรตีโอมิคส์ของโรคสะเก็ดเงิน.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	13
3.3.1 การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายโดย Soxhlet apparatus.....	17
3.3.2 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทย.....	19

3.3.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยวิธี DPPH assay	19
3.3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยวิธี ABTS ⁺ assay	20
3.3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu assay	22
3.3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay	23
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค MTT assay	24
3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราทีโนไซต์	25
3.3.4.1 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ HaCaT	25
3.3.4.2 Bradford assay	26
3.3.4.3 แยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2-dimensional gel electrophoresis (2D-GE)	27
3.3.4.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของจุดโปรตีน	29
3.3.4.5 การย่อยภายในเจล	29
3.3.4.6 การวิเคราะห์ผลด้วย Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)	30
วิเคราะห์โปรตีนด้วยฐานข้อมูล (Protein Database Analyses)	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย	33
4.1 ผลการสกัดสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	33
4.2 ผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	36
4.3 ผลการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์	37
4.4 ผลการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay	38
4.5 ผลการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay	39
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค MTT assay	40
4.6.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากน้อยหน่าด้วยเทคนิค MTT assay	41
4.6.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข่าด้วยเทคนิค MTT assay	42
4.6.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากขมิ้น (DCM) ด้วยเทคนิค MTT assay	43

4.6.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากขมิ้น (ETH) ด้วยเทคนิค MTT assay	44
4.6.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคอควิซิน (quercetin) ด้วยเทคนิค MTT assay	44
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรไทยต่อการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์	45
4.7.1 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า	45
4.7.2 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดชา	46
4.7.3 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดขมิ้น	47
4.7.4 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดสารเคอควิซิน (quercetin).....	49
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	58
รายการอ้างอิง	64
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	117
ภาคผนวก ค.....	122
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	124

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี DPPH assay.....	20
ตารางที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี ABTS assay.....	21
ตารางที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วย วิธี Folin-ciocalteu assay.....	22
ตารางที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วย วิธี Aluminum chloride colorimetric assay.....	23
ตารางที่ 3.5 แสดง condition ของ mobile phase สำหรับการแยกสารด้วย Liquid chromatography (LC).....	31
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดน้อยหน้า ข้าว และขมิ้นด้วยวิธี Folin-ciocalteu assay.....	36
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดน้อยหน้า ข้าวและขมิ้น ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay.....	37
ตารางที่ 4.3 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระ ของสารสกัดน้อยหน้า ข้าว และขมิ้นด้วยวิธี DPPH.....	38
ตารางที่ 4.4 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระ ของสารสกัดน้อยหน้า ข้าว และขมิ้นด้วยวิธี ABTS.....	39
ตารางที่ 4.5 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้าจาก ตัวทำละลาย ethanol.....	46
ตารางที่ 4.6 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดข้าวจาก ตัวทำละลาย petroleum ether.....	47
ตารางที่ 4.7 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดขมิ้นจาก ตัวทำละลาย dichloromethane.....	48

ตารางที่ 4.8 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดไขมันจาก
 ตัวทำละลาย ethanol.....49

ตารางที่ 4.9 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารเคอควิทิน (quercetin).....50



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ใบน้อยหน่า (<i>Annona squamosa</i> , leaf).....	8
ภาพที่ 2.2 เหง้าข่า (<i>Alpinia galanga</i> , rhizome).....	9
ภาพที่ 2.3 เหง้าขมิ้น (<i>Curcuma longa</i> , rhizome).....	10
ภาพที่ 3.1 เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงมนุษย์ (Human Kerationcytes cell line, HaCaT cells).....	13
ภาพที่ 3.2 แสดงความมีขั้วของตัวทาละลายชนิดต่างๆ.....	17
ภาพที่ 3.3 แสดงถึงส่วนประกอบของเครื่องสกัด soxhlet apparatus.....	18
ภาพที่ 3.4 แสดงถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูล DPPH.....	19
ภาพที่ 3.5 แสดงถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูล ABTS ^{•+}	21
ภาพที่ 3.6 แสดงถึงปฏิกิริยารีดักชันภายในเซลล์ (reduction reaction) ของเทคนิค MTT assay.....	24
ภาพที่ 3.7 แสดงปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับ Coomassie Blue G-250.....	26
ภาพที่ 3.8 แสดงหลักการของ 2-Dimensional Gel Electrophoresis (2D-GE).....	28
ภาพที่ 3.9 เครื่อง Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)	30
ภาพที่ 3.10 หลักการของ mass spectrometry (MS).....	30
ภาพที่ 3.11 แสดงการเปรียบเทียบ mass spectrum ด้วยฐานข้อมูล Mascot.....	32
ภาพที่ 4.1 แสดงปริมาณสารสกัดน้อยหน่าซึ่งใช้ตัวทาละลายที่ต่างชนิดกัน.....	33
ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณสารสกัดข่าซึ่งใช้ตัวทาละลายที่ต่างชนิดกัน.....	34
ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณสารสกัดขมิ้นซึ่งใช้ตัวทาละลายที่ต่างชนิดกัน.....	35

ภาพที่ 4.4	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลาย ethanol ด้วยเทคนิค MTT assay.....	41
ภาพที่ 4.5	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการทดสอบด้วยสารสกัดข้า จากตัวทำละลาย petroleum ether ด้วยเทคนิค MTT assay	42
ภาพที่ 4.6	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการทดสอบด้วยสารสกัดไขมัน จากตัวทำละลาย Dichloromethane ด้วยเทคนิค MTT assay.....	43
ภาพที่ 4.7	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการทดสอบสารสกัดไขมัน จากตัวทำละลาย ethanol ด้วยเทคนิค MTT assay.....	44
ภาพที่ 4.8	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการทดสอบด้วยสารเคอควิซิน (quercetin) ด้วยเทคนิค MTT assay.....	44
ภาพที่ 4.9	โมเดลแสดงโปรตีนที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกันซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมระหว่าง สารสกัดจากน้อยหน้า ข้าและไขมัน.....	51
ภาพที่ 4.10	โมเดลแสดงโปรตีนที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกันซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมระหว่าง สารสกัดจากน้อยหน้า ข้า ไขมันและเคอควิซิน.....	51
ภาพที่ 4.11	โมเดลแสดงชนิดของโปรตีนซึ่งเป็นเป้าหมายร่วมเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า ข้า ไขมัน และสารเคอควิซิน.....	52
ภาพที่ 4.12	Mass spectrum แสดงการแตกตัวของเปปไทด์ FDGILGMAYPR ซึ่งเป็นเปปไทด์ ของโปรตีน cathepsin D.....	52
ภาพที่ 4.13	การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลาย ethanol ด้วยเทคนิค 2D-GE.....	53
ภาพที่ 4.14	การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดข้า จากตัวทำละลาย petroleum ether ด้วยเทคนิค 2D-GE.....	54
ภาพที่ 4.15	การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไขมัน จากตัวทำละลาย dichloromethane ด้วยเทคนิค 2D-GE.....	55

ภาพที่ 4.16 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไขมัน จากตัวทำละลาย ethanol ด้วยเทคนิค 2D-GE.....	56
ภาพที่ 4.17 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารเคอวซิทิน ด้วยเทคนิค 2D-GE.....	57
ภาพที่ 5.1 แสดงร้อยละของโปรตีนเป้าหมายซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า ขา ไขมัน และสารเคอวซิทิน.....	62



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังซึ่งมีการอักเสบแบบเรื้อรังและมีการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่มากกว่าปกติ โรคที่มีความซับซ้อนเนื่องจากปัจจัยทางพันธุกรรม ระบบภูมิคุ้มกันและสิ่งแวดล้อม [1] จัดอยู่ในกลุ่มโรคของ organ specific autoimmune ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยระบบภูมิคุ้มกันทั้ง innate และ adaptive immunity โดยอุบัติการณ์ของโรคสะเก็ดเงินทั่วโลกพบประมาณร้อยละ 2-4 [2] และสามารถเกิดได้กับทุกเพศทุกวัย [3] ผู้ป่วยจะมีผื่นแดงเหมือนมีเลือดคั่งอยู่ภายใต้ชั้นผิวหนังและมีสะเก็ดสีเงินปกคลุมผิวหนังไว้ [4] จากการสำรวจของสถาบันโรคผิวหนังแห่งประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2548-2551 มีการลงทะเบียนผู้ป่วย 11,1548 รายจาก 32 สถาบันทั่วประเทศ โดยพบว่ามีอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงที่เข้าร่วมโครงการทะเบียนเป็น 1.3:1 [5] และจากรายงานของสมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทยในปี พ.ศ. 2555 พบว่าในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของโรคสะเก็ดเงินอยู่ที่ร้อยละ 2 ของประชากรทั้งประเทศ นั่นหมายถึงมีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินอยู่ประมาณ 1 ล้านคน [6] เนื่องจากโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคเรื้อรังจึงส่งผลกระทบต่อสุขภาพกายและจิตใจของผู้ป่วย ซึ่งจากการวิจัยถึงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน พบว่าการลดความรุนแรงของโรค การดูแลตนเองตลอดจนการได้รับความรู้ ความเข้าใจที่ถูกต้องจะเป็นส่วนช่วยให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้น [7] เนื่องจากโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่ยังไม่ทราบถึงสาเหตุของการเกิดที่แท้จริง ดังนั้นการรักษาในปัจจุบันจึงเป็นการรักษาตามอาการของผู้ป่วย [8] ถึงแม้ว่าในปัจจุบันมีการใช้วิธีทางชีวภาพ (biological drug) เพื่อเข้ามาใช้ในการรักษาซึ่งมีความจำเพาะซึ่งจะไปออกฤทธิ์ที่เป้าหมายโดยตรง แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานถึงผลข้างเคียงเมื่อใช้เป็นเวลานาน [9] การรักษาผู้ป่วยจึงจำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้ป่วยเอง ตลอดจนค่าใช้จ่ายซึ่งจะต้องไม่แพงจนเกินไป ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นที่จะต้องมีการค้นคว้าหาวิธีการรักษาแบบใหม่ๆ เนื่องจากประเทศไทยมีสมุนไพรมากมายหลายชนิด ปัจจุบันจึงมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการนำสมุนไพรไทยมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ อีกทั้งมีผลข้างเคียงน้อยมากเมื่อเทียบกับการใช้ยาแผนปัจจุบัน ดังนั้นการรักษาด้วยสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง และที่สำคัญคือปลอดภัยต่อตัวผู้ป่วยเอง โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งได้ทำการศึกษาค้นคว้าหาสมุนไพรไทยที่จะไปมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์เคอราติโนไซต์และลดการแสดงออกของไซโตไคน์ที่มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงินจำนวน 11 ชนิด พบว่ามีสมุนไพรเพียง 3 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคสะเก็ดเงินได้ซึ่งประกอบด้วย น้อยหน่า (*Annona squamosa*) ข่า (*Alpinia galanga*) และขมิ้น (*Curcuma longa*) [10] และจากการค้นพบของ Vijayalakshmi A. และคณะในปี 2012 พบว่าสารเคอควิทิน (quercetin) ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งเป็นไปได้ที่จะนำสารเคอควิทินมาใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินต่อไป [11]

คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงกลไกการทำงานระดับเซลล์ต่อบทบาทของสารสกัดสมุนไพรและสารเคอควิทินในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน และเนื่องจากโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญในการทำงานของเซลล์ โดยเซลล์ต้องอาศัยโปรตีนเป็นตัวตอบสนองจากการกระตุ้นด้วยสัญญาณต่างๆ

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงใช้เทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์ โดยอาศัยเครื่องมือซึ่งประกอบด้วย Two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE) และ Mass spectrometry เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดของโปรตีนที่สามารถตอบสนองต่อการใช้สารสกัดจากน้อยหน่า ข่า ขมิ้นและเคอราตินที่ส่งผลทำให้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง (Human Keratinocytes Cell Line, HaCaT cells) ซึ่งนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาในครั้งนี้ลดจำนวนลงได้ และเพื่อประโยชน์สูงสุดในการรักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างมีประสิทธิภาพ ลดผลข้างเคียง และปลอดภัยต่อผู้ป่วย จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาให้เข้าใจถึงกลไกการตอบสนองและเป้าหมายที่จำเพาะ (target protein) ต่อการรักษาด้วยสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดและสารเคอราติน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้อยหน่า ข่าและขมิ้น คาดว่าน่าจะมีบทบาทในการยับยั้งการอักเสบและการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์
2. เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดน้อยหน่า ข่าและขมิ้นที่ คาดว่าน่าจะมีบทบาทในการยับยั้งการอักเสบและการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์
3. เพื่อวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่เป็นเป้าหมาย (target protein) ที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ในโรคสะเก็ดเงิน เมื่อทำการรักษาด้วยสารสกัดจากน้อยหน่า ข่า ขมิ้นและเคอราติน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

สมุนไพรไทยในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์เหง้าข่าและขมิ้นจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง ใบน้อยหน่าได้รับความอนุเคราะห์จากสวนของคุณ วาลูกา พลายงาม บ้านเลขที่ 41 หมู่ 8 ต.ดอนทราย อ.โพธาราม จ.ราชบุรี โดยคณะผู้วิจัยจะศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในช่วง pH 3-10 จากการใช้สารสกัดจากใบน้อยหน่า เหง้าข่า ขมิ้นและสารเคอราตินเพื่อต้านโรคสะเก็ดเงิน โดยจะทำการศึกษาในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงมนุษย์ (Human Keratinocytes Cell Line, HaCaT cells) ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ *in vitro* model

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการแสดงออกของโปรตีนในโรคสะเก็ดเงิน
2. สามารถคัดกรองโปรตีนเป้าหมายใหม่ๆ (Novel target protein) เพื่อนำไปสู่การรักษาโรคสะเก็ดเงิน
3. องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปต่อยอดการวิจัยเพื่อพัฒนาตัวยาที่มีอยู่ในสารสกัดของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดเพื่อนำมารักษาโรคสะเก็ดเงินให้เกิดประสิทธิภาพ
4. ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีแนวทางในการรักษาเพิ่มมากขึ้น
5. เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่สมุนไพรไทย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคสะเก็ดเงิน

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังซึ่งมีผลกระทบต่อคนทั่วโลกประมาณ 2-4 % ของประชากรโลก โดยมีปัจจัยสำคัญของการเกิดโรคคือ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีการเพิ่มการแบ่งตัว และการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocytes) เกิดความผิดปกติไป [12] ซึ่งลักษณะของรอยโรคที่พบบ่อยมักจะมีชั้นผิวหนังเป็นร่องรอยสีแดงและเป็นสะเก็ด ลักษณะทางเนื้อเยื่อบริเวณรอยโรคจะพบการหนาตัวขึ้นของหนังกำพร้า (acanthosis) [13]

2.2 ความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน [14]

จากข้อมูลของมูลนิธิโรคสะเก็ดเงินแห่งชาติ (National Psoriasis Foundation) ได้แบ่งระดับความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงินเป็น 3 ระดับ ซึ่งจะประเมินจากสัดส่วนร่างกายของผู้ป่วยที่ปรากฏรอยโรค (1% = surface area of the hand) ดังนี้

1. ระดับความรุนแรงน้อย (Mild case) พบรอยโรคปรากฏน้อยกว่า 3 % ของสัดส่วนพื้นที่ร่างกาย
2. ระดับความรุนแรงปานกลาง (Moderate case) พบรอยโรคปรากฏ 3-10 % ของสัดส่วนพื้นที่ร่างกาย
3. ระดับความรุนแรงมาก (Severe case) พบรอยโรคปรากฏมากกว่า 10 % ของสัดส่วนพื้นที่ร่างกาย

แต่อย่างไรก็ตาม การประเมินระดับความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน (Severity of psoriasis) ควรจะพิจารณาในเรื่องของผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ซึ่งหมายถึงผลกระทบต่อกิจกรรมประจำวันของผู้ป่วยควบคู่ไปด้วยกัน เช่น ระดับความรุนแรงน้อย (Mild case) ซึ่งปรากฏรอยโรคน้อยกว่า 3% ของสัดส่วนพื้นที่ร่างกาย แต่หากรอยโรคนั้นเกิดขึ้นบริเวณฝ่ามือหรือฝ่าเท้าก็จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก ผู้ป่วยดังกล่าวจึงจัดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความรุนแรงปานกลาง (Moderate) จนถึงระดับอาการรุนแรงมาก (severe psoriasis)

2.3 ชนิดของโรคสะเก็ดเงิน (Types of Psoriasis) [14, 15]

1. Plaque Psoriasis (psoriasis vulgaris) เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดถึงร้อยละ 80 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน จะมีลักษณะเป็นรอยผื่นแดงของการอักเสบ ขอบเขตชัดเจน ซึ่งรอยโรคสีแดงจะปกคลุมด้วยสะเก็ดสีเงิน สะเก็ดหนาและมีขุยมาก บริเวณที่พบ ได้แก่ ข้อศอก หัวเข่า หนังศีรษะ และแผ่นหลังส่วนล่าง

2. Guttate เป็นชนิดของโรคสะเก็ดเงินที่พบบ่อยในวัยเด็กจนถึงวัยรุ่นซึ่งพบน้อยกว่าร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยทั้งหมด ลักษณะรอยโรคที่พบคือ ตุ่มแดง มีขุย (Fine scale) ซึ่งมักจะพบรอยโรคบริเวณลำตัวและแขนขา

3. Inverse เป็นชนิดของโรคสะเก็ดเงินที่พบน้อยมากประมาณ 3-7 % ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินทั้งหมด ยกในการวินิจฉัย [16] สามารถพบรอยโรคได้ที่ รักแร้ ขาหนีบ ไตรามุม รอบอวัยวะเพศ และกัน ลักษณะรอยโรคที่พบคือ ผื่นสีแดงอ่อน ราบเรียบและมันวาว

4. Pustular เป็นโรคสะเก็ดเงินที่มีรอยโรคมีลักษณะเป็นตุ่มหนอง ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการได้รับยา การสัมผัสกับรังสี UV การตั้งครรภ์ การติดเชื้อ ความเครียด และการหยุดใช้ยา หรือสาร steroid อย่างเฉียบพลัน โดยโรคสะเก็ดเงินประเภท Pustular สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทย่อยคือ

4.1 Von Zumbusch ซึ่งผู้ป่วยมักจะมีอาการ ไข้ หนาวสั่น ค้นอย่างรุนแรง มีการสูญเสียน้ำ ชีพจรเต้นเร็ว อ่อนเพลีย โลหิตจางจาก และมีการสูญเสียมวลของกล้ามเนื้อด้วย โดยสาเหตุสามารถเกิดขึ้นจากการติดเชื้อ การหยุดใช้ยาซึ่งเป็นสารจำพวก steroid หรือการรักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างเฉียบพลัน และการตั้งครรภ์

4.2 Palmoplantar pustulosis เป็นสาเหตุให้เกิดตุ่มหนองบริเวณฝ่ามือและฝ่าเท้า และบุคคลที่มีความเสี่ยงคือ ผู้ที่หยุดจากการสูบบุหรี่ ซึ่งอาจจะเกิดจากการตอบสนองที่เปลี่ยนไปต่อระดับของ nicotine

4.3 Acropustulosis (acrodermatitis continua of Hallopeau) เป็นโรคสะเก็ดเงินที่พบน้อยมาก รอยโรคมักจะเจอบริเวณปลายมือ ปลายเท้า บ่อยครั้งที่มีการเจ็บบริเวณรอยโรค มีการสร้างเล็บที่ผิดปกติ และมีการเปลี่ยนแปลงของกระดูกในรายที่อาการหนักมาก

5. Erythrodermic เป็นผื่นรอยโรคที่มีลักษณะแดงเกือบทั่วพื้นที่ผิวทั้งหมดของร่างกาย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ Von Zumbusch pustular psoriasis ซึ่งอาการ หรือความผิดปกติที่พบ เช่น อาการคั่นอย่างรุนแรง ไข้สูง หนาวสั่น หัวใจเต้นเร็ว อุณหภูมิร่างกายแปรปรวน และพบว่าผู้ป่วยมักมีการสูญเสียโปรตีนซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเจ็บอย่างรุนแรง โดยเกิดจากการกระตุ้นจากการติดเชื้อหรือการใช้ยา เช่น ยาด้านมาลาเรีย

6. Psoriatic nails ความผิดปกติของเล็บสามารถพบร่วมด้วยในโรคสะเก็ดเงินทุกประเภทโดยพบได้ที่ นิ้วมือร้อยละ 50 แต่ในขณะที่นิ้วเท้าสามารถพบความผิดปกติได้แค่เพียงร้อยละ 35 ของผู้ป่วยทั้งหมด ลักษณะอาการที่พบคือ เล็บมีหลุม เล็บร่อน ปลายเล็บหนา มีขุยใต้เล็บ หรือจุดสีน้ำตาลใต้เล็บ

7. Psoriatic arthritis เป็นโรคของการอักเสบของกระดูก และกล้ามเนื้อซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคสะเก็ดเงิน ผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการมักจะทำให้ผลลบ (Negative) สำหรับ Rheumatoid factor (RF) โดยที่โรคนี้อาจเกิดขึ้นได้ทั้งในเพศชายและหญิงในอัตราส่วนเท่าๆกัน ซึ่งจะส่งผลทำให้ข้อเกิดการเสียหาย และนำไปสู่ความพิการหากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง [17]

2.4 สาเหตุการเกิดโรคสะเก็ดเงิน

สาเหตุของการเกิดโรคสะเก็ดเงินยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่มีความเชื่อว่าเป็นโรคทางระบบภูมิคุ้มกันชนิด T cell-mediated autoimmune disease โดยมี T lymphocyte หรือ T cell เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการเกิดโรคสะเก็ดเงิน เมื่อ T cell ได้รับการกระตุ้นจะมีการหลั่งสารชนิดต่างๆ ออกมา จึงทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น โดยเริ่มต้นจาก antigen ที่ยังไม่ทราบชนิด หรืออาจจะเป็นสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกาย (foreign antigen) เช่น เชื้อโรค หรือส่วนของเชื้อโรคที่เป็น super antigen หรือสารภายในร่างกาย (autologous antigen) เช่น peptide ของ keratin ไปกระตุ้น antigen presenting cell (APC) ให้เติบโต และนำเสนอ antigen ต่อ T cell เมื่อ APC นำเสนอ antigen ต่อ T cell จะเกิดการรับรู้ระหว่าง APC กับ T cell ผ่านทาง 2 ช่องสัญญาณคือ เกิดจาก keratinocyte หรือ APC ที่แสดง MHC-I หรือ MHC-II นำเสนอ antigen ต่อ T cell receptor ที่ผิวของ T cell (ช่องสัญญาณที่ 1) และเกิดจากการใช้ตัวกระตุ้นร่วม (co-stimulatory accessory molecules) คือ ICAM-1, LFA-3, VCAM-1 และ B7 บน APC หรือ keratinocyte กับ LFA-1, CD2, VLA4 และ CD28/CTLA4 บน T cell ตามลำดับ (ช่องสัญญาณที่ 2) โดยการนำเสนอ antigen ให้กับ T cell จะต้องเกิดช่องสัญญาณที่ 1 ร่วมกับช่องสัญญาณที่ 2 เสมอจึงจะเกิดสัญญาณกระตุ้น T cell อย่างสมบูรณ์แบบ เมื่อการนำเสนอ antigen ให้กับ T cell เกิดสมบูรณ์แล้ว T cell receptor ก็ส่งสัญญาณ (signal transduction) ผ่านเข้าไปในนิวเคลียสของ T cell เอง กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ DNA transcription ของ T cell และเกิดผลต่างๆ ตามมา เช่น หลั่ง cytokine และการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ T cell โดยเฉพาะ T cell type1 (Th1 และ Tc1) พบว่า T cell type1 ที่อยู่ในชั้นหนังกำพร้าจะเป็น Tc1 ส่วนในชั้นหนังแท้จะเป็น Th1 เป็นส่วนใหญ่ เมื่อ Th1 cell ที่ถูกกระตุ้น และเพิ่มจำนวนขึ้นจะมีการหลั่ง type1 cytokine เช่น IFN- γ , TNF- α และหลั่ง pro-inflammatory cytokines และ chemokines อื่นๆ เช่น TGF- α , IL-6, IL-8 ดึงเซลล์เม็ดเลือดขาวต่างๆ ออกมาจากเส้นเลือด และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในผิวหนัง เช่น ทำให้เกิดการอักเสบและมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดบริเวณผิวหนังที่เกิดโรค ซึ่งจะทำให้ทำให้เซลล์หลอดเลือดแสดงออกของ adhesion molecules ต่างๆ เช่น ICAM-1, VCAM-1 VEGF ก่อให้เกิดการแบ่งตัวของผนังหลอดเลือด (angiogenesis) ในขณะเดียวกันนั้น cytokines บางชนิด เช่น IL-1, IL-6, IL-8, TGF- α และ IFN- γ ก็ยังมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเซลล์ผิวหนังให้แบ่งตัวเพิ่มขึ้น (hyperproliferation) ทำให้เกิดการหนาตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์บริเวณรอยโรค [18]

สำหรับปัจจัยทางพันธุกรรมพบว่าอุบัติการณ์การเกิดโรคในฝาแฝด (concordance rate) ประเภทแฝดไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) จะสูงถึงร้อยละ 35-91 แต่ในฝาแฝดไข่คนละใบอุบัติการณ์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 12-30 ปัจจุบันพบว่าความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากยีนต่างๆ เพิ่มขึ้น เช่น Notch; Notch2 และ Notch4 โดยที่ความผิดปกติจากยีน Notch2 receptor เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ VEGF ซึ่งจะมีผลให้มีการสร้างเส้นเลือดใหม่เพิ่มมากขึ้นในบริเวณที่มีการอักเสบ หากมีการแสดงออกของยีน Notch4 มากเกินไปจะไปยับยั้ง endothelial cell มีรูปร่างที่ผิดปกติ [19] นอกจากนี้พบว่ามียีนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สำหรับในส่วนของ innate immunity นั้น พบว่ามียีน TNFAIP3, TNIP1, NFKBIA, REL, FBXL19, TYK2 และ NOS2

ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor-**κ**B และ interferon signaling โดยเฉพาะอย่างยิ่ง NLRP3 (NACHT leucine-rich repeat- and PYD-containing (NLRP) 3 protein) และ CARD8 (Caspase recruitment domain-containing protein) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันในส่วนของ innate immunity ซึ่งหากเกิดความบกพร่องจะนำไปสู่สภาวะการอักเสบเรื้อรัง และในส่วนของ adaptive immunity นั้น พบว่ามียีน HLA-C, IL12B, IL23R, IL23A, TRAF3IP2 และ ERAP1CD8 ซึ่งจะไปมีบทบาทโดยตรงต่อ T lymphocytes และ interleukin 23 (IL-23). [20, 21]

ยาเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน มีรายงานการวิจัยพบว่า ยาบางชนิดมีบทบาทในการกระตุ้นการเกิดโรค เช่น Lithium, gold salts, beta blockers และ antimalarials และนอกจากนี้พบว่ายาในกลุ่ม adrenergic antagonists, interferon, gemfibrozil, iodine, digoxin และ chlonidine ทำให้ผู้ป่วยมีอาการกำเริบมากขึ้น [22]

การติดเชื้อ streptococcal มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน [23] ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีการแสดงออกของ HLA-Cw6, -B57, หรือ -B13 ในระดับสูง ซึ่งเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีการติดเชื้อ streptococcal [24] นอกจากนี้ พบว่าเมื่อมีการติดเชื้อ streptococcal ระบบภูมิคุ้มกันจะมีการสร้าง IL-17 และกระบวนการทำงานของ epidermal cell [25] โดยมี Ezrin, maspin, peroxiredoxin 2, และ heat shock protein 27 เป็นโปรตีนเป้าหมายในเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ตอบสนองในสภาวะที่มีการติดเชื้อ streptococcal [26]

2.5 แนวทางการรักษาโรคสะเก็ดเงิน

เนื่องจากโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด การรักษาจึงต้องรักษาตามอาการของผู้ป่วย และจำเป็นที่จะต้องมีการผสมผสานหลายวิธีเข้าด้วยกันสลับปรับเปลี่ยนไปตามอาการของผู้ป่วย ยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมีกลไกการออกฤทธิ์หลักๆคือ ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ ยับยั้งการอักเสบ และทำให้พัฒนาการของเซลล์กลับสู่ภาวะปกติ การรักษาในปัจจุบันมีด้วยกัน 4 วิธี ดังนี้

1. Topical therapy เป็นการรักษาเฉพาะที่ซึ่งยาในกลุ่มนี้จะเป็นยาทา ซึ่งได้แก่ Vitamin D3 analogues, calcipotriol, corticosteroids, dithranol และ retinoids

- กลไกการออกฤทธิ์คือ ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ และลดการอักเสบ
- ผลข้างเคียงคือ มีอาการคัน และสำหรับยาในกลุ่ม steroid นั้นจะไปมีผลลดการทำงานของต่อมหมวกไต

2. Systemic therapy เป็นการรักษาโดยการใช้ยาซึ่งจะออกฤทธิ์ไปทั่วทั้งร่างกาย ซึ่งยาในกลุ่มนี้นำมาใช้สำหรับผู้ป่วยที่มีการรุนแรงมาก ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ methotrexate และ cyclosporine

- กลไกการออกฤทธิ์ของ Methotrexate คือ ไปยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase (เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสร้างเบส) ยับยั้งกระบวนการสร้าง DNA ซึ่งจะส่งผลทำให้ลดการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ และต้านการอักเสบ

- ผลข้างเคียงคือ ทำให้ผู้ป่วยเกิดสภาวะตับแข็ง กตการทำงานของไขกระดูก และทำให้มีระดับของไตรกลีเซอไรด์ที่สูงขึ้น

3. Phototherapy เป็นการรักษาโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เช่น UV-B, UV-A ร่วมกับ Psoralen (PUVA) [27] และ excimer laser

- กลไกการออกฤทธิ์โดยการรักษาด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) คือ มีผลทำให้จำนวนของ T cell ลดลงโดยเฉพาะที่ชั้นหนังกำพร้า โดยการเหนี่ยวนำให้ T cell ตายแบบ apoptosis ปัจจุบันพบว่า เป็นวิธีที่ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพแต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้

4. Biological drug เป็นยาที่ออกฤทธิ์ต้าน Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) และออกฤทธิ์โดยตรงต่อ T cell ซึ่งปัจจุบันถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินเช่น ยา Denilukin diftiox, Efalizumab, Alefacept, Ustekinumab และ Etanercept ซึ่งได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) ซึ่งอยู่ในขั้นทดลองทางคลินิก [28] ซึ่งยาในกลุ่มดังกล่าวยังมีรายงานถึงผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน เช่น ผิวหนังระคายเคือง เกิดภาวะ hypercalcemia คลื่นไส้ อาเจียน ทำให้ตับแข็ง มีผลต่อไต (nephrotoxicity) เซลล์เม็ดเลือดต่ำกว่าปกติ (cytopenia) กระตุ้นให้เกิดโรค multiple sclerosis [29] และเมื่อหยุดใช้ยาจะส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการที่รุนแรงมากขึ้นกว่าเดิม แสดงให้เห็นว่าการรักษาโรคสะเก็ดเงินในปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ประกอบกับผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นมากมาย ดังนั้นสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่จะสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน โดยจากการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรในการต้านโรคสะเก็ดเงินนั้น มีรายงานการค้นคว้าวิจัยเพื่อคัดกรองสมุนไพรทั้งหมด 11 ชนิด ในการต้านโรคสะเก็ดเงิน โดยใช้เซลล์ HaCaT เป็นโมเดลในการศึกษา พบว่ามีเพียงสารสกัดน้อยหน่า ข่าและขมิ้น ที่มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT [10] โดยพบว่าสารสกัดน้อยหน่า ข่าและขมิ้น มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ NF- κ B ซึ่งเป็น biomarker สำคัญของโรคสะเก็ดเงิน [30] นอกจากนี้ สารสกัดน้อยหน่ามีฤทธิ์ในเพิ่มการแสดงออกของ caspase 9 เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis [31] และเมื่อปี 2012 มีรายงานการวิจัยของ Vijayalakshmi และคณะ พบว่าสารสกัดเควอซิทินจากเหง้าของ *Smilax china Linn.* สามารถนำมาใช้ในการต้านโรคสะเก็ดเงินได้ ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรกสำหรับการนำสารสกัดเควอซิทินมาใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน [11]

2.6 น้อยหน่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Annona squamosa* L.

ชื่อวงศ์ : Annonaceae

ชื่ออังกฤษ : Sugar apple, Sweet sop, Custard apple

ชื่อท้องถิ่น : เตียบ น้อยหน่ มะนอหน่ มะแน่ มะอ้อจ้ำ มะโอจ้ำ ลาหนั่ง หน่อเกลี๊าะแซ หมักเขียบ

สรรพคุณ

เป็นพืชสมุนไพรดั้งเดิมของไทยสามารถนำใบสดและเมล็ดน้อยหน่ามาใช้ในการฆ่าเหา รักษาโรคหิด กลาก และเกลื้อน [32] นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารประกอบที่สำคัญที่พบในใบน้อยหน่า เช่น 4-(2-nitroethyl)-1-((6-O-β-D-xylopyranosyl-β-Dglucopyranosyl)-oxy)benzene, Anonaine, Benzyltetrahydro-isoquinoline, Borneol, Camphene, Camphor, car-3-ene, Carvone, β-Caryophyllene, Eugenol, Farnesol, Geraniol, 16-Hentriacontanone, Hexacontanol, Higenamine, Isocorydine, Limonine, Linalool, Linalool acetate, Menthone, Methylantranilate, Methylsalicylate, Methylheptenone, p-(hydroxybenzyl)-6,7-(2-hydroxy,4-hydro)isoquinoline, n-Octacosanol, α-Pinene, β-Pinene, Rutin, Stigmasterol, β-Sitosterol, Thymol และ n-Triacontanol ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [33] และมีรายงานการศึกษาพบว่าน้อยหน่ามีคุณสมบัติในการต้านเชื้อมาลาเรีย ป้องกันโรคเบาหวานโดยการลดระดับน้ำตาลในเลือด รักษาภาวะตับถูกทำลายโดยการลดระดับเอนไซม์ AST, ALT และ ALP สามารถใช้เป็นยาฆ่าพยาธิ ด้านการอักเสบ ด้านไวรัส HIV-1 และยังสามารถต้านมะเร็งได้อีกด้วย [34]



ภาพที่ 2.1 ใบน้อยหน่า (*Annona squamosa*, leaf)

2.7 ข่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Alpinia galanga* (L.) Willd.

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

ชื่ออังกฤษ : Galanga

ชื่อท้องถิ่น : ข่าหยวก ข่าหลวง กฏุกโรหิณี

สรรพคุณ

สารเคมีที่พบในข่าประกอบด้วยสารประกอบสำคัญ 12 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย methyleugenol, p-coumaryl diacetate, 1'-acetoxychavicol acetate, 1'-acetoxyeugenol acetate, trans-p-acetoxycinnamyl alcohol, trans-3,4-dimethoxycinnamyl alcohol, p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxycinnamaldehyde, trans-p-coumaryl alcohol, galangin, trans-p-coumaric acid และ galanganol [35] นอกจากนี้ข่ายังคงมีส่วนของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งประกอบด้วย monoterene-2-terpineol, terpenen 4 - ol, cineole, camphor, linalool และ eugenol ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นยาแก้ท้องขึ้น ท้องอืด ท้องเฟ้อ ขับลม อาหารเป็นพิษ ลมพิษ กลากเกลื่อน สภาวะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา [36] มีรายงานการศึกษาพบว่าข่ามีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ลดระดับน้ำตาล และไขมันในเลือด ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส HIV-1, Cytomegalovirus (CMV) และสามารถต่อต้านมะเร็งบางชนิดเช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม [37]



ภาพที่ 2.2 เหง้าข่า (*Alpinia galanga*, rhizome)

2.8 ขมิ้น

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma longa* L.

ชื่อสามัญ : Turmeric

วงศ์ : Zingiberaceae

ชื่ออื่น : ขมิ้น ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขี้มัน หมิ้น

สรรพคุณ :

สำหรับใช้รักษาภายใน ขมิ้นสามารถใช้ในการรักษาท้องอืด ท้องร่วง โรคกระเพาะ สำหรับการใช้เป็นยาภายนอก ขมิ้นสามารถใช้ในการรักษาผื่นคัน โรคผิวหนัง พุพอง ยารักษาชันนะตุ และหนังศีรษะเป็นเม็ดผื่นคัน [36] สารเคมีที่พบในขมิ้นประกอบด้วยสารประกอบสำคัญดังนี้ curcumin, demethoxycurcumin (curcumin II), bisdemethoxy curcumin (curcumin III) และ cyclocurcumin มีรายงานการศึกษาพบว่า ขมิ้นมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัส HIV-1 และยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง [38]



ภาพที่ 2.3 เหง้าขมิ้น (*Curcuma longa*, rhizome)

2.9 เควอซิทิน (quercetin)

เควอซิทินเป็นสารพฤกษเคมีที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด พบมากในหัวหอม หอมแดง และพืชตระกูลถั่ว จากการศึกษาวิจัยพบว่า เควอซิทินมีบทบาทในการทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ เควอซิทินยังมีบทบาทในการต้านมะเร็งชนิดต่างๆเช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ และมะเร็งปอด [39] ในปี ค.ศ 2012 มีผลการศึกษาโดย Vijayalakshmi และคณะ พบว่าสารสกัดเควอซิทินจากเหง้าของ *Smilax china Linn.* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ในโรคมะเร็งได้ [11]

2.10 ความสำคัญของโปรตีนโอมิกส์

เนื่องจากภายหลังการถอดรหัสการถอดรหัสพันธุกรรมของมนุษย์เสร็จสิ้น แต่ก็ยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการทำงานของยีนต่างๆภายในเซลล์ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากกระบวนการทางชีววิทยาของเซลล์ โดยเมื่อยีนถอดรหัสเป็น mRNA ผ่านกระบวนการ transcription และ translation ได้เป็นโปรตีน มีรายงานพบว่า แท้ที่จริงแล้วในกระบวนการดังกล่าวยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โปรตีนรวมถึงการมี alternative splicing ของ mRNA และการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนภายหลังการแปลรหัส อีกทั้งยังไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่าง RNA และโปรตีนที่สร้างขึ้นมา โดยพบว่าหนึ่งยีนสามารถสร้างได้หลายโปรตีน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความซับซ้อนของเซลล์ และด้วยเหตุผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การศึกษากลไกการทำงานของเซลล์นั้นไม่สามารถอาศัยข้อมูลทางด้านจีโนมิกส์เพียงอย่างเดียว จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาด้านโปรตีนโอมิกส์ควบคู่ไปด้วย และเนื่องจากโปรตีนซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการทำงานของเซลล์ต่างๆ ดังนั้นเทคนิคโปรตีนโอมิกส์จึงเป็นเทคโนโลยีที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานของเซลล์ ซึ่งเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางด้านโปรตีนโอมิกส์มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาดูการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย เพื่อใช้ในการคัดกรองเป้าหมายใหม่ๆ และนำไปสู่การรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็งได้ [40]

2.11 ความก้าวหน้าในการศึกษาด้านโปรตีนโอมิกส์ของโรคมะเร็ง

โดยจากการศึกษาของ Piruzian และคณะในปี 2010 โดยนำเซลล์เคอราติโนไซต์จากบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคมะเร็งมาวิเคราะห์โปรตีนที่แสดงออกเทียบกับเซลล์ผิวหนังปกติ พบว่ามีโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกัน ซึ่งประกอบด้วย Keratin 14, 16, 17, SCCA2/SCCA1 fusion protein isoform 2, squamous cell carcinoma antigen, Enolase 1, Superoxide dismutase [Mn], Galectin-7 ส่วนโปรตีน S100 calcium-binding protein A9 และ S100 calcium-binding protein A7 (Psoriasis) เป็นโปรตีนที่สามารถพบได้เฉพาะรอยโรคเท่านั้น [41] ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาค้นคว้าจาก Ting Chang และคณะ พบว่า Keratin 17 ซึ่งเป็น intermediate filament ที่สามารถพบได้ในผิวหนังของคนปกติ แต่จะพบมากในรอยโรคของผู้ป่วยโรคมะเร็ง ดังนั้น Keratin 17 จึงสามารถนำมาใช้เป็นโปรตีนเป้าหมาย เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง และจากการศึกษาโดยใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) พบว่าเมื่อลดการแสดงออกของ Keratin 17 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน จะสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์

เคอราติโนไซต์ และเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้อีกด้วย [42] นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณรอยโรค มีการแสดงออกของ Glutathione S transferase 1 (GSTP1) และ Peroxiredoxin 2 (PRDX2) เพิ่มสูงมากขึ้น ซึ่งทั้ง 2 โปรตีน มีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบสมดุล redox system (reduction-oxidation) ซึ่งเป็นกลไกการตอบสนองเพื่อเข้ามาชดเชย และลดภาวะ reactive oxygen species stress (ROS) สำหรับ stratifin (SFN) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในรอยโรคนั้น พบว่ามีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ และป้องกันเซลล์กลายเป็นมะเร็ง โดยยับยั้งไม่ให้เซลล์ที่เกิดความเสียหายของ DNA จากโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งอยู่ในระยะ G2 ผ่านเข้าสู่ระยะ M ของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) จึงเป็นกลไกป้องกันการกลายพันธุ์ (mutation) นำไปสู่การเป็นมะเร็งต่อไป [43]



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

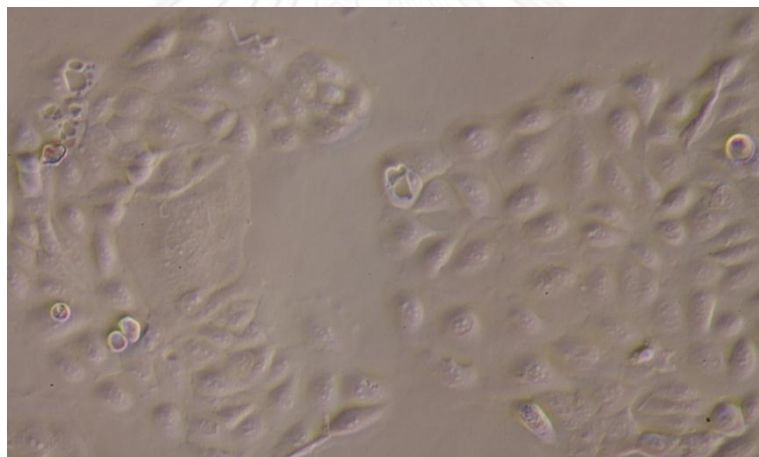
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

3.1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte cell line, HaCaT cells) ซึ่งมาจาก Heidelberg ประเทศสหพันธ์ สาธารณรัฐเยอรมนี เพาะเลี้ยงอยู่ใน Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM/High glucose) (Hyclone) ที่มีส่วนผสมของ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) fetal bovine serum (Hyclone) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/ml (Hyclone) โดยนำเซลล์มาบ่มเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.1 เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงมนุษย์ (Human Keratinocytes cell line, HaCaT cells)
ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Invert Microscopy, 40X)

3.1.2 ตัวอย่างของสมุนไพรไทย

สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยองจำนวน 2 ชนิด ดังนี้

- ข้า ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ เหง้า Herbarium number: 013397 (BCU)

- ขมิ้นชัน ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ เหง้า Herbarium number: 013396 (BCU)

และน้อยหน่า ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ ใบ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสวนของคุณ วาลูกา พลายนาม บ้านเลขที่ 41 หมู่ 8 ต.ดอนทราย อ.โพธาราม จ.ราชบุรี Herbarium number: 013509 (BCU) ซึ่งทำการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษาวิจัยโดย ปริญญา นุช กลิ่นรัตน์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และดำเนินการเก็บตัวอย่างของสมุนไพร

ไทยในพิพิธภัณฑ์พืช (Herbarium) ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์และหน่วยปฏิบัติการวิจัย
พรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยสามารถแบ่งได้เป็น 5 หมวดคือ

3.2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เค
อราติโนไซต์

- Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose HyClone, สหรัฐอเมริกา
(DMEM: with 4 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose
without Sodium Pyruvate)
- Penicillin-Streptomycin Solution HyClone, สหรัฐอเมริกา
(10,000 units/ml Penicillin/10,000 µg/ml Streptomycin)
- Fetal Bovine Serum (FBS) Sigma Aldrich,
สหรัฐอเมริกา
- EDTA-Trypsin 0.25% (1X) HyClone, สหรัฐอเมริกา
- Phosphate Buffered Saline (PBS: without calcium
without magnesium) HyClone, สหรัฐอเมริกา
- Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Merck, เยอรมนี
- Recombinant Human TNF- α PeproTech, สหรัฐอเมริกา
- 3-(4, 5-dimethylthianisol-2-yl)-2,5-diphenyl-
2H-tetrazolium bromide (MTT) Amresco, สหรัฐอเมริกา
- Trypan Blue Stain 0.4% Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

3.2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและเตรียมสมุนไพรไทย

- Petroleum ether Merck, เยอรมนี
- Dichloromethane Merck, เยอรมนี
- Ethanol Merck, เยอรมนี

3.2.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทย

- quercetin Sigma Aldrich,
สหรัฐอเมริกา
- Gallic acid TCI, ญี่ปุ่น
- Ascorbic acid Calbiochem,
สหรัฐอเมริกา
- DPPH Sigma Aldrich,
สหรัฐอเมริกา
- Folin-Ciocalteu reagent Sigma Aldrich,

- ABTS reagent	สหรัฐอเมริกา Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
- Potassium persulphate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
3.2.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-GE	
- 30% Acrylamide and Bis-Acrylamide Solutions	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine TEMED	Omnipur, เยอรมนี
- Sodium Lauryl Sulphate (SDS)	Bio basic inc, แคนาดา
- Ammonium persulfate	Omnipur, เยอรมนี
- Dithiothreitol (DTT)	Omnipur, เยอรมนี
- 85% Phosphoric acid	Merck, เยอรมนี
- Tris	Vivantis, Malaysia
- Bovine Serum Albumin	VWR, สหรัฐอเมริกา
- Glycine	usb, สหรัฐอเมริกา
- Glycerol	Bio basic inc, แคนาดา
- Iodoacetamide	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
- Immobiline drystrip, pH 3-10	GE Healthcare,
- IPG-buffer, pH 3-10	GE Healthcare,
- Ammonium sulfate ACS, ISO	Merck, เยอรมนี
- Acetic acid glacial 100% anhydrous GR ACS, ISO	Merck, เยอรมนี
- Methanol	Merck, เยอรมนี
- Protein ladder (broad range)	Thermoscientific, สหรัฐอเมริกา
3.2.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry	
- Trypsin TPCK treated from bovine pancreases	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
- Formic acid	Merck, เยอรมนี
- Ammonium hydrogen carbonate	Merck, เยอรมนี
- Acetonitrile, HPLC grade	Merck, เยอรมนี
- HPLC water	Merck, เยอรมนี

3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

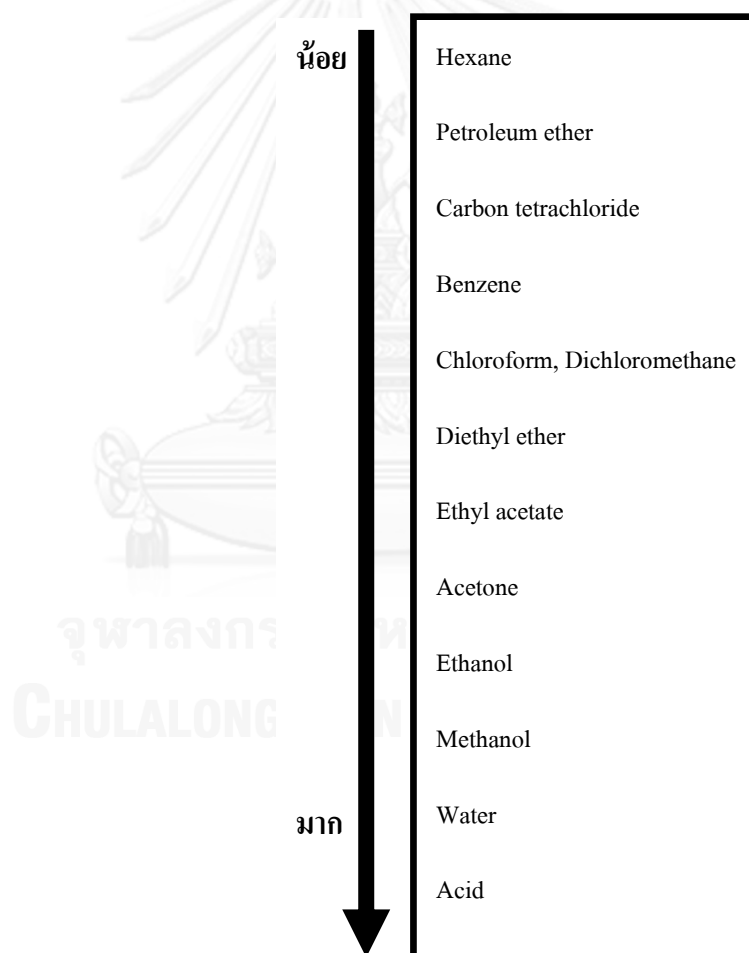
- | | |
|---|--|
| - Gel Electrophoresis Apparatus | BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา |
| - Electrophoresis power supply | GE Healthcare, อังกฤษ |
| - Ettan IPGphor 3 | GE Healthcare, อังกฤษ |
| - Inverted microscope | Olympus Optical, ญี่ปุ่น |
| - Light microscope | Olympus Optical, ญี่ปุ่น |
| - Laminar Flow Cabinet | E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส |
| - Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs) | ThermoElectron-
Corporation, สหรัฐอเมริกา |
| - MiVac Quattro concentrator | GeneVac®, สหรัฐอเมริกา |
| - Vortex Mixer (FINE VORTEX) | FINEPCR, เกาหลีใต้ |
| - 6 well cell culture plate flat bottom with lid | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| - 96 well cell culture plate flat bottom with lid | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| - Cell Culture Flask (25, 75 cm) | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| - Centrifuge tube (15, 50 ml) | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| - Corning® square bioassay dishes | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| - Disposable Serological pipette (5, 10 ml) | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| - Cryovial tube 2.0 ml | Nunc, เดนมาร์ก |
| - Auto pipette | GILSON, ฝรั่งเศส |
| - Multichannel pipette | GILSON, ฝรั่งเศส |
| - CO ₂ incubator | Sheldon Manufacturing,
สหรัฐอเมริกา |
| - Hemocytometer | Hausser Scientific,
สหรัฐอเมริกา |
| - Incubator | Memmert, เยอรมนี |
| - Water Bath | Memmert, เยอรมนี |
| - 20 °C Freezer | Sanyo Electric, ญี่ปุ่น |
| - 80 °C ULT Deep Freezer | IlShin Lab, เกาหลีใต้ |
| - 4 °C Refrigerator | Sharp, ญี่ปุ่น |
| - Liquid Nitrogen Tank | Taylor-Wharton,
สหรัฐอเมริกา |
| - Sonicator | Soniclean, สหรัฐอเมริกา |

3.3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.3.1 การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายโดย Soxhlet apparatus

ตัวทำละลายที่จะนำมาใช้ในการสกัดสมุนไพรมีหลายชนิด ซึ่งแตกต่างกันไปตามคุณสมบัติต่างๆ แต่ในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกตัวทำละลายด้วยคุณสมบัติของขั้ว (polarity) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องเลือกตัวทำละลายให้ครอบคลุม โดยจะเลือกตัวทำละลายชนิดที่มีขั้วน้อย มีขั้วกลาง และมีขั้วมาก (ภาพที่ 3.2) เพื่อให้สามารถดึงสารที่มีฤทธิ์ออกมาได้มากที่สุด โดยในการสกัดครั้งนี้จะเลือกตัวทำละลาย 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย petroleum ether, dichloromethane และ ethanol

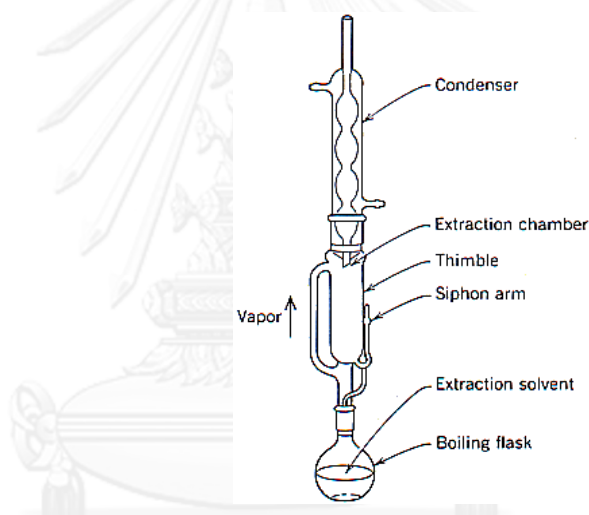
ชนิดของตัวทำละลายเรียงตามความเป็นขั้วน้อยไปถึงมาก



ภาพที่ 3.2 แสดงความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่างๆ

Soxhlet extraction

วิธีการสกัดสมุนไพรโดย Soxhlet apparatus ซึ่งเป็นเทคนิคในการสกัดสมุนไพรแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) เป็นการสกัดแบบเย็น โดยอาศัยหลักการของกาลักน้ำ (siphon) เมื่อให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายจนถึงจุดเดือด ตัวทำละลายจะระเหยไปสัมผัสกับ condenser ที่หล่อเย็นไว้ เกิดการควบแน่นกลับมาสัมผัสกับสารที่เราต้องการสกัด ซึ่งจะหมุนเวียนผ่านสารที่เราต้องการสกัดหลายๆครั้งเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดให้ได้ปริมาณสารสกัดที่มากเพียงพอ



ภาพที่ 3.3 แสดงถึงส่วนประกอบของเครื่องสกัด soxhlet apparatus [44]

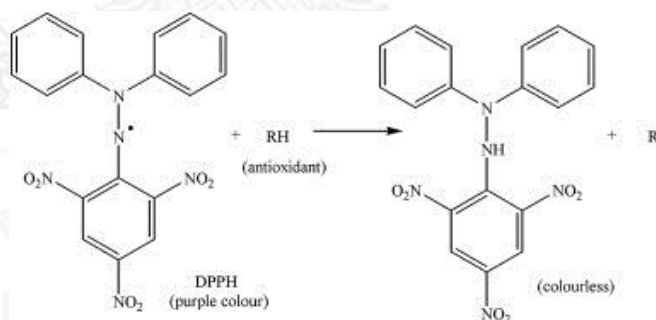
เริ่มต้นจากการทำความสะอาดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ด้วยการล้างน้ำประมาณ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปตากลมให้แห้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส ให้แห้งสนิทจนกว่าน้ำหนักจะคงที่เมื่อแห้งแล้วจึงนำมาบดให้ละเอียด ชั่งผงสมุนไพรหนัก 40 กรัม (อัตราส่วนระหว่างสมุนไพรบดแห้งกับตัวทำละลายคือ สมุนไพรบดแห้ง 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร) ใส่ใน cellulose extraction thimbles แล้วจึงนำไปใส่ใน thimble ของ soxhlet extractor เติมตัวทำละลายอันดับ 1 (petroleum ether) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร พร้อมกับเศษกระเบื้อง 3 ชิ้น ลงใน boiling flask จากนั้นจึงให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายจนถึงจุดเดือด ตัวทำละลายจะระเหยกลายเป็นไอลอยขึ้นไปปะทะกับ condenser ที่หล่อเย็นไว้ ซึ่งจะทำให้เกิดการควบแน่นกลับลงมาในผงสมุนไพร เมื่อมีปริมาณมากพอก็จะทำให้ตัวทำละลายไหลออกมาทาง siphon ซึ่งจะเกิดซ้ำๆหลายรอบจนกระทั่งตัวทำละลายที่ผ่าน siphon ใส ถือว่าเป็นการสิ้นสุดการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดนั้นๆ ซึ่งจะใช้เวลา

ประมาณ 7-8 ชั่วโมงโดยประมาณ ต่อจากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายลำดับที่ 2 (dichloromethane) และลำดับที่ 3 (ethanol) ตามลำดับ ซึ่งต้องรอนกระทั่งตัวทำละลายใส ไม่มีสีของสารสกัดนั้นออกมาอีก เมื่อสกัดเสร็จ จึงนำสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่อยู่ในตัวทำละลายไประเหยด้วยเครื่อง evaporator เพื่อกำจัดตัวทำละลายออกให้เหลือเฉพาะสารสกัดเท่านั้น นำสารสกัดหยาบมาชั่งน้ำหนักเพื่อเตรียมเป็น stock ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย dimethyl sulphoxide (DMSO) และกรองสารสกัดสมุนไพรมานำผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (ชนิดที่ทน DMSO) แบ่งใส่ microcentrifuge tube ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรรไทย

3.3.2.1 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรรไทยด้วยวิธี DPPH assay

อนุมูล DPPH หรือ 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระที่คงตัวมีสีม่วง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับสารที่ให้อิเล็กตรอน หรือสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) เมื่ออนุมูล DPPH รับอิเล็กตรอนมาแล้ว สารละลายสีม่วงจะมีสีจางลงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 3.4) [45] ด้วยหลักการดังกล่าว จึงสามารถนำอนุมูล DPPH มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรรไทยทั้ง 3 ชนิดได้ โดยจะใช้ L-ascorbic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานมาใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ scavenging activity



ภาพที่ 3.4 แสดงถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต้านออกซิเดชันอนุมูล DPPH [46]

เตรียมอนุมูล DPPH ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ตัวทำละลาย methanol (absolute) เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการเจือจางอนุมูล DPPH ด้วยตัวทำละลาย methanol ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.03 [47] จากนั้นจึงเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ใน methanol และเตรียมสารสกัดสมุนไพรรไทยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายมีดังนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

Reagent	Control (μL)	Positive control (μL)	Sample blank (μL)	Sample (μL)
สารสกัดสมุนไพรมะขาม	-	-	20	20
L-ascorbic acid	-	20	-	-
DPPH	180	180	-	180
Absolute methanol	20	-	180	-

หมายเหตุ จะต้องทำการทดสอบกับ DMSO ควบคุมด้วยทุกครั้ง (blank sample และ sample)

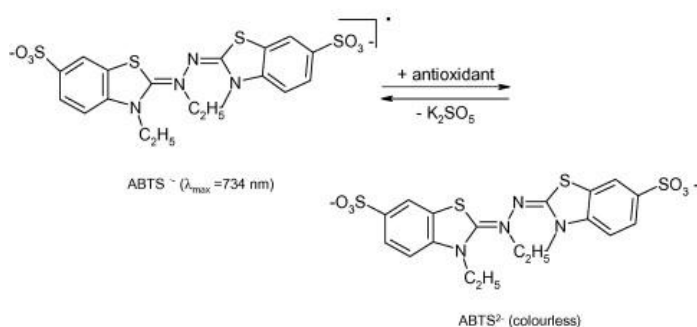
บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ scavenging activity และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรมะขาม (mg ascorbic acid/g sample) เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid โดยสูตรคำนวณดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ scavenging activity} = 100 \times \frac{[\text{Abs control} - (\text{Abs sample} - \text{Abs blank})]}{\text{Absorbance control}}$$

หากเปอร์เซ็นต์ scavenging activity [48] มากกว่า 50 จะต้องทำการเจือจางสมุนไพรมะขามที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาทำกราฟ log วิเคราะห์หาค่า IC_{50} ต่อไป

3.3.2.2 การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรมะขามด้วยวิธี ABTS^{•+} assay

การวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของอนุมูล ABTS^{•+} หรือ 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ซึ่งมีสีเขียวปนน้ำเงิน ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย ABTS กับ oxidizing agent เช่น โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) เกิดเป็นอนุมูล ABTS^{•+} ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะทำให้สีลดลง (ภาพที่ 3.5) ด้วยหลักการดังกล่าว จึงสามารถนำอนุมูล ABTS^{•+} มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรมะขามทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสามารถวัดได้ทั้งในส่วนที่ละลายในน้ำและไขมัน [45] โดยจะใช้ L-ascorbic acid เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการทำการกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ scavenging activity และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรมะขาม (mg ascorbic acid/g sample)



ภาพที่ 3.5 แสดงถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS^{•+} [49]

เตรียม อนุมูล ABTS^{•+} ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ 10 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลาร์ ในน้ำ 12.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูล ABTS^{•+} จากนั้นจึงนำไปเจือจางด้วย ethanol เพื่อให้มีค่า การดูดกลืนแสงที่ 0.7 ± 0.03 เตรียมสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ใน ethanol และเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมสารละลาย มีดังนี้

ตารางที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

Reagent	Control (μl)	Positive control (μl)	Sample blank (μl)	Sample (μl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	20	20
L-ascorbic acid	-	20	-	-
ABTS ^{•+} working	180	180	-	180
Absolute ethanol	20	-	180	-

หมายเหตุ จะต้องทำการทดสอบกับ DMSO ควบคู่ด้วยทุกครั้ง (blank sample และ sample)

บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ scavenging activity และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร (mg ascorbic acid/g sample) หากเปอร์เซ็นต์ scavenging activity มากกว่า 50 จะต้องทำการเจือจางสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาทำกราฟ log วิเคราะห์หาค่า IC_{50} ต่อไป

3.3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu assay

การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลิกด้วย Folin-ciocalteu assay อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารประกอบฟีนอลิกในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-ciocalteu ที่มีสีเหลืองในสถานะที่เป็นต่างให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งจะสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดจากปฏิกิริยาของไอออน Mo (VI) สีเหลือง เมื่อมีการรับอิเล็กตรอนจากสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น Mo (V) ซึ่งเป็นสีน้ำเงินดังสมการปฏิกิริยาต่อไปนี้ [50]



การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำได้โดยการนำมาเปรียบเทียบกับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน ซึ่งในการศึกษานี้จึงใช้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก โดยจะเตรียมที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0.7812 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสมุนไพร โดยเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ของ 0.1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย ethanol (80 %) โดยมีขั้นตอนการทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

ตารางที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu assay

Reagent	Blank	Standard (μl)	Blank sample (μl)	Sample (μl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	50	50
Gallic acid	-	50	-	-
Dw	50	-	50	-
Working Folin	50	50	-	50
0.1 M Na_2CO_3	50	50	50	50

หมายเหตุ จะต้องทำการทดสอบกับ DMSO ควบคู่ด้วยทุกครั้ง (blank sample และ sample)

บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ด้วยการเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (mg GAE/g sample)

3.3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay

การตรวจหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Aluminum chloride ($AlCl_3$) จับกับหมู่ ketone และ hydroxyl ของสารฟลาโวนอยด์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งหากสารสกัดสมุนไพรที่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์จะเกิดเป็นสีเหลือง โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร และนำไปเทียบค่าเชิงปริมาณกับกราฟมาตรฐานเคอเวอซิทิน (quercetin) โดยจะเตรียมที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0.7812 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะต้องเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ของ 1 โมลาร์ Aluminum chloride และเตรียมสารสกัดสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย ethanol (80%) โดยทำการทดสอบตามขั้นตอนดังนี้

ตารางที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการเตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay

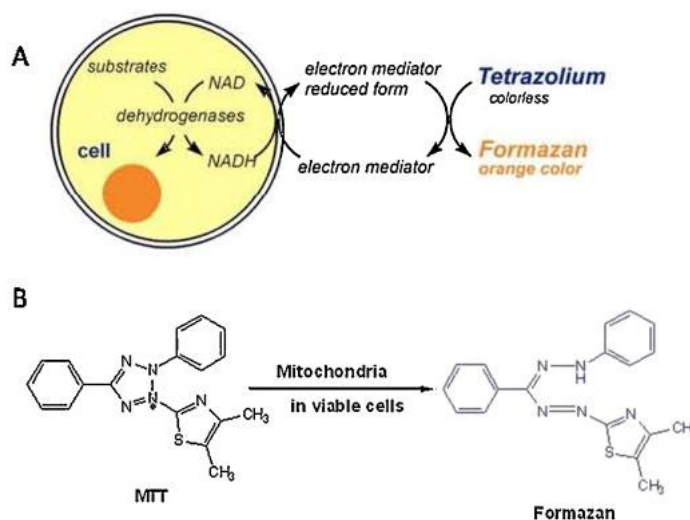
Reagent	Blank (μ l)	Standard (μ l)	Blank sample (μ l)	Sample (μ l)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	50	50
quercetin	-	50	-	-
10% $AlCl_3$	10	10	-	10
95% ethanol	150	150	150	150
1M sodium acetate	10	10	10	10
80% ethanol/Dw	50 (80% ethanol)	-	10 (Dw)	-

หมายเหตุ จะต้องทำการทดสอบกับ DMSO ควบคู่ด้วยทุกครั้ง (blank sample และ sample)

บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ด้วยการเทียบกับสารมาตรฐานเคอควิซีน (mg quercetin/g sample)

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค MTT assay

MTT assay เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (colorimetric assays) โดยสารสีเหลือง MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) ซึ่งจะถูก reduce โดยเอนไซม์ NADPH ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan ซึ่งมีสีม่วง (ภาพที่ 3.6) สามารถละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร [51]



ภาพที่ 3.6 แสดงถึงปฏิกิริยารีดักชันภายในเซลล์ (reduction reaction) ของเทคนิค MTT assay [52]

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสมุนไพรดังนี้ เตรียมสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25 และ 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเมื่อนำไปทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรจะถูกเจือจางลงไปอีก 10 เท่า ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้าย และเป็นความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดสมุนไพรจะไม่เกิน 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคำนวณได้จากการทดลองศึกษาความเป็นพิษของ DMSO ที่มีต่อเซลล์ HaCaT ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 0.0125 % ของ DMSO ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT โดย DMSO มีสภาพเป็นเพียงตัวทำละลายเท่านั้น (ภาคผนวก ก) โดยกำหนดให้ DMSO เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (positive control) และเซลล์ HaCaT ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (unstimulated) มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด เติมนสารละลาย MTT ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5) แล้วนำกลับเข้าไปในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) จากนั้นจึงวิเคราะห์ความแตกต่างของการมีชีวิตรอดของเซลล์ ด้วยหลักการทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (version 17) pair sample T-test กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกรณีที่เซลล์ตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต้องคำนวณค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เซลล์ตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยที่สูตรคำนวณ % cell viability ดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{Treated cell} - \text{blank}) \times 100}{(\text{Untreated cell} - \text{blank})}$$

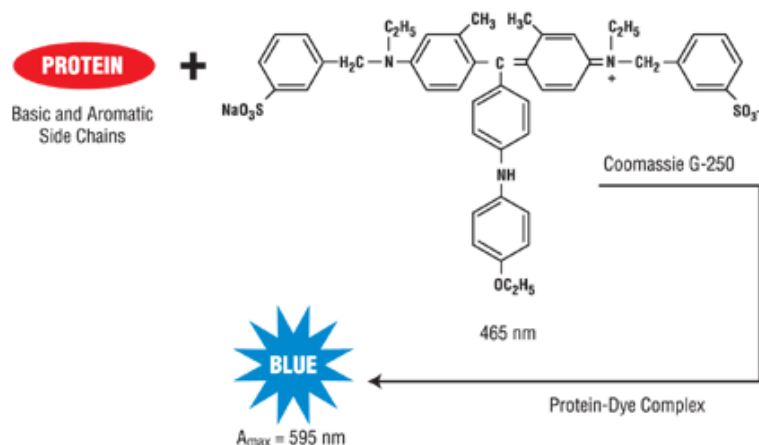
3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์

3.3.4.1 การสกัดโปรตีนจากเซลล์ HaCaT

ชุดเซลล์จาก TC treated, square (5×10^6 cell/dish) ซึ่งผ่านการกระตุ้นด้วย TNF- α เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรตามลำดับ นำมาปั่นล้างด้วย cold PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นให้ตกตะกอนที่ 3,500 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงใช้กระดาษกรองซับด้านในของ centrifuge tube ให้แห้ง จากนั้นจึงเติม lysis solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันประมาณ 3-5 นาที ด้วยเครื่อง vortex จากนั้นจึงดูด lysate นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 100,000 g (44,000 rpm) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ด้วยเครื่อง ultracentrifuge จากนั้นจึงเก็บ supernatant ใส่ microcentrifuge tube นำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย วิธี Bradford assay

3.3.4.2 Bradford assay

เทคนิคการวัดโปรตีนด้วย Bradford อาศัยหลักการความสมดุลระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 และการจับกันระหว่าง Coomassie Brilliant Blue G-250 กับโปรตีนแบบจำเพาะ



ภาพที่ 3.7 แสดงปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับ Coomassie Blue G-250 [53]

Coomassie Brilliant Blue G-250 ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดจะแสดงคุณสมบัติเป็นสีแดงออกมา แต่หากทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน โดยปริมาณความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับปริมาณของกรดอะมิโน ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (ภาพที่ 3.7)

การวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

ดูดโปรตีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ lysis solution ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อทำการเจือจางโปรตีน จากนั้นจึงดูดมาปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในจาน 96 หลุม โดยทำซ้ำ 3 จากนั้นจึงเติม bradford working buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) ซึ่งจะใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และคูณ dilution factor จะได้ความเข้มข้นของโปรตีน แบ่งใส่ microcentrifuge tube ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

3.3.4.3 แยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2-dimensional gel electrophoresis (2D-GE)

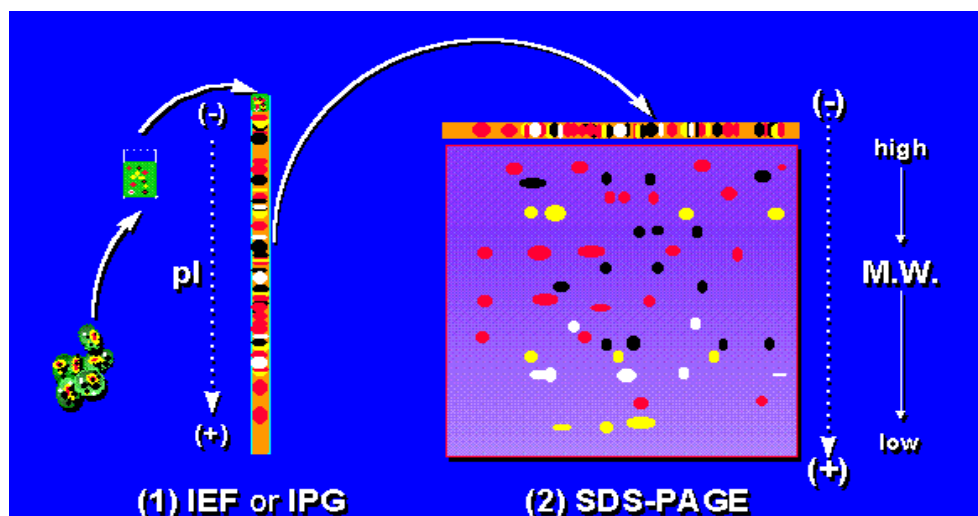
การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-GE อาศัยการแยกโปรตีนด้วย 2 คุณสมบัติคือ แยกโดยอาศัยความแตกต่างของ pI (IEF) และความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล (Mw) ของโปรตีน (SDS-PAGE)

1. Isoelectric Focusing (IEF)

เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนโดยเน้นประจุเป็นกลางในสนามไฟฟ้า (IEF) ซึ่งโดยทั่วไปเรียกว่า electrofocusing ซึ่งเป็นวิธีการแยกโมเลกุลที่มีประจุแตกต่างกัน สำหรับการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้จะต้องให้โปรตีนอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า และใช้ตัวค้ำจุนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย (inert support) โดยอาศัยการแปรผันความแตกต่างของค่า pH ทำให้บริเวณขั้วบวก (anode) มีค่า pH ต่ำกว่าบริเวณขั้วลบ (cathode) และช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่เลือกใช้ต้องรวมถึงค่า pH ที่โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (isoelectric point, pI) ของโปรตีนที่เราสนใจด้วย ดังนั้นโปรตีนที่มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI จะมีประจุเป็นบวก และเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ เมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ไปจะทำให้ค่า pH ลดลงจนกระทั่งค่า pH เท่ากับค่า pI ทำให้มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ และโปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่ ในทางตรงกันข้ามสำหรับโปรตีนที่มีค่า pH สูงกว่าค่า pI โปรตีนจะมีประจุเป็นลบ และเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ด้วยหลักการของ IEF โปรตีนแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่เป็นแถบเข้าขั้วไฟฟ้า และไปหยุดที่ค่า pH เท่ากับค่า pI (ภาพที่ 3.8.1)

2. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

โดยหลักการของ SDS-PAGE ซึ่ง SDS มีคุณสมบัติเป็น detergent ที่มีประจุลบไปเกาะกับโปรตีน ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ และนอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพอีกด้วย โดยเปลี่ยนสภาพจากทรงกลม (globular) ไปอยู่ในสภาพที่เหยียดตรง (linear) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวในขั้นตอนของ SDS-PAGE จึงทำให้โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย (complex) ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย (subunit) ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัวในกรณีนี้ จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ในอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากก็จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า ในขณะที่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า (ภาพที่ 3.8.2)



ภาพที่ 3.8 แสดงหลักการของ 2-Dimensional Gel Electrophoresis (2D-GE) [54]

First dimension (Isoelectric Focusing, IEF)

แยกโปรตีนด้วย Isoelectric focusing ด้วย IPG strip pH 3-10 โดยเจือจางตัวอย่างโปรตีนที่สกัดด้วย rehydration buffer ให้ได้โปรตีนที่มีความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมตัวอย่างโปรตีนลง strip holder ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (strip 13 เซนติเมตร) วาง IPG strip คว่ำลงไปทับกับโปรตีนระมัดระวังอย่าให้เกิดฟอง จากนั้นจึงใช้ dry strip cover fluid ปิดทับเพื่อป้องกันการแห้งของ IPG strip ทำการ rehydration gel เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงแยกโปรตีนด้วยเครื่อง Ettan IPGphor ด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 ที่ความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 2 ที่ความต่างศักย์ 3,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 3 ความต่างศักย์ 3,500 โวลต์ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีความสำคัญในเรื่องของ resolution บนแผ่นเจล จึงตั้งค่าเป็นแบบไล่ระดับ (gradient) จนกระทั่งถึง 14,000 Volt-hours และในขั้นตอนสุดท้าย ที่ความต่างศักย์ 3,500 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที โดยหลักการของ IEF โปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อค่า pH เท่ากับค่า pI ของโปรตีนแต่ละชนิด นำ IPG strip ที่แยกด้วย IEF ในมิติที่หนึ่งไปแยกต่อในมิติที่สองด้วย SDS-PAGE

Second dimension (การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุลด้วย SDS-PAGE)

นำ IPG strip ที่ผ่านการแยกในมิติแรกมาทำการ equilibrate ด้วย equilibration buffer ที่มีส่วนผสมของ dithiothreitol (10 mg/mL) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายพันธะ disulfide จากนั้นจึงนำมา equilibrate ต่อด้วย equilibration buffer ที่มีส่วนผสมของ iodoacetamide (25 mg/mL) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อป้องกันการ Re-bound กลับมาสร้างพันธะ disulfide อีกครั้ง จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำ Milli Q และตามด้วย sds-electrophoresis buffer ก่อนนำไปวางด้านบนของ 12.5 % SDS-PAGE พร้อมกับ protein ladder ปิดทับหน้าเจลด้วย agarose sealing แยกขนาดของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ด้วยความต่างศักย์ 300 โวลต์ 16 mA/gel เพื่อให้โปรตีนจาก IPG strip เคลื่อนที่เข้าสู่ SDS-PAGE จากนั้นจึงปรับเป็น 24 mA/gel จนกระทั่งโปรตีนเคลื่อนที่ไปถึง marker ที่กำหนดไว้ จึงนำเจลไปตรึงสภาพ

ด้วย fixative solution อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับการเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นจึงล้างด้วยน้ำ Milli Q เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเขย่าเบาๆ (ล้าง 3 ครั้ง) เหนือออกแล้วแทนที่ด้วย Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งเป็นสีย้อม โดยจะย้อมข้ามคืน (over night) 16-18 ชั่วโมง โดยประมาณ พร้อมเขย่าเบาๆ และนำมาล้างด้วยน้ำ Milli Q ที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแผ่นเจลใส และนำแผ่นเจลมาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบต่อไป

3.3.4.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างของจุดโปรตีน

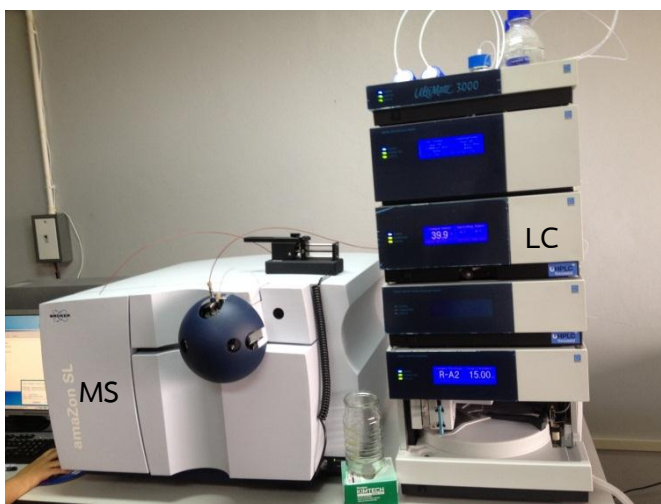
ทำการถ่ายภาพเจลที่ความละเอียด 300 dpi, 16 บิต ด้วยโปรแกรม SilverFast จากนั้นจึงนำภาพมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum เวอร์ชัน 7 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนระหว่างกลุ่มทดสอบ และกลุ่มควบคุมด้วยสถิติ ANOVA ซึ่งจุดของโปรตีนที่สนใจจะต้องมีค่า $p < 0.05$

3.3.4.5 การย่อยภายในเจล

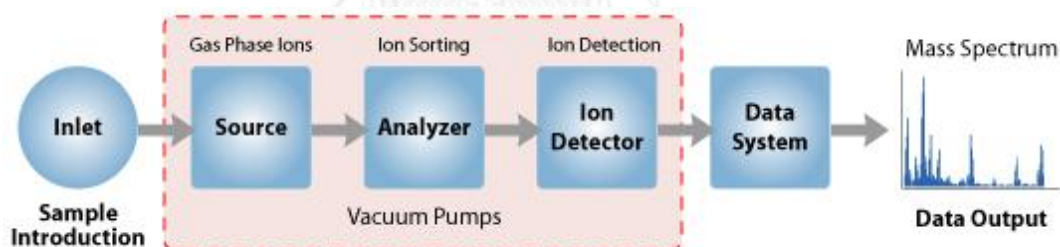
อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งมีตำแหน่งตัดที่จำเพาะคือ หมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีตำแหน่งตัดสำหรับเอนไซม์ทริปซินที่แตกต่างกันทำให้ได้ชิ้นส่วนของสายเปปไทด์ที่มีจำนวน และขนาดที่แตกต่างกันไป โดยตัดจุดโปรตีนจากแผ่นเจลที่แตกต่างมาทำการย่อยโปรตีนในแผ่นเจลโดยใช้ปลายทิปปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตัดจุดโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นจึงนำจุดโปรตีนมาล้างด้วย 50 % ACN ใน 25 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ดูดทิ้ง ทำซ้ำจนกระทั่งเจลใส จากนั้นจึงเติม 100 % ACN ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่า 10 นาที ดูดทิ้ง จากนั้นจึงเติม 25 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่า 10 นาที ดูดทิ้ง เติม 100 % ACN ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่า 10 นาที อีกครั้ง ดูดทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเจลแห้งสนิท เติม 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์ทริปซินปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อให้เจลซึมซับเอนไซม์ทริปซินเข้าไป นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ดูดเอนไซม์ทริปซินส่วนเกินออก จากนั้นจึงเติม 25 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืนเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยประมาณ เพื่อให้เอนไซม์ทริปซินตัดเปปไทด์ได้อย่างสมบูรณ์ ดูดเปปไทด์ที่ถูกย่อยออกมาในสารละลาย 25 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ใส่ microcentrifuge tube เก็บไว้ ทำการสกัดเปปไทด์อีกครั้งจากเจล โดยใช้ 5% formic acid ใน 50% ACN (v/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวางใน ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที ดูดเปปไทด์ที่ได้จากการสกัดด้วย 5% formic acid ใน 50% ACN (v/v) มารวมกับเปปไทด์เดิม จากนั้นจึงนำไปประเหยด้วยเครื่อง speed vac เป็นเวลา 2.30 ชั่วโมง เติม 98% H_2O , 2% ACN และ 0.1% formic acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนเปปไทด์ และเพื่อเป็นการเจือจางปริมาณอีกด้วย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นจึงนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 15,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จึงดูดส่วนใส เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)

3.3.4.6 การวิเคราะห์ผลด้วย Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในงานด้านโปรตีโอมิกส์เหมาะสำหรับแยกวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร ในสถานะของเหลว โดยใช้ตัวตรวจวัด (detector) เป็นแบบเครื่องวิเคราะห์มวลสาร (mass Spectrometer) ซึ่งมีความถูกต้อง และความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง (ภาพที่ 3.9)



ภาพที่ 3.9 เครื่อง Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)



ภาพที่ 3.10 หลักการของ mass spectrometry (MS) [55]

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างนั้น ต้องทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนให้อยู่ในรูปสารละลาย ในขั้นตอนแรกจะแยกสารด้วยหลักการของ High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ capillary column C18 (Acclaim®PepMap100) เป็น stationary phase และสำหรับ mobile phase ที่ใช้คือ solvent A (96% H₂O, 4% ACN และ 0.1% formic acid) และ solvent B (80% ACN, 20% H₂O และ 0.1% formic acid) โดยกำหนด condition ของ mobile phase ดังตารางที่ 3.5 ซึ่งปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการฉีดคือ 5 ไมโครลิตร เมื่อสารตัวอย่างผ่านเข้าสู่ระบบของ MS ตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไอออน ด้วย Electrospray ionization (ESI) ไอออนจะผ่านเข้าส่วนของ mass analyzer ซึ่งจะใช้เป็น ion trap ทำหน้าที่วิเคราะห์ไอออนตามค่ามวลต่อประจุ (m/z) จากนั้นจึงผ่านเข้าสู่ระบบ detector ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนไอออนให้ออกมาในรูปของสัญญาณทางไฟฟ้า (electrical signals) โปรแกรมจะทำการแปลงค่าสัญญาณออกมาในรูปของ

mass spectrum (ภาพที่ 3.10) หลังจากนั้นจึงนำ mass spectrum ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน เช่น Mascot เพื่อเปรียบเทียบว่าเป็นโปรตีนชนิดใด

ตารางที่ 3.5 แสดง condition ของ mobile phase สำหรับการแยกสารด้วย liquid chromatography (LC)


Retention time (min)	Flow rate ($\mu\text{L/mL}$)	%B
0.000	4.000	4.0
0.000	4.000	4.0
3.000	4.000	4.0
33.000	4.000	55.0
34.000	4.000	90.0
39.000	4.000	90.0
40.000	4.000	4.0
55.000	4.000	4.0

วิเคราะห์โปรตีนด้วยฐานข้อมูล (Protein Database Analyses)

นำ mass spectrum จากการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน Mascot (<http://www.matrixscience.com/help.html>) ก็จะสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ (ดังภาพที่ 14) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ดังนี้

1. ฐานข้อมูลคือ SwissProt ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของโปรตีน
2. อนุกรมวิธาน (Taxonomy) คือ มนุษย์ (Homo sapiens)
3. ตัวแปรที่มีการเปลี่ยนแปลง (Variable modifications) คือ Carbamidomethyl (C)
4. ประจุของเปปไทด์ (Peptide charge) คือ 2+, 3+ และ 4+
5. เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดเปปไทด์คือ เอนไซม์ทริปซิน (Trypsin)

ชื่อโปรตีนที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุดสามารถพิจารณาได้จากค่า Mascot score ที่มีค่าสูงสุด ควบคู่กับจำนวนชิ้นของเปปไทด์ที่วิเคราะห์จาก MS/MS ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่เป็นเอกลักษณ์ (unique) ของโปรตีนชนิดนั้นๆ ซึ่งจะเป็นโปรตีนของจุดที่เราสนใจ (ภาพที่ 3.11)


Mascot Search Results

User : natapong
 Email : n_kawjit@hotmail.com
 Search title : Annona Squamosa spot no.28
 MS data file : Annona squamosa Spot no.28.mgf
 Database : SwissProt 2013_04 (539829 sequences; 191670831 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (20253 sequences)
 Timestamp : 27 Apr 2013 at 10:19:49 GMT
 Protein hits : [HSPB1_HUMAN](#) Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2
 [K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6

1. [HSPB1_HUMAN](#) Mass: 22768 **Score: 90** Matches: 5(3) Sequences: 5(3) emPAI: 0.86
 Heat shock protein beta-1 OS=HOMO sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 11	459.2600	916.5054	916.4866	0.0189	0	31	0.32	1	U	K.DGVVVEITGK.H
<input checked="" type="checkbox"/> 17	481.2300	960.4454	960.4454	0.0001	0	21	3.3	1	U	R.GPSWDPFR.D
<input checked="" type="checkbox"/> 35	538.3200	1074.6254	1074.5669	0.0585	0	58	0.00057	1	U	R.QLSSGVSEIR.H
<input checked="" type="checkbox"/> 54	573.8000	1145.5854	1145.6292	-0.0438	1	58	0.00047	1	U	K.TKDGVEITGK.H
<input checked="" type="checkbox"/> 69	595.2900	1782.8482	1782.9152	-0.0670	0	39	0.048	1	U	R.VSLDVNHFADELTVK.T

2. [K2C1_HUMAN](#) Mass: 65999 **Score: 74** Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.06
 Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
 Check to include this hit in error tolerant search

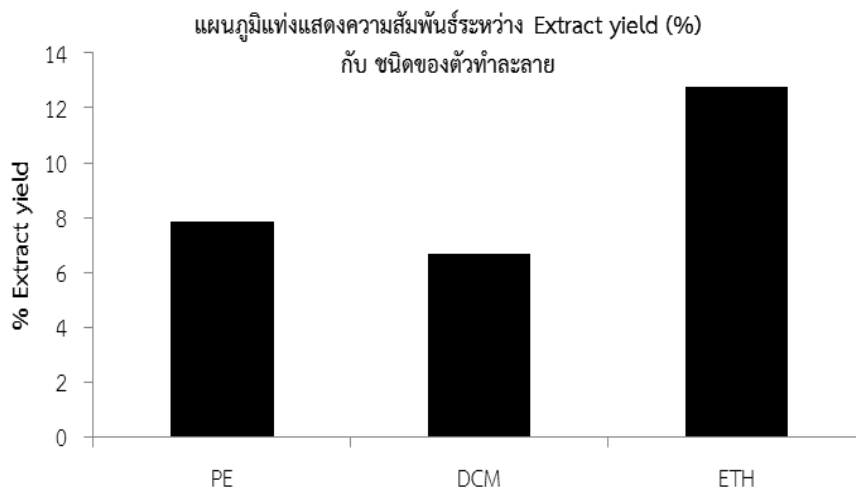
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 95	651.8700	1301.7254	1301.7078	0.0176	0	74	1e-05	1	U	R.SLDLDSIIAEVK.A

ภาพที่ 3.11 แสดงการเปรียบเทียบ mass spectrum ด้วยฐานข้อมูล Mascot

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

การสกัดน้อยหน้า ข่าและขมิ้นด้วย soxhlet apparatus เป็นเทคนิคที่ช่วยให้ลดการสิ้นเปลืองของตัวทำละลาย อีกทั้งการสกัดซึ่งเป็นการสกัดแบบระบบปิดสามารถลดการปนเปื้อนออกสู่ภายนอก แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้ก็ยังเป็นสารหยาบ (crude extract) เช่นเดียวกับการสกัดด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การต้ม การชง การคั้น และการหมัก หรือเทคนิคมาเซอเรชัน (Maceration) ซึ่งในการสกัดครั้งนี้คิดเป็น extract yield (%) ได้ดังนี้



ภาพที่ 4.1 แสดงปริมาณสารสกัดน้อยหน้าซึ่งใช้ตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน

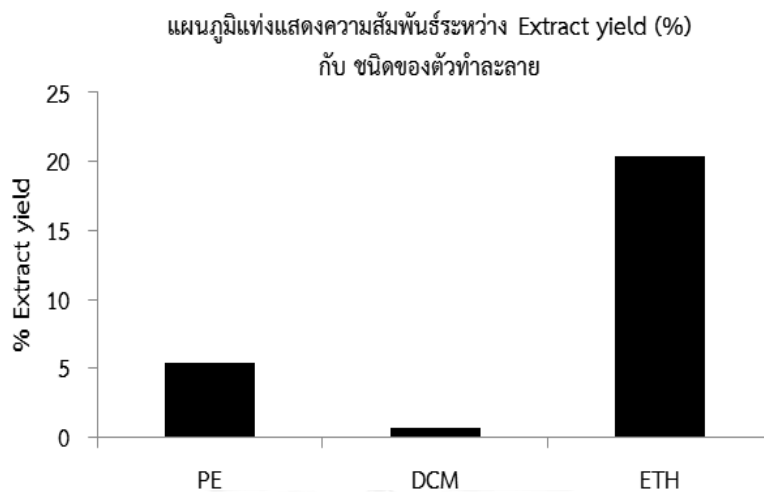
โดยมีปริมาณ extract yield ดังนี้

ตัวทำละลายชนิดที่ 1 petroleum ether มีปริมาณ extract yield คือ 7.87 %

ตัวทำละลายชนิดที่ 2 dichloromethane มีปริมาณ extract yield คือ 6.69 %

ตัวทำละลายชนิดที่ 3 ethanol มีปริมาณ extract yield คือ 12.79 %

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด พบว่าปริมาณ extract yield ที่ได้จากการใช้ตัวทำละลาย ethanol ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ petroleum ether และ dichloromethane ตามลำดับ

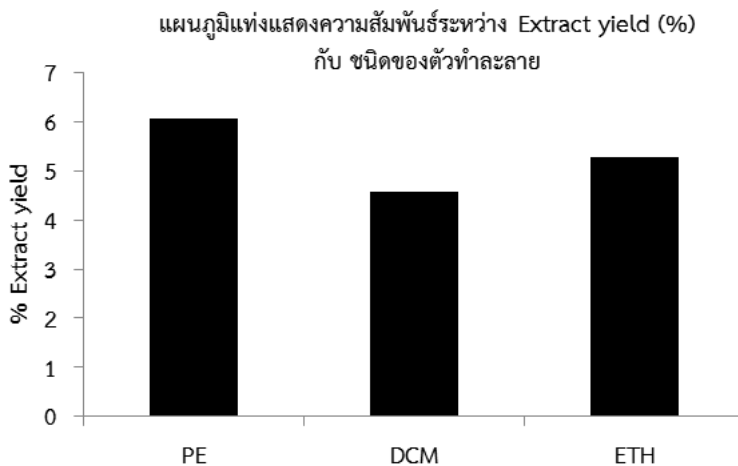


ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน

โดยมีปริมาณ extract yield ดังนี้

- ตัวทำละลายชนิดที่ 1 petroleum ether มีปริมาณ extract yield คือ 5.41 %
- ตัวทำละลายชนิดที่ 2 dichloromethane มีปริมาณ extract yield คือ 0.66 %
- ตัวทำละลายชนิดที่ 3 ethanol มีปริมาณ extract yield คือ 20.38 %

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด พบว่าปริมาณ extract yield ที่ได้จากการใช้ตัวทำละลาย ethanol ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ petroleum ether และ dichloromethane ตามลำดับ เช่นเดียวกับสารที่สกัดได้จากน้อยหน่า



ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณสารสกัดขมิ้นซึ่งใช้ตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน

โดยมีปริมาณ extract yield ดังนี้

ตัวทำละลายชนิดที่ 1 petroleum ether มีปริมาณ extract yield 6.058 %

ตัวทำละลายชนิดที่ 2 dichloromethane มีปริมาณ extract yield คือ 4.578 %

ตัวทำละลายชนิดที่ 3 ethanol มีปริมาณ extract yield คือ 5.263 %

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด พบว่าปริมาณ extract yield ที่ได้จากการใช้ตัวทำละลาย petroleum ether ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ ethanol และ dichloromethane ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดจากน้อยหน่าและข่า ซึ่งปริมาณสารสกัดที่ออกมามากที่สุดเมื่อใช้ตัวทำละลาย ethanol แต่อย่างไรก็ตาม dichloromethane เป็นตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารสกัดน้อยที่สุดทั้ง 3 สมุนไพร

4.2 ผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดน้อยหน้า ข่าและขมิ้น ด้วยวิธี Folin-ciocalteu assay

ชื่อสมุนไพร	Petroleum ether (mg GAE/ g sample)	Dichloromethane (mg GAE/ g sample)	Ethanol (mg GAE/ g sample)
น้อยหน้า	N/A	4.70±0.49	23.01±1.01
ข่า	N/A	10.64±0.56	6.75±0.70
ขมิ้น	12.54±1.14	71.84±2.29	64.71±3.19

จากการศึกษาพบว่า สารสกัดน้อยหน้าสามารถพบสารประกอบฟีนอลิกได้เฉพาะในตัวทำละลายชนิด dichloromethane และ ethanol เท่านั้น โดยที่พบในตัวทำละลาย ethanol ในปริมาณมากที่สุดคือ 23.01±1.01 มิลลิกรัมของแกลลิก แอซิดต่อน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg GAE/ g sample) รองลงมาคือ สารสกัดจากตัวทำละลาย dichloromethane ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 4.70±0.49 mg GAE/ g sample ส่วนในสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย petroleum ether นั้นไม่พบสารประกอบฟีนอลิก

เช่นเดียวกับสกัดข่า สามารถพบสารประกอบฟีนอลิกได้เฉพาะในตัวทำละลายชนิด dichloromethane และ ethanol เท่านั้น แต่ตัวทำละลายที่ให้สารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ dichloromethane ซึ่งพบในปริมาณ 10.64±0.56 mg GAE/ g sample และรองลงมาคือ สารสกัดจากตัวทำละลาย ethanol พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 6.75±0.70 ส่วนตัวทำละลาย petroleum ether นั้นไม่พบสารประกอบฟีนอลิก เช่นเดียวกับสารสกัดจากน้อยหน้า

สารสกัดจากขมิ้นเป็นสารสมุนไพรเพียงชนิดเดียวที่สามารถพบสารประกอบฟีนอลิกได้ทั้ง 3 ตัวทำละลาย และพบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเมื่อเทียบกับน้อยหน้าและข่า โดยพบว่าสารสกัดที่ได้จาก dichloromethane มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือ ethanol และ petroleum ether โดยพบปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกดังนี้ 71.84±2.29, 64.71±3.19 และ 12.54±1.14 mg GAE/ g sample ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลในรูปของ mean ± SEM โดยทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง และจำนวน 3 การทดลอง

4.3 ผลการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดน้อยหน่า ข่าและขมิ้นด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay

ชื่อสมุนไพร	Petroleum ether (mg quercetin/g sample)	Dichloromethane (mg quercetin/g sample)	Ethanol (mg quercetin/g sample)
น้อยหน่า	19.59±1.98	63.76±2.58	40.07±1.49
ข่า	1.72±0.25	10.04±1.71	2.68±0.52
ขมิ้น	20.27±3.07	775.90±10.30	596.00±7.14

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากน้อยหน่า ข่าและขมิ้นสามารถพบฟลาโวนอยด์ได้ทั้ง 3 ตัว ทำละลาย ซึ่งจะแตกต่างกันในเรื่องของปริมาณดังนี้ สารสกัดจากน้อยหน่าสามารถพบสารฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุดในตัวทำละลาย dichloromethane รองลงมาคือ ethanol และ petroleum ether ซึ่งพบปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ ดังนี้ 63.76±2.58, 40.07±1.49, 19.59±1.98 มิลลิกรัมของควอร์ซิทินต่อน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg quercetin/g sample) ตามลำดับ

สารสกัดจากข่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดในตัวทำละลาย dichloromethane รองลงมาคือ ethanol และ petroleum ether เช่นเดียวกับกับสารสกัดจากน้อยหน่า โดยที่ปริมาณของฟลาโวนอยด์ที่พบมีดังนี้ 10.04±1.71, 2.68±0.52 และ 1.72±0.25 mg quercetin/g sample ตามลำดับ

สารสกัดจากขมิ้นมีฟลาโวนอยด์มากที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดจากน้อยหน่าและข่า โดยพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลาย dichloromethane มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ ethanol และ petroleum ether ซึ่งปริมาณที่พบมีดังนี้ 775.90±10.30, 596.00±7.14 และ 20.27±3.07 mg quercetin/g sample ตามลำดับ

ซึ่งแสดงผลในรูปของ mean ± SEM โดยทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง และจำนวน 3 การทดลอง

4.4 ผลการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ตารางที่ 4.3 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูลอิสระของสารสกัดน้อยหน่า ข่า และขมิ้นด้วยวิธี DPPH

ชื่อสมุนไพร	Petroleum ether		Dichloromethane		Ethanol	
	Radical scavenging Activity (%)	mg Ascorbic acid /g sample	Radical scavenging Activity (%)	mg Ascorbic acid /g sample	Radical scavenging Activity (%)	mg Ascorbic acid /g sample
น้อยหน่า	8.45±0.42	1.68±0.33	14.96±2.29	8.40±3.21	33.88±0.83	25.18±0.69
ข่า	N/A	N/A	32.05±0.46	24.67±1.63	22.49±1.62	15.35±0.32
ขมิ้น	16.19±0.32	10.19±0.57	87.85±1.50 IC ₅₀ =400	63.00±2.72	84.47±1.71 IC ₅₀ =200	58.56±0.50

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากน้อยหน่า ข่า และขมิ้น ซึ่งจะวัดออกมาในเป็นค่าของ radical scavenging activity (%) และนำไปเทียบค่ากับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเป็นค่ามิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg Ascorbic acid / g sample) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากน้อยหน่าจากตัวทำละลาย ethanol สามารถต้านออกซิเดชั่นอนุมูล DPPH ได้มากที่สุด รองลงมาคือ dichloromethane และ petroleum ether ซึ่งมีค่า radical scavenging activity (%) ดังนี้ 33.88±0.83, 14.96±2.29 และ 8.45±0.42 ตามลำดับ และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก พบปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้ 25.18±0.69, 8.40±3.21 และ 1.68±0.33 mg Ascorbic acid /g sample ตามลำดับ

สารสกัดจากข่าพบว่ามีเฉพาะสารสกัดจากตัวทำละลาย dichloromethane และ ethanol เท่านั้น โดยพบมากที่สุดในตัวทำละลาย dichloromethane รองลงมา คือ ethanol ซึ่งมีค่า radical scavenging activity (%) ดังนี้ 32.05±0.46 และ 22.49±1.62 ตามลำดับ และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก พบปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้ 24.67±1.63 และ 15.35±0.32 mg Ascorbic acid /g sample ตามลำดับ

สารสกัดจากขมิ้นพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชนิด dichloromethane สามารถต้านออกซิเดชั่นอนุมูล DPPH ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ethanol และ petroleum ether ซึ่งมีค่า radical scavenging activity (%) ดังนี้ 87.85±1.50, 84.47±1.71 และ 16.19±0.32 ตามลำดับ และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก พบปริมาณของสารต้านอนุมูล

อิสระดังนี้ 63.00 ± 2.72 , 58.56 ± 0.50 และ 10.19 ± 0.57 mg Ascorbic acid /g sample ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลในรูปของ mean \pm SEM โดยทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง และจำนวน 3 การทดลอง

4.5 ผลการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 4.4 แสดงถึงผลการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระของสารสกัดน้อยหน้า ข่า และขมิ้นด้วยวิธี ABTS^{•+}

ชื่อสมุนไพร	Petroleum ether		Dichloromethane		Ethanol	
	Radical scavenging Activity (%)	mg Ascorbic acid /g sample	Radical scavenging Activity (%)	mg Ascorbic acid /g sample	Radical scavenging Activity (%)	mg Ascorbic acid /g sample
น้อยหน้า	10.93 \pm 1.83	6.22 \pm 0.26	27.63 \pm 2.36	16.43 \pm 0.96	56.30 \pm 1.35 IC ₅₀ =800	30.28 \pm 4.83
ข่า	14.67 \pm 3.24	7.97 \pm 0.75	57.40 \pm 1.75 IC ₅₀ = 700	31.29 \pm 3.93	39.23 \pm 4.18	23.80 \pm 1.02
ขมิ้น	41.03 \pm 2.23	24.16 \pm 0.77	98.80 \pm 0.32 IC ₅₀ =120	57.68 \pm 8.31	97.11 \pm 0.94 IC ₅₀ =125	50.32 \pm 2.60

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระของสารสกัดจากน้อยหน้า ข่าและขมิ้น ซึ่งจะวัดออกมาในเป็นค่าของ radical scavenging activity (%) และนำไปเทียบค่ากับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเป็นค่ามิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัด (mg ascorbic acid / g sample) เช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระของสารสกัดน้อยหน้า ข่าและขมิ้นด้วยวิธี DPPH (ตารางที่ 4.3) จากการศึกษพบว่าสารสกัดจากน้อยหน้าจากตัวทำละลาย ethanol จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS^{•+} ได้มากที่สุด รองลงมาคือ dichloromethane และ petroleum ether ซึ่งมีค่า radical scavenging activity (%) ดังนี้ 56.30 ± 1.35 , 27.63 ± 2.36 และ 10.93 ± 1.83 ตามลำดับ และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก พบปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้ 30.28 ± 4.83 , 16.43 ± 0.96 และ 6.22 ± 0.26 mg ascorbic acid / g sample ตามลำดับ

สำหรับสารสกัดจากข่า พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชนิด dichloromethane สามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS^{•+} ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ethanol และ petroleum ether ซึ่งมีค่า radical scavenging activity (%) ดังนี้ 57.40 ± 1.75 , 39.23 ± 4.18 และ 14.67 ± 3.24 ตามลำดับ

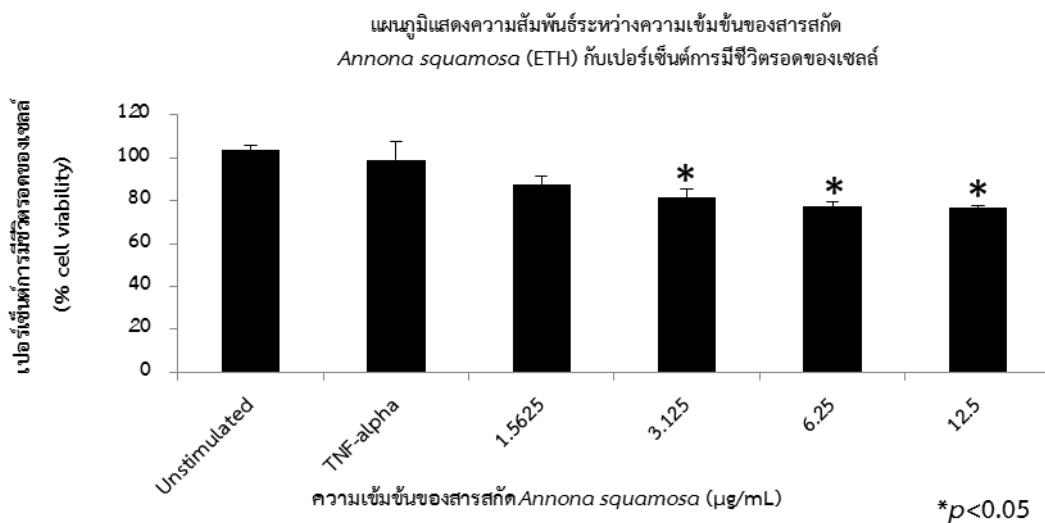
และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก พบปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้ 31.29 ± 3.93 , 23.80 ± 1.02 และ 7.97 ± 0.75 mg ascorbic acid / g sample ตามลำดับ

สำหรับสารสกัดจากขมิ้น พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชนิด dichloromethane สามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ethanol และ petroleum ether เช่นเดียวกับสารสกัดจากข่าซึ่งมีค่า radical scavenging activity (%) ดังนี้ 98.80 ± 0.32 , 97.11 ± 0.94 และ 41.03 ± 2.23 ตามลำดับ และเมื่อนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก พบปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้ 57.68 ± 8.31 , 50.32 ± 2.60 และ 24.16 ± 0.77 mg ascorbic acid / g sample ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลในรูปของ mean \pm SEM โดยทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง และจำนวน 3 การทดลอง

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค MTT assay

ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิด จากตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane และ ethanol ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสมุนไพรในหลุมเป็น 12.5, 6.25, 3.125 และ 0.15625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับสารเคออสทินจะทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 125, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครโมลลาร์ ซึ่งทำการทดสอบกับเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง HaCaT โดยใช้เทคนิค MTT assay เพื่อต้องการทดสอบความสามารถในการเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (metabolic capacity) ภายในเซลล์ ซึ่งในการทดสอบดังกล่าวเซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกิดการอักเสบ และมีการหลั่งไซโตไคน์เพื่อกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น จากนั้นจึงทำการทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่ออีก 48 ชั่วโมง โดยให้ DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (positive control) ให้มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ HaCaT ซึ่งกระตุ้นด้วย TNF- α (control) ให้มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดสอบที่ได้จะเป็นการเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (เซลล์ HaCaT ซึ่งกระตุ้นด้วย TNF- α) จากนั้นนำความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ไปทดสอบกับเซลล์ HaCaT เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนต่อไป

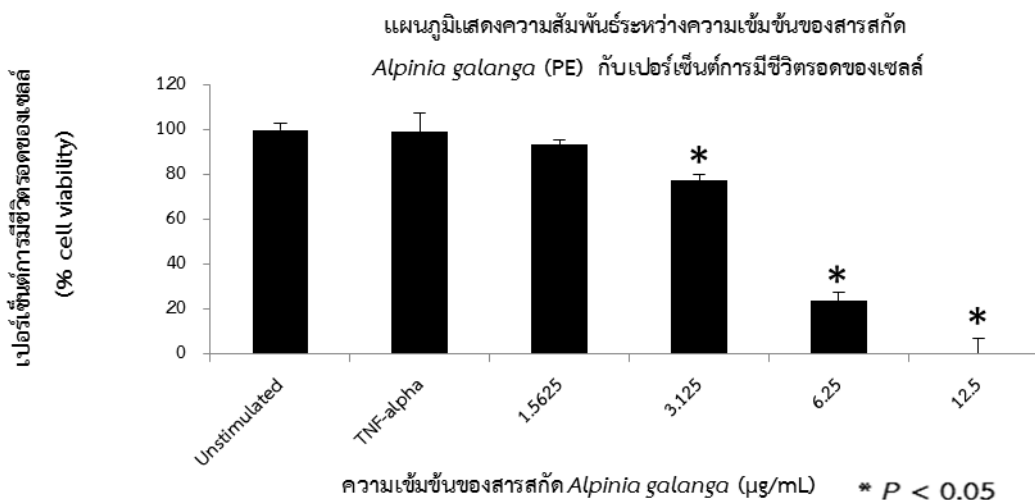
4.6.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากน้อยหน่าด้วยเทคนิค MTT assay



ภาพที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ และทดสอบจำนวน 3 การทดลอง

จากการทดสอบสารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 1.5625-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane และ ethanol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลาย ethanol ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ซึ่งกระตุ้นด้วย TNF- α เพียงอย่างเดียว (ดังภาพที่ 4.4) ดังนั้นที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเลือกนำไปใช้เพื่อศึกษาดูการแสดงออกระดับโปรตีนของเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งตอบสนองต่อการใช้สารสกัดน้อยหน่าในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน

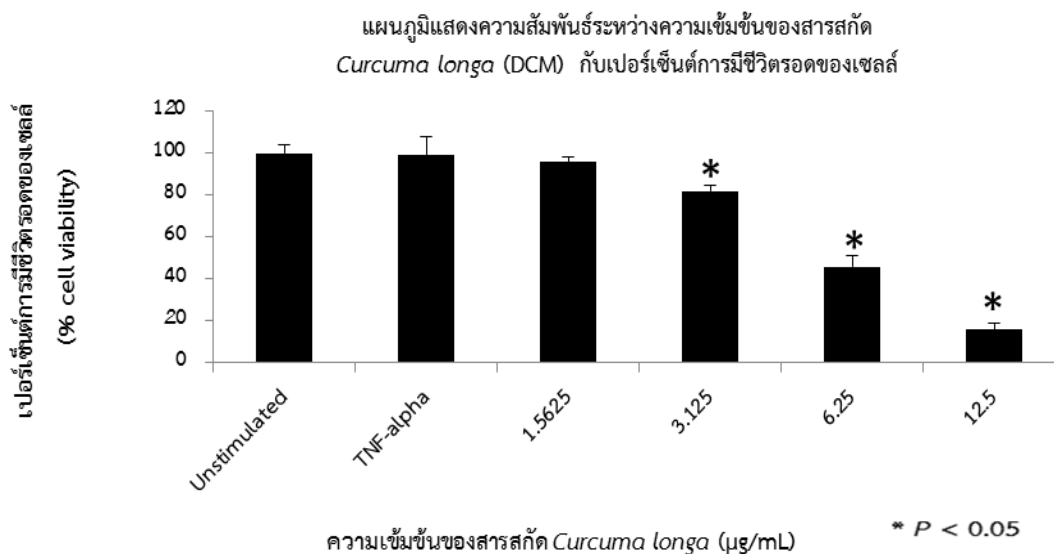
4.6.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดฆ่าด้วยเทคนิค MTT assay



ภาพที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยการทดสอบด้วยสารสกัดฆ่าจากตัวทำละลาย petroleum ether ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ และทดสอบจำนวน 3 การทดลอง

จากการทดสอบสารสกัดฆ่าที่ความเข้มข้น 1.5625-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane และ ethanol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีเพียงสารสกัดฆ่าจากตัวทำละลาย petroleum ether เท่านั้น ที่เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ โดยที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ มีผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เคอราติโนไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ซึ่งกระตุ้นด้วย TNF-alpha อย่างเดียว (ดังภาพที่ 4.5) จึงนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เพื่อนำไปศึกษาดูการแสดงออกในระดับโปรตีนของเซลล์เคอราติโนไซด์ ซึ่งตอบสนองต่อการใช้สารสกัดฆ่าในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน

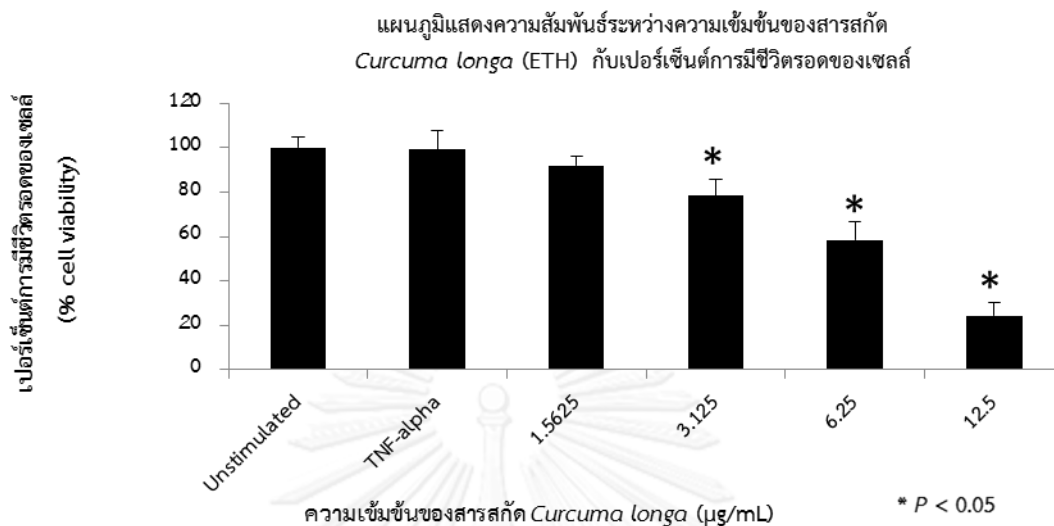
4.6.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากขมิ้น (DCM) ด้วยเทคนิค MTT assay



ภาพที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยการทดสอบด้วยสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลาย Dichloromethane ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ และทดสอบจำนวน 3 การทดลอง

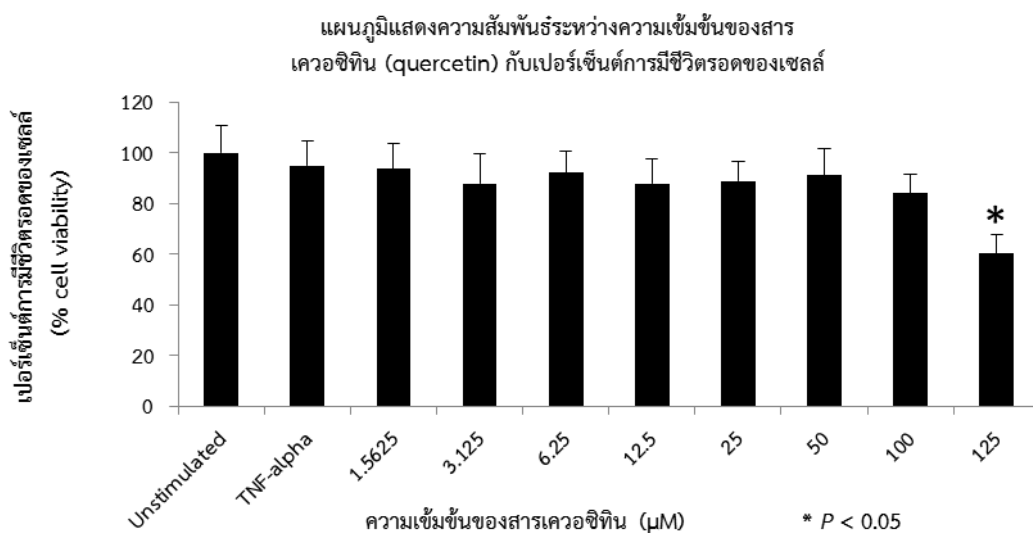
จากการทดสอบสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 1.5625-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตัวทำละลาย petroleum ether, dichloromethane และ ethanol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลาย dichloromethane และ ethanol เท่านั้น ที่เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ โดยที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ มีผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เคอราติโนไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ซึ่งกระตุ้นด้วย TNF-alpha อย่างเดียว (ดังภาพที่ 4.6 และ 4.7) จึงนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่จะไปยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เพื่อนำไปศึกษาดูการแสดงออกในระดับโปรตีนของเซลล์เคอราติโนไซด์ ซึ่งตอบสนองต่อการใช้สารสกัดขมิ้นในการรักษาโรคสะเก็ดเงินทั้งในส่วนของตัวทำละลาย dichloromethane และ ethanol

4.6.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากขมิ้น (ETH) ด้วยเทคนิค MTT assay



ภาพที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยการทดสอบสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ และ ทดสอบจำนวน 3 การทดลอง

4.6.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคอควิทิน (quercetin) ด้วยเทคนิค MTT assay



ภาพที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยการทดสอบด้วยสารเคอควิทิน (quercetin) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ และทดสอบจำนวน 3 การทดลอง

จากการทดสอบสารเคอควิทิน (quercetin) ที่ความเข้มข้น 1.5625-125 ไมโครโมลลาร์ (μM) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ช่วง 1.5625-100 ไมโครโมลลาร์ เคอควิทินไม่ เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ยังคง มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารเคอควิทินเพิ่มสูงขึ้นเป็น 125 ไมโคร โมลลาร์ เคอควิทินเริ่มมีพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์มากขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ลดลงเหลือเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ดังภาพที่ 4.8) ดังนั้นที่ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลลาร์ จึงเลือกนำไปใช้เพื่อศึกษาดูการแสดงออก ระดับโปรตีนของเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งตอบสนองต่อการใช้สารเคอควิทินในการรักษาโรคมะเร็ง

4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรไทยต่อการแสดงออกของโปรตีน ภายในเซลล์เคอราติโนไซต์

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์ HaCaT ซึ่งกระตุ้นด้วย $\text{TNF-}\alpha$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า ข่า ขมิ้น และสารเคอควิทิน (quercetin) เป็น เวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับโปรตีนของกลุ่มควบคุม (control cell) ซึ่งกระตุ้นด้วย $\text{TNF-}\alpha$ เพียง อย่างเดียว โดยใช้เทคนิค 2D-GE ซึ่งทำการวิเคราะห์โปรตีนในช่วง pH เท่ากับ 3-10 จากนั้นจึงนำมา วิเคราะห์แผ่นเจลด้วยโปรแกรม (image analysis) เพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของจุด โปรตีนที่มีการแสดงออกในสถานะที่ทดสอบด้วยสารต่างๆกัน

4.7.1 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสาร สกัดน้อยหน้า

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพบความแตกต่างของจุดโปรตีน (spot protein) จำนวน 22 จุด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนดังนี้ protein disulfide-isomerase, protein disulfide-isomerase A3, prelamin-A/C, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, TATA-binding protein-associated factor 2N, ornithine aminotransferase, heat shock cognate 71 kDa protein, tropomodulin-3, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2, keratin, type II cytoskeletal 5, annexin A1, nucleophosmin, keratin, type II cytoskeletal 6A, keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal, cathepsin D, histone-lysine N-methyltransferase EHMT2, peroxiredoxin-4, enoyl-CoA hydratase, heat shock protein beta-1, thioredoxin-dependent peroxide reductase และ peroxiredoxin-2 (ดังตารางที่ 1 ภาคผนวก ก) แต่พบว่ามี เพียง 8 โปรตีนเท่านั้น (ดังภาพที่ 4.13) ที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย tropomodulin-3 (An11), cathepsin D (An23), peroxiredoxin-4 (An26), enoyl-CoA hydratase (An27), heat shock protein beta-1 (An28) และ peroxiredoxin-2 (An30) ซึ่ง พบว่าโปรตีนเหล่านี้ลดการแสดงออกลง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า มีเพียง heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (An5) เท่านั้น ซึ่งเพิ่มการแสดงออกเมื่อทดสอบด้วยสารสกัด

น้อยหน้า (ตารางที่ 4.5) โดยที่โปรตีนมีค่า pI อยู่ในช่วง 4.64-8.46 และมีน้ำหนักโมเลกุล (Mw) อยู่ในช่วง 21.8-64.0 KDa

ตารางที่ 4.5 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้าจากตัวทำละลาย ethanol

Spot No.	Protein name	Accession No.	gene	Function	Regulated
An5	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins L	P14866	<i>HNRNP L</i>	Promote cell differentiation	↑
An11	Tropomodulin-3	Q9NYL9	<i>TMOD 3</i>	Promote cell proliferation and migration	↓
An23	Cathepsin D	P07339	<i>CTSD</i>	Anti-apoptosis	↓
An26	Peroxiredoxin-4	Q13162	<i>PRDX4</i>	Anti-apoptosis and activate NF- κ B	↓
An27	Enoyl-CoA hydratase	P30084	<i>ECHS1</i>	Anti-apoptosis	↓
An28	Heat shock protein beta-1	P04792	<i>HSPB1</i>	Anti-apoptosis and activate NF- κ B	↓
An30	Peroxiredoxin-2	P32119	<i>PRDX2</i>	Promote cell proliferation	↓

4.7.2 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดข่า

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพบความแตกต่างของจุดโปรตีน (spot protein) จำนวน 14 จุด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนดังนี้ alpha-enolase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E, cathepsin D, cathepsin B, prohibitin, ran-specific GTPase-activating protein, chromobox protein homolog 1, peroxiredoxin-4, enoyl-CoA hydratase, heat shock protein beta-1, endoplasmic reticulum resident protein 29, keratin, type I cytoskeletal 9, ATP synthase subunit alpha และ superoxide dismutase [Mn] (ดังตารางที่ 2 ภาคผนวก

ก) แต่พบว่ามีเพียง 7 โปรตีนเท่านั้น (ดังภาพที่ 4.14) ที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย cathepsin D (A10), cathepsin B (A11), peroxiredoxin-4 (A16), enoyl-CoA hydratase (A17), heat shock protein beta-1 (A18), endoplasmic reticulum resident protein 29 (A19) และ ATP synthase subunit alpha (A22) ซึ่งพบว่าโปรตีนเหล่านี้ลดการแสดงออกลง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดฆ่า (ตารางที่ 4.6) โดยที่โปรตีนมีค่า pi อยู่ในช่วง 5.86-9.16 และมีน้ำหนักโมเลกุล (Mw) อยู่ในช่วง 22.7-59.7 KDa

ตารางที่ 4.6 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดฆ่าจากตัวทำละลาย petroleum ether

Spot No.	Protein name	Accession No.	gene	Function	Regulated
A10	Cathepsin D	P07339	<i>CTSD</i>	Anti-apoptosis	↓
A11	Cathepsin B	P07858	<i>CTSB</i>	Anti-apoptosis	↓
A16	Peroxiredoxin-4	Q13162	<i>PRDX4</i>	Anti-apoptosis and activate NF- κ B	↓
A17	Enoyl-CoA hydratase	P30084	<i>ECHS1</i>	Anti-apoptosis	↓
A18	Heat shock protein beta-1	P04792	<i>HSPB1</i>	Anti-apoptosis and activate NF- κ B	↓
A19	Endoplasmic reticulum resident protein 29	P30040	<i>ERP29</i>	Promote cell proliferation	↓
A22	ATP synthase subunit alpha	P25705	<i>ATP5A1</i>	Promote cell proliferation and migration	↓

4.7.3 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดไขมัน

4.7.3.1 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดไขมัน จากตัวทำละลาย dichloromethane วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพบความแตกต่างของจุดโปรตีน (spot protein) จำนวน 10 จุด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนดังนี้ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1, cathepsin B,

proteasome activator complex subunit 1, keratin, type II cytoskeletal 1, peroxiredoxin-4, enoyl-CoA hydratase, heat shock protein beta-1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 และ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (ดังตารางที่ 3 ภาคผนวก ก) แต่พบว่ามีเพียง 7 โปรตีนเท่านั้น (ดังภาพที่ 4.15) ที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (CD1), cathepsin B (CD8), keratin, type II cytoskeletal 1 (CD10), peroxiredoxin-4 (CD13), enoyl-CoA hydratase (CD14), heat shock protein beta-1 (CD15) และ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (CD18) ซึ่งพบว่าโปรตีนเหล่านี้ลดการแสดงออกลง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไขมันจากตัวทำละลาย dichloromethane (ตารางที่ 4.7) โดยที่โปรตีนมีค่า pI อยู่ในช่วง 5.39-8.34 และมีน้ำหนักโมเลกุล (Mw) อยู่ในช่วง 22.7-65.9 KDa

ตารางที่ 4.7 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดไขมันจากตัวทำละลาย dichloromethane

Spot No.	Protein name	Accession No.	gene	Function	Regulated
CD 1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	<i>HNRNPK</i>	Anti-apoptosis	↓
CD 8	Cathepsin B	P07858	<i>CTSB</i>	Anti-apoptosis	↓
CD10	Keratin I	P04264	<i>KRT1</i>	Activate inflammation	↓
CD13	Peroxiredoxin-4	Q13162	<i>PRDX4</i>	Anti-apoptosis and activate NF- κ B	↓
CD14	Enoyl-CoA hydratase	P30084	<i>ECHS1</i>	Anti-apoptosis	↓
CD15	Heat shock protein beta-1	P04792	<i>HSPB1</i>	Anti-apoptosis and activate NF- κ B	↓
CD18	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	<i>HNRNPH</i>	Anti-apoptosis	↓

4.7.3.2. การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดไขมัน จากตัวทำละลาย ethanol วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพบความแตกต่างของจุดโปรตีน (spot protein) จำนวน 13 จุด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนดังนี้ protein disulfide-isomerase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, elongation factor Tu, fumarate hydratase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3, cathepsin B, cathepsin D, proteasome activator complex subunit 1, keratin, type II cytoskeletal 1, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E, 14-3-3 protein sigma และ T-complex protein 1 subunit theta (ดังตารางที่ 4 ภาคผนวก ก) แต่พบว่ามีเพียง 5 โปรตีนเท่านั้น (ดังภาพที่ 4.16) ที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (CE2), cathepsin B (CE7), cathepsin D (CE8) และ keratin, type II cytoskeletal 1 (CE10) ซึ่งพบว่าโปรตีนเหล่านี้ลดการแสดงออกลง เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไขมันจากตัวทำละลาย ethanol มีเพียงแต่ protein disulfide-isomerase (CE1) เท่านั้น ซึ่งเพิ่มการแสดงออกเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไขมันจากตัวทำละลาย ethanol (ตารางที่ 4.8) โดยที่โปรตีนมีค่า pi อยู่ในช่วง 4.68-8.15 และมีน้ำหนักโมเลกุล (Mw) อยู่ในช่วง 27.7-65.9 KDa

ตารางที่ 4.8 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดไขมันจากตัวทำละลาย ethanol

Spot No.	Protein name	Accession No.	gene	Function	Regulated
CE1	Protein disulfide-isomerase	P07237	<i>PDI</i>	Promote cell apoptosis	↑
CE2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	<i>HNRNPK</i>	Anti-apoptosis	↓
CE7	Cathepsin B	P07858	<i>CTSB</i>	Anti-apoptosis	↓
CE8	Cathepsin D	P07339	<i>CTSD</i>	Anti-apoptosis	↓
CE10	Keratin I	P04264	<i>KRT1</i>	Activate inflammation	↓

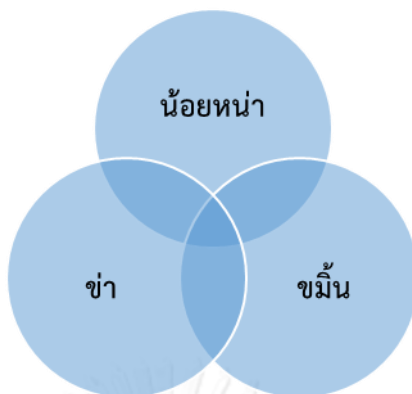
4.7.4 การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดสารเคอควิซิน (quercetin)

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพบความแตกต่างของจุดโปรตีน (spot protein) จำนวน 35 จุด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนดังนี้ 78 kDa glucose-regulated protein, transitional endoplasmic

reticulum ATPase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, prelamin-A/C, protein FAM221A, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, keratin, type II cytoskeletal 1, ornithine aminotransferase, tropomodulin-3, dnaJ homolog subfamily B member 11, elongation factor Tu, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B, poly(rC)-binding protein 1, PDZ and LIM domain protein 1, annexin A2, keratin, type I cytoskeletal 10, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, SAP domain-containing ribonucleoprotein, cathepsin D, pre-mRNA-splicing factor SPF27, NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, endoplasmic reticulum resident protein 29, DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3, ATPase family AAA domain-containing protein 3A, ATP synthase subunit alpha และ thioredoxin-dependent peroxide reductase (ดังตารางที่ 5 ภาคผนวก ก) แต่พบว่ามีเพียง 3 โปรตีนเท่านั้น (ดังภาพที่ 4.17) ที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย tropomodulin-3 (Q12) และ cathepsin D (Q25) ซึ่งพบว่าลดการแสดงออกลงเมื่อทดสอบด้วยสารเคอควิทีน มีเพียงแต่ transitional endoplasmic reticulum ATPase (Q2) เท่านั้น ซึ่งเพิ่มการแสดงออกเมื่อทดสอบด้วยสารเคอควิทีน (ตารางที่ 4.9) โดยที่โปรตีนมีค่า pI อยู่ในช่วง 5.08-6.10 และมีน้ำหนักโมเลกุล (Mw) อยู่ในช่วง 39.5-89.2 Kda

ตารางที่ 4.9 แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารเคอควิทีน (quercetin)

Spot No.	Protein name	Accession No.	gene	Function	Regulated
Q2	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	VCP	Anti-apoptosis	↑
Q12	Tropomodulin-3	Q9NYL9	TMOD3	Proliferation and migration	↓
Q25	Cathepsin D	P07339	CTSD	Anti-apoptosis	↓



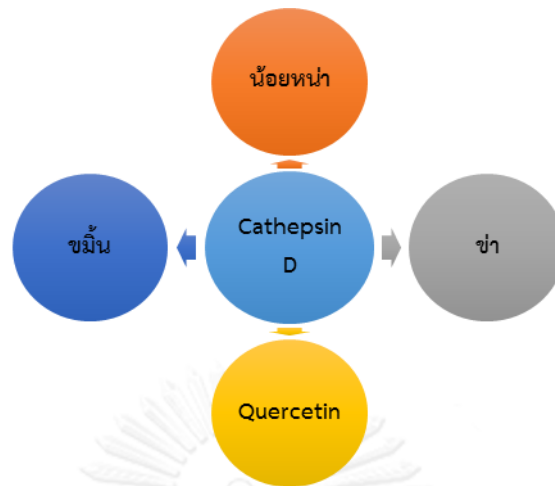
ภาพที่ 4.9 โมเดลแสดงโปรตีนที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (overlap) ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมระหว่างสารสกัดจากน้อยหน้า ข่าและไขมัน

เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนที่ตอบสนองต่อการใช้สารสกัดน้อยหน้า ข่าและไขมัน พบว่ามีโปรตีนเป้าหมายร่วมกัน (common target protein) ซึ่งอยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (ภาพที่ 4.9) โดยพบว่าระหว่างน้อยหน้ากับข่ามี cathepsin D, enoyl-CoA hydratase, heat shock protein beta-1 และ peroxiredoxin-4 เป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมกัน เช่นเดียวกับสารสกัดน้อยหน้ากับไขมัน อีกทั้งโปรตีนเหล่านี้ยังเป็นเป้าหมายร่วมของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดอีกด้วย ส่วนโปรตีนที่เป็นเป้าหมายร่วมระหว่างสารสกัดข่าและไขมัน ประกอบด้วย cathepsin D, cathepsin B, enoyl-CoA hydratase, heat shock protein beta-1 และ peroxiredoxin-4

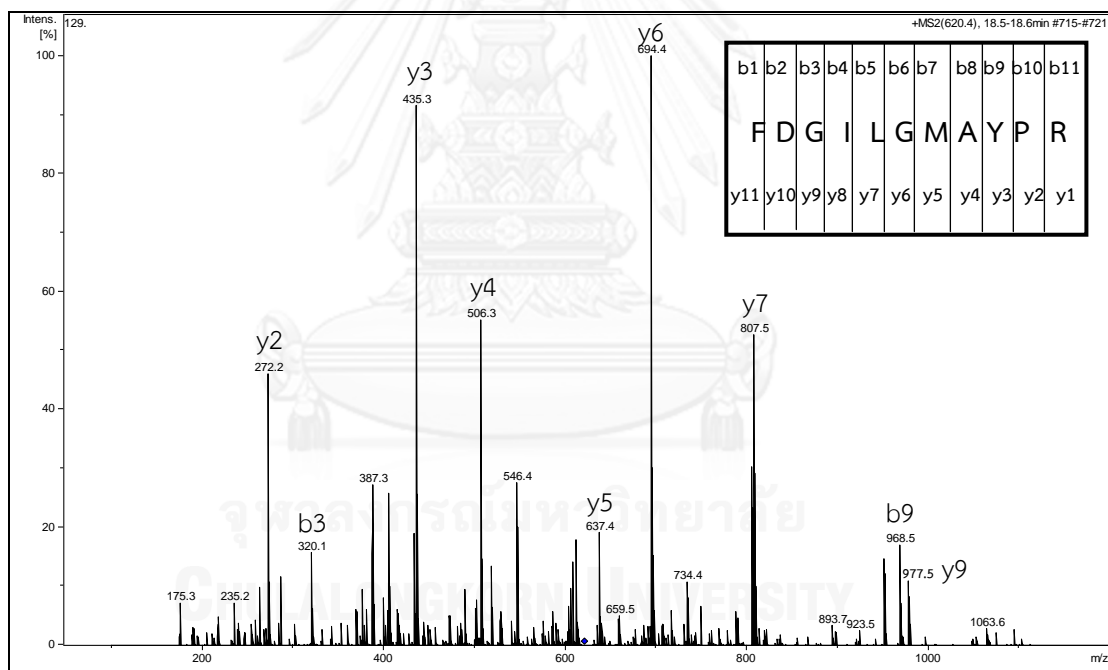


ภาพที่ 4.10 โมเดลแสดงโปรตีนที่อยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน (overlap) ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมระหว่างสารสกัดจากน้อยหน้า ข่า ไขมันและสารเคอวซิทิน

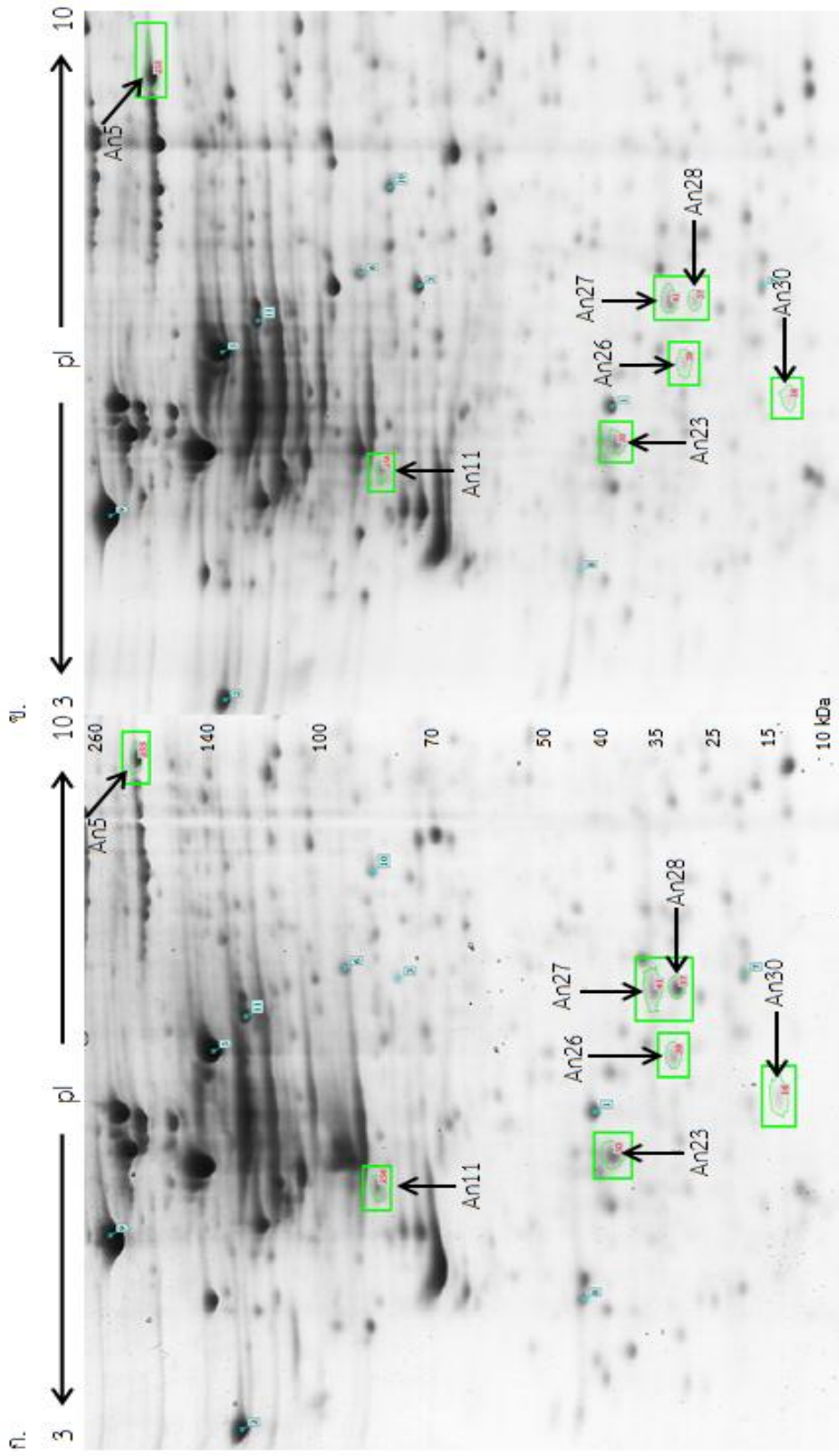
เปรียบเทียบโปรตีนที่ตอบสนองต่อการทดสอบระหว่างสารสกัดสมุนไพรไทยกับสารเคอวซิทิน พบว่ามีโปรตีนเป้าหมายร่วมกัน (common target protein) ซึ่งอยู่ในพื้นที่คาบเกี่ยวกัน โดยพบว่าระหว่างสารสกัดน้อยหน้ากับเคอวซิทิน (ภาพที่ 4.10-ก) มี cathepsin D และ tropomodulin-3 เป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมกัน ระหว่างสารสกัดข่ากับเคอวซิทิน (ภาพที่ 4.10-ข) มีเฉพาะ cathepsin D เท่านั้น ที่เป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมกัน เช่นเดียวกับสารสกัดไขมันกับเคอวซิทิน (ภาพที่ 4.10-ค) อีกทั้ง cathepsin D (ภาพที่ 4.11, 4.12) ยังเป็นโปรตีนเป้าหมายร่วมของสารสกัดน้อยหน้า ข่า ไขมันและสารเคอวซิทินอีกด้วย



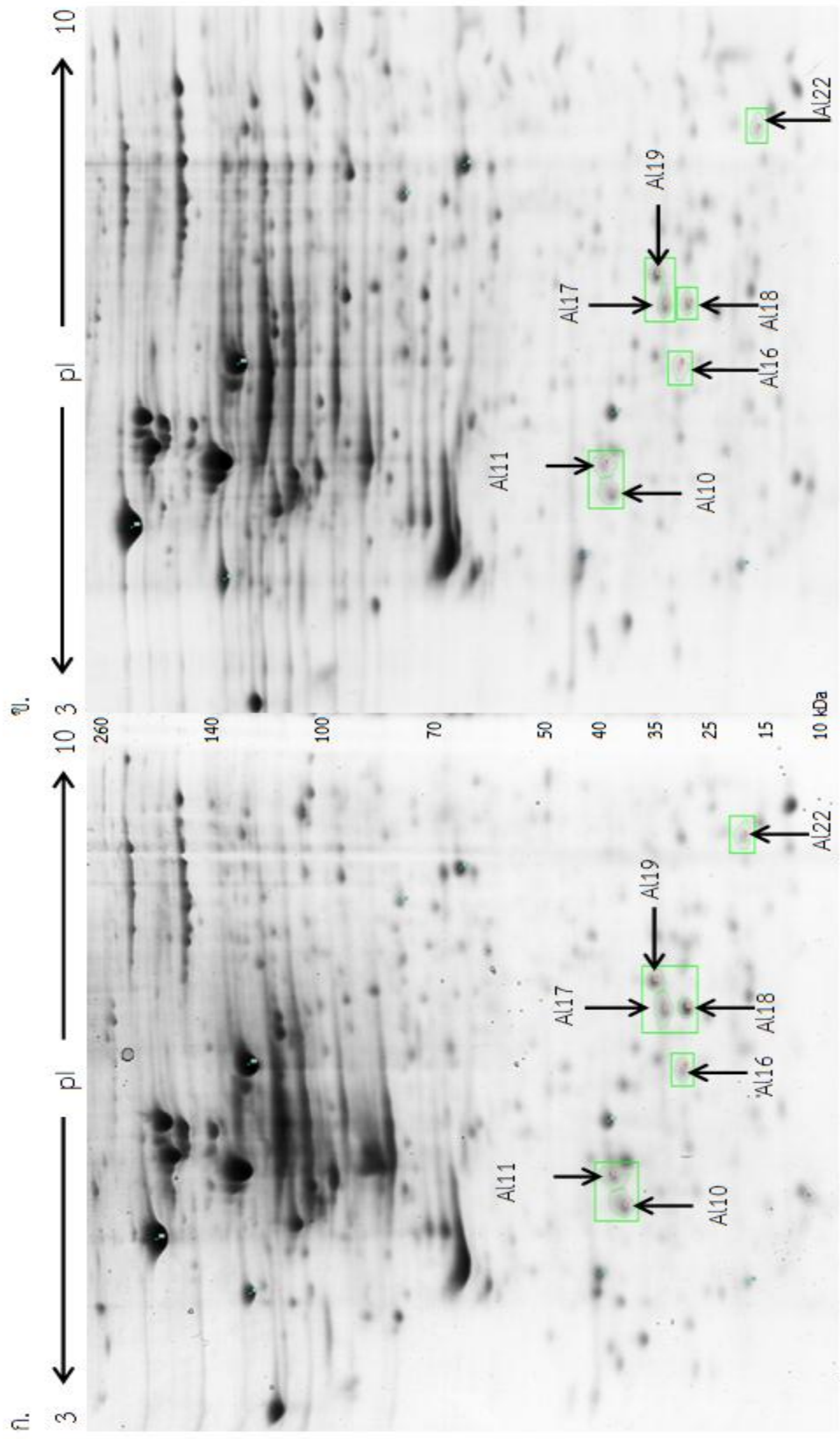
ภาพที่ 4.11 โมเดลแสดงชนิดของโปรตีนซึ่งเป็นเป้าหมายร่วม (common target protein) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า ซ่า ไขมัน และสารเคอควิซิทิน



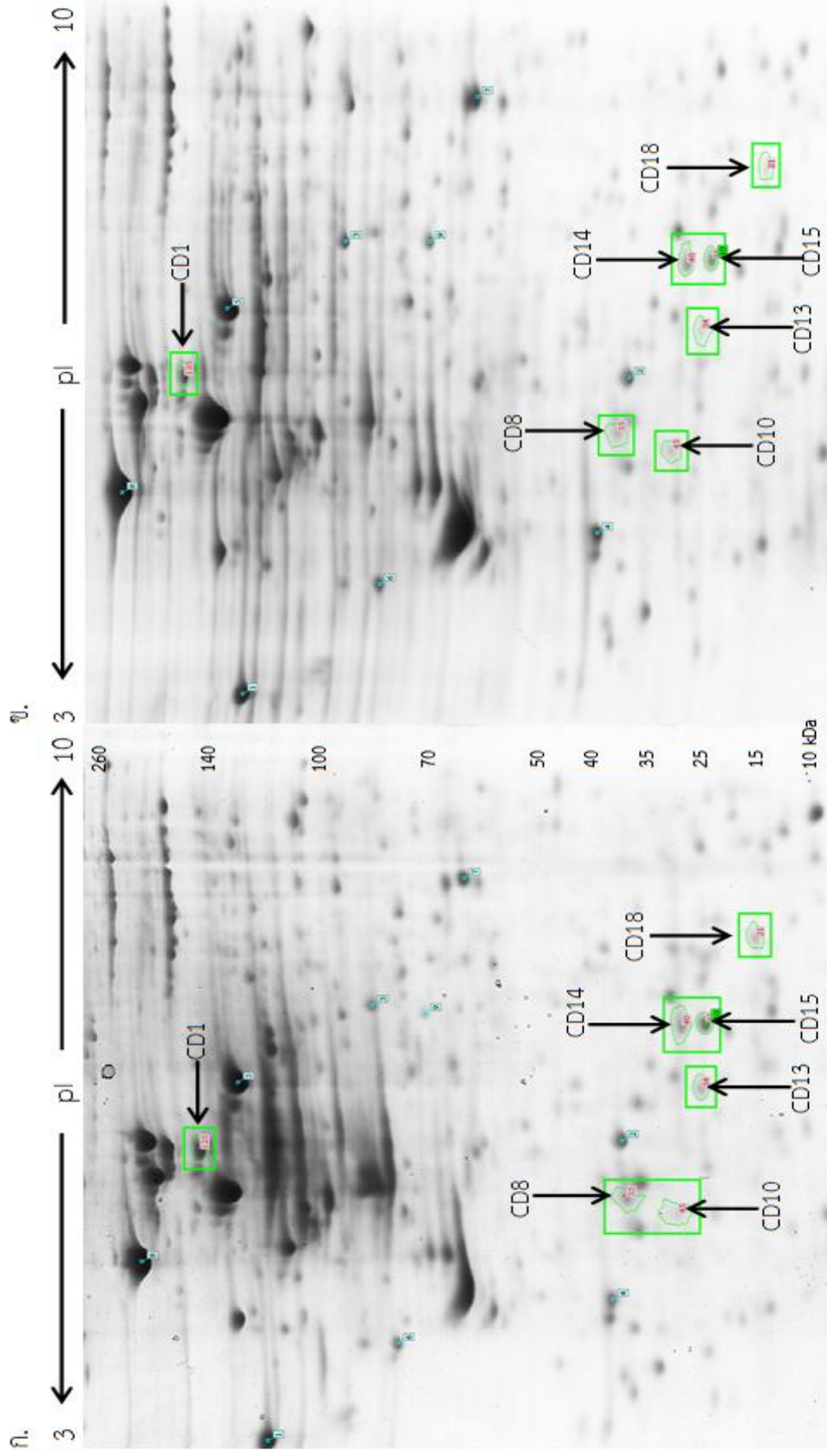
ภาพที่ 4.12 Mass spectrum แสดงการแตกตัวของเปปไทด์ FDGILGMAYPR ที่มีมวลโมเลกุล 1238.6118 $[M+2H]^{2+}$ ซึ่งเป็นเปปไทด์ของโปรตีน cathepsin D.



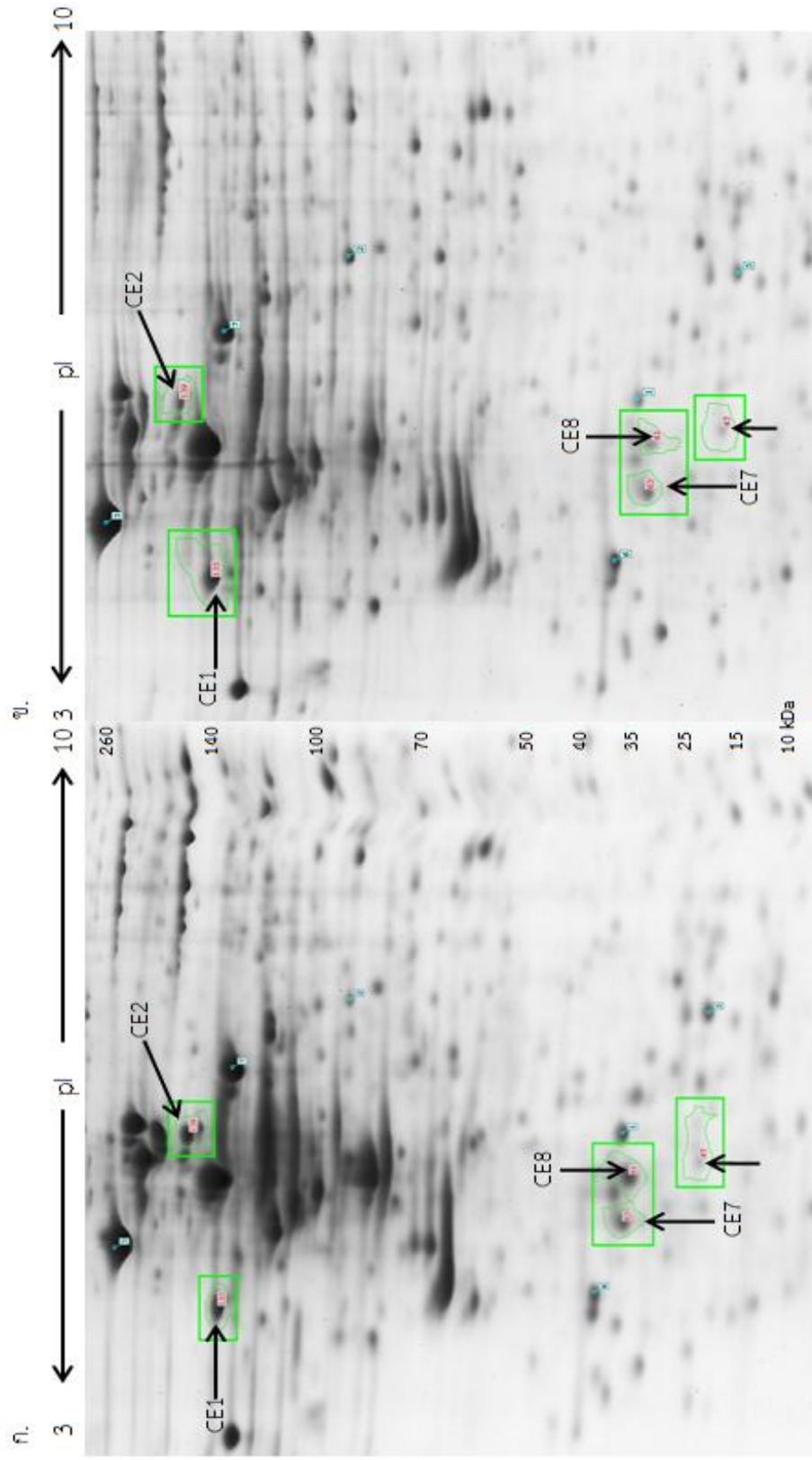
ภาพที่ 4.13 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์คอร์ตาดีในไข่ที่เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลาย ethanol (ข) ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ด้วยเทคนิค 2D-GE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ก)



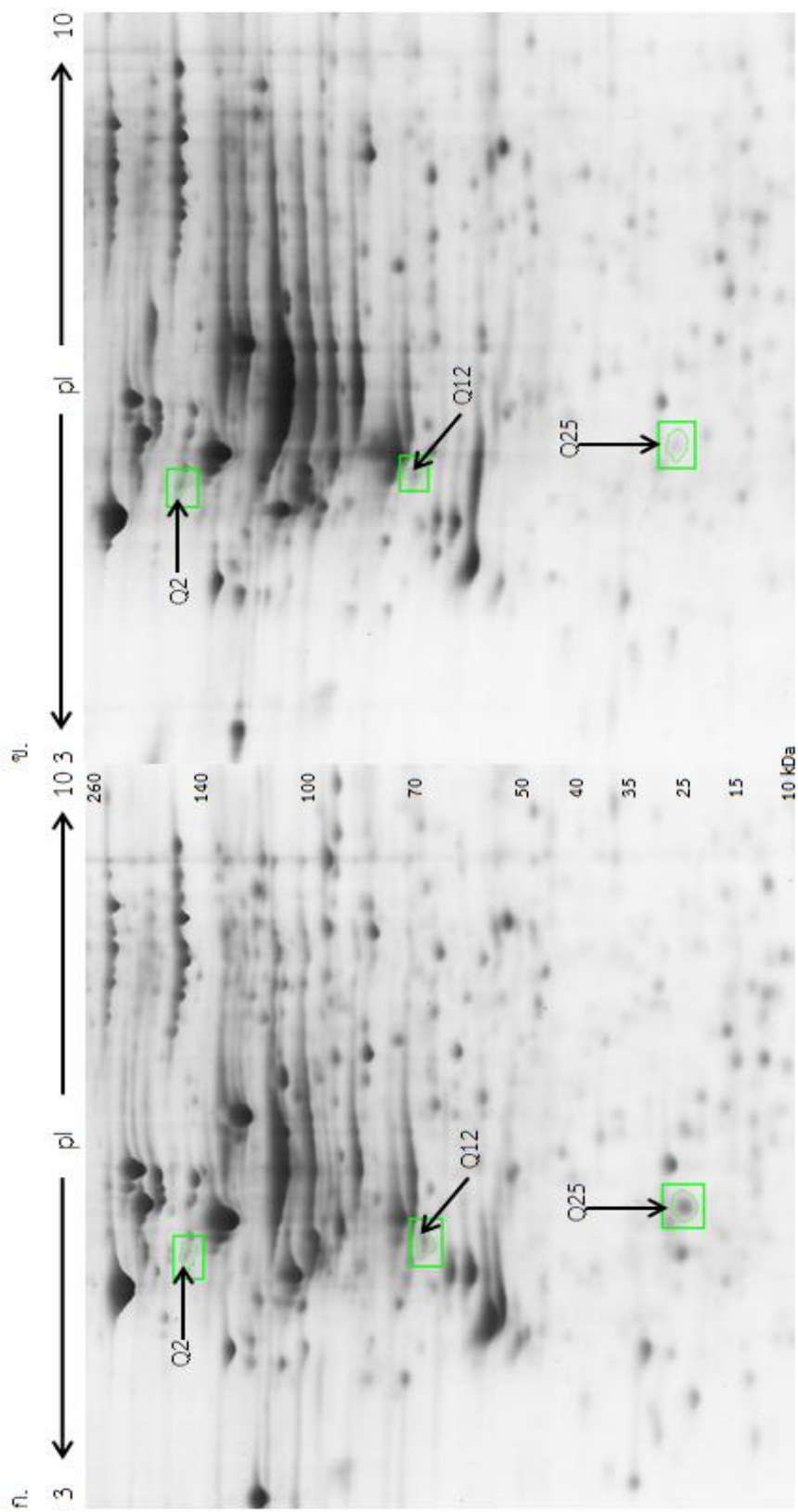
ภาพที่ 4.14 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากตัวทำละลาย petroleum ether (ข) ที่ความเข้มข้น 2.568 µg/mL (IC₅₀) ด้วยเทคนิค 2D-GE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ก)



ภาพที่ 4.15 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์โครมาตินไนต์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลาย dichloromethane (ข) ที่ 2.889 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC₅₀) ด้วยเทคนิค 2D-GE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ก)



ภาพที่ 4.16 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์คอร์ติโคสเตียรอยด์ที่ไม่ใช่เมือกที่ผลิตด้วยสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลาย ethanol (ข) ที่ความเข้มข้น 3.381 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C₅₀) ด้วยเทคนิค 2D-GE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ก)



ภาพที่ 4.17 การแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์คอร์ตาโนไซด์เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้น 125 μM (ข) ด้วยเทคนิค 2D-GE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ก)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่งที่มีอุบัติการณ์เกิดขึ้นได้ทั่วโลก พบได้ทุกเพศ ทุกวัย ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุการเกิดที่แน่ชัด ดังนั้นการรักษาในปัจจุบันจึงเป็นเพียงการรักษาตามอาการของผู้ป่วยเป็นหลัก ซึ่งพบว่าการรักษาในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้ยาทาเฉพาะที่ การให้ยารับประทานทานเพื่อออกฤทธิ์ทั้งระบบของร่างกาย การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต และการใช้ยาชีวภาพ ซึ่งพบว่าวิธีการรักษาดังกล่าวยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ เนื่องจากเกิดการดื้อยาเมื่อใช้เป็นเวลานาน ประกอบกับผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ซึ่งจากการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสมุนไพรไทยที่สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคสะเก็ดเงินโดยคุณวิสาข์ ทองระภาค พบว่ามีสมุนไพรไทย 3 ชนิดซึ่งประกอบด้วย น้อยหน่า ข่า และขมิ้นมีฤทธิ์สามารถยับยั้งโรคสะเก็ดเงินได้ รวมถึงการศึกษาของ Vijayalakshmi และคณะ โดยพบว่าสารเคอควิซิน (quercetin) ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์ พบมากในผัก ผลไม้ และสมุนไพรสามารถนำมาใช้ในการต้านโรคสะเก็ดเงิน

มีรายงานการวิจัยพบว่า การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระและความบกพร่องของระบบการต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในโรคสะเก็ดเงิน กล่าวคือ superoxide dismutase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อมีการลดลงของเอนไซม์ superoxide dismutase ส่งผลทำให้เซลล์ผิวหนังกำพวามีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น [56] นอกจากนี้สภาวะ oxidative stress ยังมีบทบาทในการกระตุ้น NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเป็นสื่อกลางในการหลั่งไซโตไคน์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สำคัญๆ เช่น Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และ Interleukin-6 (IL-6) [57] และทำให้ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น โรคหัวใจ [58, 59] จากรายงานดังกล่าวผู้วิจัยจึงนำสารสกัดสมุนไพรไปทดสอบเพื่อวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดน้อยหน่า ข่า และขมิ้น ซึ่งคาดว่าน่าจะมีบทบาทในการยับยั้งการอักเสบ และการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ในโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี Folin-ciocalteau assay และ Aluminum chloride colorimetric assay ตามลำดับ โดยจากผลการศึกษาพบว่า สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์พบมากที่สุดที่สกัดจากขมิ้น ซึ่งสกัดจากตัวทำละลาย dichloromethane และ ethanol 71.84 ± 2.29 , 64.71 ± 3.19 มิลลิกรัมของแกลลิกและ 775.90 ± 10.30 , 596.00 ± 7.14 มิลลิกรัมของเคอควิซิน รองลงมาคือสารสกัดน้อยหน่า และข่าตามลำดับ แต่ผลการศึกษาโดยใช้วิธี DPPH และ ABTS assay พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของทั้ง 2 วิธีให้ผลไปในทางเดียวกันกับปริมาณของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เฉพาะสารสกัดจากขมิ้นเท่านั้น สำหรับการจำแนกหาชนิดของโปรตีนเป้าหมาย (target protein) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ในโรคสะเก็ดเงิน เมื่อทำการรักษาด้วยสารสกัดน้อยหน่า ข่า ขมิ้น และเคอควิซิน โดยขั้นตอนแรกนั้นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสม คือความเข้มข้นของสารสกัดที่จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยใช้เทคนิค MTT assay ซึ่งจะกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α เพื่อให้เซลล์มีการแสดงออกของ NF- κ B ซึ่งมี

บทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคสะเก็ดเงิน เช่น การอักเสบ (inflammatory) การแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation) พัฒนาการของเซลล์ (differentiation) และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ [60]

สำหรับตัวทำละลายที่เลือกใช้ในการละลายสมุนไพร ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ DMSO เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดทั้งในส่วนของสารที่มีขี้และไม่ขี้ได้ดี แต่ข้อเสียที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยจึงต้องทำการทดสอบหาความเข้มข้นของ DMSO เพื่อให้เป็นเพียงตัวทำละลายเท่านั้น ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์สามารถทน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.00125% ดังนั้นความเข้มข้นเริ่มต้นที่สามารถนำมาใช้ทดสอบได้ต้องไม่เกิน 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบโดยใช้สารสกัดจากน้อยหน่า ข่าและขมิ้นที่ความเข้มข้น 1.5625, 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งมีผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ซึ่งกระตุ้นด้วย TNF- α เพียงอย่างเดียว และพบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้มากที่สุดคือ สารสกัดข่า ซึ่งได้จากตัวทำละลาย petroleum ether ($IC_{50} = 2.568 \mu\text{g/ml}$) รองลงมาคือ สารสกัดขมิ้น ซึ่งได้จากตัวทำละลาย dichloromethane ($IC_{50} = 2.889 \mu\text{g/ml}$) และ ethanol ($IC_{50} = 3.381 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลาย ethanol และสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลาย dichloromethane และ ethanol ให้ผลไปในทางเดียวกันกับผลของการทดสอบด้วยเทคนิค DPPH และ ABTS ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งพบในสารสกัดดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ และจากการทดสอบโดยใช้สารเคอควิซิน (quercetin) ที่ความเข้มข้น 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 125 ไมโครโมลลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลลาร์ สารเคอควิซิน มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ซึ่งกระตุ้นด้วย TNF- α เพียงอย่างเดียว จากข้อมูลข้างต้นทำให้ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งตอบสนองต่อการใช้สารสกัดน้อยหน่า ข่า ขมิ้นและสารเคอควิซิน

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน่า ข่า ขมิ้นและสารเคอควิซิน พบโปรตีนซึ่งเป็นเป้าหมายจำนวน 15 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย cathepsin B, cathepsin D, peroxiredoxin-2, peroxiredoxin-4, enoyl-CoA hydratase, heat shock protein beta-1, endoplasmic reticulum resident protein 29, transitional endoplasmic reticulum ATPase, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K), hnRNP H, hnRNP L, tropomodulin-3, keratin 1 และ protein disulfide isomerase.

Cathepsin เป็นเอนไซม์ protease ชนิดหนึ่ง มักมีการแสดงมากในเซลล์มะเร็ง โดยมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเส้นเลือด (angiogenesis) การแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation) การเจริญเติบโตของเซลล์ (growth) และการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง (invasion) [61]

และสำหรับการศึกษาคั้งนี้พบว่า cathepsin B เป็นโปรตีนเป้าหมายชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็น lysosomal cysteine protease การลดการแสดงออกของโปรตีน cathepsin B เป็นสาเหตุทำให้ DNA เกิดความเสียหาย นำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis [62] และสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ HEC-1A ดังนั้น cathepsin B จึงเป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษามะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก [63] เช่นเดียวกับ cathepsin D ซึ่งเป็น lysosomal aspartyl protease มีหลากหลายหน้าที่ โดยเฉพาะบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองการตายแบบ apoptosis ซึ่งพบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ cathepsin D ส่งผลทำให้เซลล์มะเร็งล่าช้าและมะเร็งปอดตายแบบ apoptosis [61, 64].

Peroxiredoxin-4 มักจะมีการแสดงออกสูงขึ้นในมะเร็งต่อมลูกหมาก ปอดและกระดุก โดยพบว่าเมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ Peroxiredoxin-4 จะมีผลทำให้เซลล์ Glioblastoma (เซลล์มะเร็งสมอง) ยับยั้งการแบ่งตัว เกิดการแตกหักของ DNA นำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis [65] และนอกจากนี้โปรตีนดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B [66] ซึ่งเป็น biomarker สำคัญของโรคมะเร็ง [67]

Peroxiredoxin-2 มีบทบาทในการควบคุม androgen/androgen receptor (AR) ซึ่งเป็น signaling pathway สำคัญในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก และอาจมีการนำไปสู่การพัฒนาเพื่อใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษามะเร็งต่อมลูกหมาก เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ Peroxiredoxin-2 จะไปลดการแสดงออกของยีน androgen ส่งผลให้ลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก นั้นแสดงให้เห็นว่า Peroxiredoxin-2 มีบทบาทสำคัญในการแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation) [68]

Enoyl-CoA hydratase (ECHS1) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ β -oxidation pathway ในการเผาผลาญไขมัน โดยที่เอนไซม์ ECHS1 จะอยู่ในชั้น matrix ของ mitochondria มีรายงานการวิจัยพบว่าเอนไซม์ ECHS1 มีการแสดงออกในระดับที่สูงมากในเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งสอดคล้องกับงานค้นพบของ Xiang Liu และคณะ ซึ่งพบว่าเมื่อเอนไซม์ ECHS1 ลดการแสดงออกลง ส่งผลให้เซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการตายแบบ apoptosis ภาย หลัง การ ทด ส อ บ ด้วย 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo [3,4-d]pyrimidine [69].

Heat shock protein beta-1 หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า heat shock protein 27 (hsp27) เป็นปัจจัยสำคัญในการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยการรบกวนการทำงานของ caspase complex ซึ่งสอดคล้องกับการค้นพบของ Yasuhiro Kuramitsu ซึ่งรายงานว่าความบกพร่องของ hsp27 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis [70] และนอกจากนี้ hsp27 ยังมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B อีกด้วย โดยเพิ่มการผลิตไซโตไคน์ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบ [71] และเพิ่มการแสดงออกของ Bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ THP-1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของ promonocytic leukemia [72]

Endoplasmic reticulum resident protein 29 (ERp29) เป็นโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้ endoplasmic reticulum (ER) เกิดภาวะ stress พบมากในเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีรายงานการวิจัยพบว่าหากเพิ่มการแสดงออกของ ERp29 จะส่งผลทำให้เซลล์ MDA-MB-231 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมมีการแบ่งตัวเพิ่มสูงขึ้น [73] และนอกจากนี้พบว่า ERp29 มีบทบาทในการควบคุม hsp27 [74] ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการกระตุ้น NF- κ B และ anti-apoptotic protein [70]

ATP synthase subunit alpha มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งเต้านมพบว่าเมื่อมีการลดการแสดงออกของ ATP synthase subunit alpha มีผลทำให้การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และการบุกรุกไปยังอวัยวะอื่นๆ ในเซลล์ MDA-MB-231 และ MCF10F ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านม และนอกจากนี้การแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็น biomarker สำหรับการวินิจฉัย การทำนายโรค และสามารถนำมาใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษาได้อีกด้วย [75]

Transitional endoplasmic reticulum ATPase หรือเป็นที่รู้จักในชื่อ valosin-containing protein (VCP) ซึ่งเป็น ATP-binding proteins มีรายงานการศึกษาพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ SH-SY5Y (เซลล์มะเร็งของระบบประสาทในเด็ก) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ตอบสนองเมื่ออยู่ในสภาวะที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้ตายแบบ apoptosis [76]

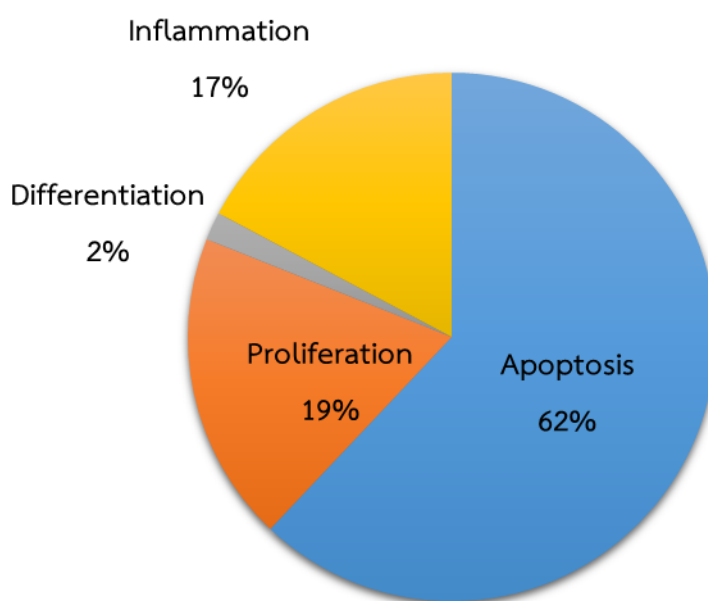
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein เป็น RNA-protein complexes อยู่ในนิวเคลียสมีบทบาทเกี่ยวกับ gene transcription และ post-transcriptional modification ของ pre-mRNA โดยทำหน้าที่ป้องกันการ folding ของ pre-mRNA ไปสู่ secondary structures และขนส่ง mRNA ออกจากนิวเคลียส มีรายงานการวิจัยพบว่า Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของ Caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนในกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (common pathway) ระดับโปรตีน hnRNP K จะลดการแสดงออกในช่วงการ differentiate ของเซลล์เม็ดเลือดแดง [77] นอกจากนี้แล้ว hnRNP K มีการแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งตับ และมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง โดยการยับยั้งการทำงานของ caspase ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Feng-Hou Gao และคณะพบว่าเมื่อลดการแสดงออกของโปรตีน hnRNP K จะกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis [78] จากข้อมูลดังกล่าวโปรตีน hnRNP K จึงถูกนำมาใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการรักษา มะเร็งตับ [79] เช่นเดียวกับโปรตีน hnRNP H ซึ่งมีการแสดงออกในระดับสูงในมะเร็งตับ ตับอ่อนและกล่องเสียง เมื่อลดการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวก็จะกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ได้เช่นกัน [80] และโปรตีน hnRNP L พบว่ามีบทบาทสำคัญในกระบวนการ differentiate และ migration ของ T-cell [81]

Tropomodulin-3 (Tmod-3) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการจับกับส่วนปลายของ actin มีรายงานการวิจัยพบว่า Tmod-3 มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการ migration และ proliferation [82]

Keratin, type II cytoskeletal 1 หรือ Keratin 1 (KRT1) เป็นโปรตีนที่พบในเซลล์ผิวหนังชั้นบน โดยที่ KRT1 จะจับกับ KRT10 เกิดเป็น intermediate filaments ในเซลล์เคอราติโนไซต์ [83] มีรายงานการวิจัยพบว่า KRT1 มีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบของโรคผิวหนัง โดยที่เซลล์เคอราติโนไซต์จะหลั่งไซโตไคน์เกี่ยวกับการอักเสบ เช่น IL-18 และ IL-33 [84]

Protein disulfide-isomerase (PDI) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum (ER) และไมโทคอนเดรียมีรายงานการวิจัยพบว่าการยับยั้ง PDI มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการปล่อย cytochrome c ออกจากไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการกระตุ้นการทำงานของ caspase ในกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ ดังนั้น PDI จึงเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ [85] จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้อยหน้า

ข้าว ขมิ้นและสารเคอเวอซิทินสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้โดยอาศัยโปรตีนเป้าหมายดังกล่าวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง cathepsin D ซึ่งพบว่าเป็นโปรตีนเป้าหมายร่วม (common target protein) ที่ตอบสนองต่อการใช้สารสกัดน้อยหน้า ข้าว ขมิ้นและสารเคอเวอซิทินในการรักษาโรคมะเร็งและเมื่อจัดกลุ่มโปรตีนพบว่ามีโปรตีน 4 ประเภท ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนที่มีบทบาทต่อกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (62%) การแบ่งตัวของเซลล์ (Proliferation) (19%) การอักเสบ (Inflammation) (17%) และพัฒนาการของเซลล์ (differentiation) (2%) ดังภาพที่ 5.1



ภาพที่ 5.1 แสดงร้อยละของโปรตีนเป้าหมายซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดน้อยหน้า ข้าว ขมิ้น และสารเคอเวอซิทิน

จากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจเกี่ยวกับกลไกการแสดงออกของโปรตีนที่ตอบสนองต่อการรักษาโรคมะเร็งด้วยสารสกัดสมุนไพรไทยและสารเคอเวอซิทิน ซึ่งองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปต่อยอดการวิจัยเพื่อพัฒนาออกแบบตัวยา (drug design) ที่มีอยู่ในสารสกัดสมุนไพรเพื่อนำมารักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งให้เกิดประสิทธิภาพโดยอาศัยโปรตีนเป้าหมาย (target protein) ซึ่งค้นพบจากการศึกษาครั้งนี้ อีกทั้งทำให้ผู้ป่วยมีแนวทางในการรักษาเพิ่มมากขึ้นและเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่สมุนไพรไทยอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งผู้วิจัยใช้วิธีสกัดโดย soxhlet apparatus ซึ่งได้สารสกัดแบบชนิดหยาบ (crude extracts) ดังนั้นควรเพิ่มวิธีการสกัดสารเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์โดยการใช้เทคนิคทาง chromatography เช่น column chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อจะทำให้ทราบถึงสารออกฤทธิ์ (active compound) ที่แท้จริงที่สามารถยับยั้งเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ และสำหรับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-GE ควรมีการเตรียมตัวอย่างที่ดีและสำหรับการเตรียมตัวอย่างที่ดีของ 2D-GE ในอุดมคติ นั่นคือโปรตีนจะต้องละลายได้ดีในตัวทำละลาย (lysis solution) ไม่มีการเกาะกลุ่มกัน ตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนจากอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) อาจจะมีการปนเปื้อนจากโปรตีนที่มีปริมาณมาก (abundance protein) ซึ่งผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะไปรบกวนการแยกโปรตีนในระยะแรก จากผลการทดลองพบว่าในแผ่นเจลมี abundance protein ในช่วงมวลโมเลกุล 40-70 kDa (Mw) ซึ่งจะไปบดบังจุดโปรตีนอื่นๆ ทำให้ยากในการวิเคราะห์ นอกจากนี้แล้วควรมีการตรวจเพื่อยืนยันผลเพิ่มเติม เช่น การใช้เทคนิค RT-PCR หรือ western blot เพื่อดูความสอดคล้องว่ามีการเพิ่มมากขึ้นหรือลดลงจริง

รายการอ้างอิง

- [1]. Gudjonsson JE, Johnston A, and E. CN., Novel systemic drugs under investigation for the treatment of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology.*, 2012. 67(1): p. 139-47.
- [2]. Canavese M, et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of psoriasis--a possible target for novel therapies? *Journal of Dermatological Science*, 2010 58(3): p. 171-6.
- [3]. IanMcDonald, Maureen Connolly, and A.-M. Tobin., A Review of Psoriasis, a Known Risk Factor for Cardiovascular Disease and Its Impact on Folate and HomocysteineMetabolism. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012.
- [4]. Agrawal, Y., K.C. Petkar, and K.K. Sawant, Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *Int J Pharm*, 2010. 401(1-2): p. 93-102.
- [5]. รัตนี อัครพันธุ์ และคณะ., โครงการลงทะเบียนผู้ป่วยสะเก็ดเงินในประเทศไทย. สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. , 2550.
- [6]. นภดล นพคุณ, โรดสะเก็ดเงิน. สมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย [online]. Available from: <http://www.dst.or.th/html/index.php?op=article-detail&id=153&csid=8&cid=23>. [2013, May 4].
- [7]. Phochanapan K, Quality of Life in Psoriasis. *Bulletin of the Department of Medical Services*, 2005. 30(6): p. 335-43.
- [8]. Yogeeta Agrawal, Kailash C. Petkar, and K.K. Sawant., Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. 401: p. 93-102.
- [9]. Raut AS, Prabhu RH, and P. VB., Psoriasis clinical implications and treatment: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* , 2013. 30(3): p. 183-216.

- [10]. Visa Thongrakard, Screening of Thai medicinal plant extracts for in vitro anti-psoriatic activity. Master's degree thesis, Chulalongkorn University: Bangkok, Thailand. 2009.
- [11]. Vijayalakshmi A, et al., Screening of flavonoid "quercetin" from the rhizome of Smilax china Linn. for anti-psoriatic activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012: p. 269-275.
- [12]. Ronpirin, C. and T. Tencomnao, Effects of the antipsoriatic drug dithranol on E2A and caspase-9 gene expression in vitro. Genet Mol Res, 2012. 11(1): p. 412-20.
- [13]. Kristine E, Nograles, and J.G. Krueger., Anti-cytokine therapies for psoriasis. Experimental cell research, 2011. 317: p. 1293 - 1300.
- [14]. National Psoriasis Foundation/USA. About psoriasis. [online]. Available from: <https://www.psoriasis.org/about-psoriasis/types>. [2013, January 12].
- [15]. นภดล นพคุณ และคณะ., แนวทางการดูแลผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) สมาคมแพทย์ผิวหนังแห่งประเทศไทย, 2010: p. 93-126.
- [16]. Syed, Z.U. and A. Khachemoune, Inverse psoriasis: case presentation and review. Am J Clin Dermatol, 2011. 12(2): p. 143-6.
- [17]. Gladman, D.D., Early psoriatic arthritis. Rheum Dis Clin North Am, 2012. 38(2): p. 373-86.
- [18]. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร. ภูมิคุ้มกันของโรคสะเก็ดเงิน. [online]. Available from: <http://www.cai.md.chula.ac.th/lesson/lesson4806/html/p08.html>. [2013, May 6].
- [19]. Michailidis C, et al., notch2, notch4 gene polymorphisms in psoriasis vulgaris. Eur J Dermatol. , 2013 23(2): p. 146-53.
- [20]. ELDER, P.R.a.J.T., Genetics of Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Report from the GRAPPA 2010 Annual Meeting. The Journal of Rheumatology, 2012. 39(2): p. 431-433.
- [21]. Maria Carlstrom, et al., Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. Experimental Dermatology, 2012. 21: p. 932-937.

- [22]. Višnja Milavec-Puretić, et al., Drug Induced Psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2011. 19(1): p. 39-42.
- [23]. Telfer, N.R., et al., The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch Dermatol*, 1992. 128(1): p. 39-42.
- [24]. Weisenseel, P., et al., Streptococcal infection distinguishes different types of psoriasis. *J Med Genet*, 2002. 39(10): p. 767-8.
- [25]. Ferran, M., et al., Streptococcus induces circulating CLA(+) memory T-cell-dependent epidermal cell activation in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2013. 133(4): p. 999-1007.
- [26]. Besgen P, et al., Ezrin, maspin, peroxiredoxin 2, and heat shock protein 27: potential targets of a streptococcal-induced autoimmune response in psoriasis. *J Immunol.*, 2010. 184(9): p. 5392-402.
- [27]. Carrascosa JM, Plana A, and F. C., Effectiveness and Safety of Psoralen-UVA (PUVA) Topical Therapy in Palmoplantar Psoriasis: A Report on 48 Patients. *Actas Dermosifiliogr*, 2013. 104(5): p. 418-425.
- [28]. Rahman, M., et al., Classical to current approach for treatment of psoriasis: a review. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2012. 12(3): p. 287-302.
- [29]. Dauden, E., et al., Clinical practice guideline for an integrated approach to comorbidity in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2012.
- [30]. Saelee, C., V. Thongrakard, and T. Tencomnao, Effects of Thai medicinal herb extracts with anti-psoriatic activity on the expression on NF-kappaB signaling biomarkers in HaCaT keratinocytes. *Molecules*, 2011. 16(5): p. 3908-32.
- [31]. Thitiporn Charueksereesakul, Visa Thongrakard, and T. Tencomnao., In Vitro Effect of Thai herbal extracts with anti-psoriatic activity on the expression of caspase 9. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Researchs*, 2011. 3(4): p. 196-203.
- [32]. ข้อมูลพรรณไม้ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี [online]. Available from: http://www.rspg.or.th/plants_data/pdata_04.htm. [2013, June 2].

- [33]. Vishal Kumar Soni, et al., N-methyl-6, 7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice. *Fitoterapia*, 2012. 83: p. 110-116.
- [34]. Saha, R., Pharmacognosy and pharmacology of *Annona squamosa*: A review. *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)* 2011. 2(10): p. 1183-1189.
- [35]. Kaur A, et al., Antileishmanial phenylpropanoids from *Alpinia galanga* (Linn.) Willd. *Indian J Exp Biol.* , 2010 48(3): p. 314-7.
- [36]. กลุ่มยารักษาโรคผิวหนัง ผื่นคัน กลากเกลื้อน [online]. Available from: http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_02_1.htm. [2013, June 15].
- [37]. AK Chudiwal, DP Jain, and R. Somani, *Alpinia galanga* Willd.-An overview on phyto-pharmacological proerties. *Indian Journal of Nature Product and Resources*, 2010. 1(2): p. 143-149.
- [38]. LEELAVINOTHAN PARI, DANIEL TEWAS, and J. ECKEL., Role of curcumin in health and disease. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2008. 114(2): p. 127 - 149.
- [39]. Zhang Yuan, et al., Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt. *Mol Biol Rep*, 2012. 39: p. 7785-7793.
- [40]. Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya, Form Two-dimensional electrophoresis (2-DE) to Clinical Proteomics Research. *J Med Tech Assoc Thailand*, 2011. 39(3): p. 3870-3886.
- [41]. Piruzian, E., et al., Integrated network analysis of transcriptomic and proteomic data in psoriasis. *BMC Syst Biol*, 2010. 4: p. 41.
- [42]. Chang, T., et al., Inhibition of keratin 17 expression with antisense and RNAi strategies: exploring novel therapy for psoriasis. *Exp Dermatol*, 2011. 20(7): p. 555-60.
- [43]. Ryu, J., et al., Proteomic analysis of psoriatic skin tissue for identification of differentially expressed proteins: up-regulation of GSTP1, SFN and PRDX2 in psoriatic skin. *Int J Mol Med*, 2011. 28(5): p. 785-92.
- [44]. Soxhlet apparatus [online]. Available from: <http://buymarijuanaseeds.com/community/attachments/soxhletextractor-gif.164247/>. [2013, June 25].

- [45]. พยุงศักดิ์ ต้นติไพบูลย์วงศ์, การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอชและการฟอกสีอนุมูลเอบีทีเอส. 2555, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยาร่วมกับสมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย.
- [46]. Mitra, I., A. Saha, and K. Roy, Chemometric modeling of free radical scavenging activity of flavone derivatives. *Eur J Med Chem*, 2010. 45(11): p. 5071-9.
- [47]. ROBERTA RE, et al., ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999. 26: p. 1231-1237.
- [48]. Hanane El Hajaji, et al., Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco. *Rec. Nat. Prod.*, 2010. 4(4): p. 193-204.
- [49]. Ana Zulueta, Maria J. Esteve, and A. Frigola., ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 2009. 114: p. 310-316.
- [50]. Nattakarn Nooron, Hypoglycemic effects of *Pandanus amaryllifolius roxb.* leaf extract. Master's degree thesis, Chulalongkorn University: Bangkok, Thailand., 2010.
- [51]. Visa Thongrakard and T. Tencomnao., Modulatory effects of Thai medicinal plant extract on proinflammatory cytokines-induced apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. *African Journal of Biotechnology*, 2010. 9(31): p. 4999-5003.
- [52]. Duval, R.E., et al., Interest of designed cyclodextrin-tools in gene delivery. *Ann Pharm Fr*, 2012. 70(6): p. 360-9.
- [53]. Bradford assay. [online]. Available from: <http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm>. [2013, July 14]
- [54]. Principle of 2-Dimensional Gel Electrophoresis (2D-GE). [online]. Available from: [http://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_Electrophoresis/Two_Dimensional_Polyacrylamide_Gel_Electrophoresis\(2D-PAGE\)](http://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_Electrophoresis/Two_Dimensional_Polyacrylamide_Gel_Electrophoresis(2D-PAGE)). [2013, July 14]
- [55]. Principle of mass spectrometry. [online]. Available from: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html. [2013, July 15]

- [56]. Kadam DP, et al., Role of oxidative stress in various stages of psoriasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2010. 25(4): p. 388-392.
- [57]. Munoz, A. and M. Costa, Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. 2013: p. 610950.
- [58]. Bacchetti, T., et al., Oxidative stress and psoriasis: the effect of antitumour necrosis factor-alpha inhibitor treatment. *Br J Dermatol*, 2013. 168(5): p. 984-9.
- [59]. Chu, T.W. and T.F. Tsai, Psoriasis and cardiovascular comorbidities with emphasis in Asia. *G Ital Dermatol Venereol*, 2012. 147(2): p. 189-202.
- [60]. Goldminz, A.M., et al., NF-kappaB: an essential transcription factor in psoriasis. *J Dermatol Sci*, 2013. 69(2): p. 89-94.
- [61]. Marques, C., et al., Acetate-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin D release. *Cell Death Dis*, 2013. 4: p. e507.
- [62]. Malla, R.R., et al., uPAR and cathepsin B inhibition enhanced radiation-induced apoptosis in gliomaintiating cells. *Neuro Oncol*, 2012. 14(6): p. 745-60.
- [63]. Bao, W., et al., Silencing of Cathepsin B suppresses the proliferation and invasion of endometrial cancer. *Oncol Rep*, 2013. 30(2): p. 723-30.
- [64]. Chuifeng Fan, Xuyong Lin, and E. Wang., Clinicopathological significance of cathepsin D expression in non-small cell lung cancer is conditional on apoptosisassociated protein phenotype: an immunohistochemistry study. *Tumor Biol.*, 2012. 33: p. 1045-1052.
- [65]. Kim, T.H., et al., Suppression of peroxiredoxin 4 in glioblastoma cells increases apoptosis and reduces tumor growth. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42818.
- [66]. Yoshihito IUCHI, et al., Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem. J.*, 2009. 419: p. 149-158.
- [67]. Chanachai Saelee, Visa Thongrakard, and T. Tencomnao., Effects of Thai Medicinal Herb Extracts with Anti-Psoriatic Activity on the Expression on NF- κ B Signaling Biomarkers in HaCaT Keratinocytes. *Molecules*, 2011. 16: p. 3908-3932.

- [68]. Masaki Shiota, et al., Peroxiredoxin 2 in the nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011. 51: p. 78-87.
- [69]. Xiang Liu, Renqing Feng, and L. Du., The role of enoyl-CoA hydratase short chain 1 and peroxiredoxin 3 in PP2-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *FEBS Letters* 2010. 584: p. 3185-3192.
- [70]. Kuramitsu., Y., Is HSP27 a Key Molecule or a Biomarker of Cancers? . *Gastrointestinal & Digestive System*, 2012. 2(1).
- [71]. Samira Salari, et al., Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF- κ B in macrophages. *Cell Stress and Chaperones*, 2013. 18: p. 53-63.
- [72]. Kaigorodova, E.V., et al., Effects of HSP27 chaperone on THP-1 tumor cell apoptosis. *Bull Exp Biol Med*, 2012. 154(1): p. 77-9.
- [73]. Gao D, et al., ERp29 induces breast cancer cell growth arrest and survival through modulation of activation of p38 and upregulation of ER stress protein p58IPK. *Laboratory Investigation* 2012. 92: p. 200-213.
- [74]. Lin Qi, et al., Inhibiting ERp29 expression enhances radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Med Oncol*, 2012. 29: p. 721–728.
- [75]. Jian Pan, et al., ATP synthase ecto-a-subunit: a novel therapeutic target for breast cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2011. 9(211).
- [76]. Duncan M. Short lan D, et al., Apoptosis induced by staurosporine alters chaperone and endoplasmic reticulum proteins: Identification by quantitative proteomics. *Proteomics*, 2007. 7: p. 3085-3096.
- [77]. Naarmann-de Vries, I.S., et al., Caspase-3 cleaves hnRNP K in erythroid differentiation. *Cell Death Dis*, 2013. 4: p. e548.
- [78]. Feng-Hou Gao, et al., Protein Kinase C- δ mediates down-regulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein: involvement in apoptosis induction. *Experimental cell research*, 2009. 315: p. 3250 - 3258.

- [79]. Ziwei Xiao, et al., hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors. *Carcinogenesis* 2013: p. 1-10.
- [80]. Jens Rauch, et al., Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H Blocks MST2-Dependent Apoptosis in Cancer Cells via Regulation of A-Raf transcription. *Cancer Res.* , 2010. 70(4): p. 1679-1688.
- [81]. Gaudreau, M.C., et al., Alternative splicing controlled by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L regulates development, proliferation, and migration of thymic pre-T cells. *J Immunol*, 2012. 188(11): p. 5377-88.
- [82]. Fischer, R.S., K.L. Fritz-Six, and V.M. Fowler, Pointed-end capping by tropomodulin3 negatively regulates endothelial cell motility. *J Cell Biol*, 2003. 161(2): p. 371-80.
- [83]. Han, M., et al., Alleles of keratin 1 in families and populations. *Hum Immunol*, 2013.
- [84]. Wera Roth, et al., Keratin 1 maintains skin integrity and participates in an inflammatory network in skin through interleukin-18. *Journal of Cell Science*, 2012. 125(22): p. 5269-5279.
- [85]. Benjamin G. Hoffstrom, et al., Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol.*, 2010. 6(12): p. 900-906.
- [86]. In-Sung Song, et al., Mitochondrial Peroxiredoxin III is a Potential Target for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011. 12: p. 7163-7185.



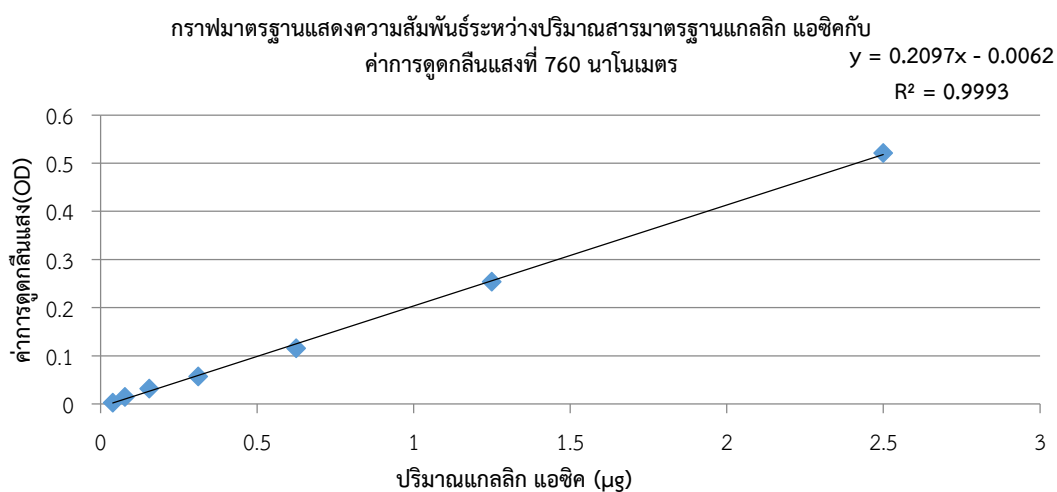
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

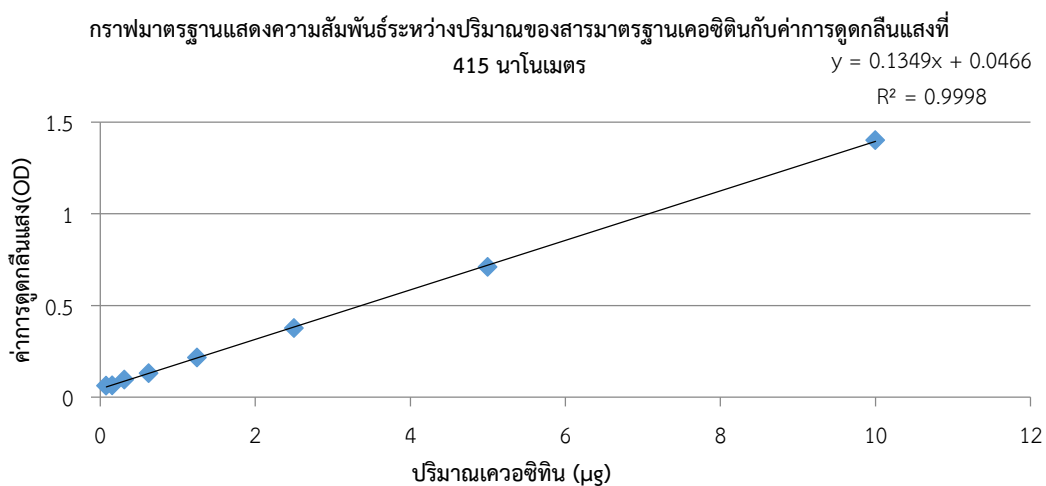
ภาคผนวก ก

ข้อมูลจากการทดลอง

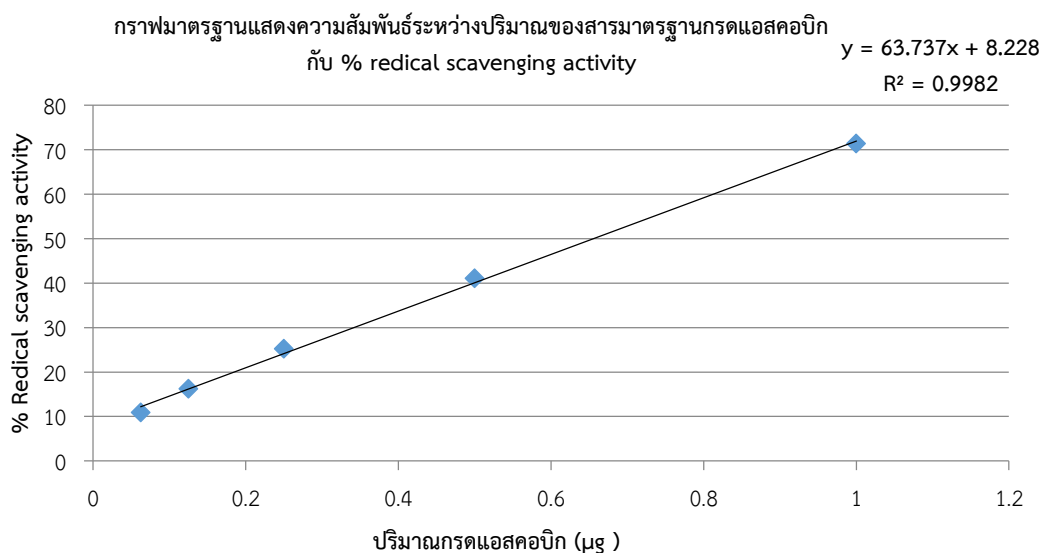
1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดน้อยหน้า ข้าและขมิ้น



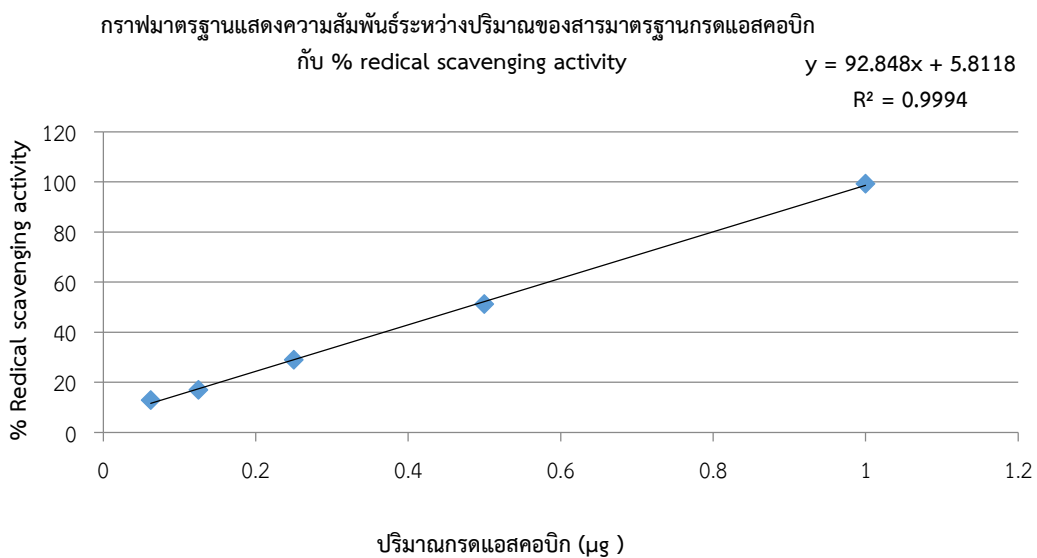
2. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดน้อยหน้า ข้าและขมิ้น



3. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดน้อยหน้า ข้าและขมิ้น
โดยวิธี DPPH assay

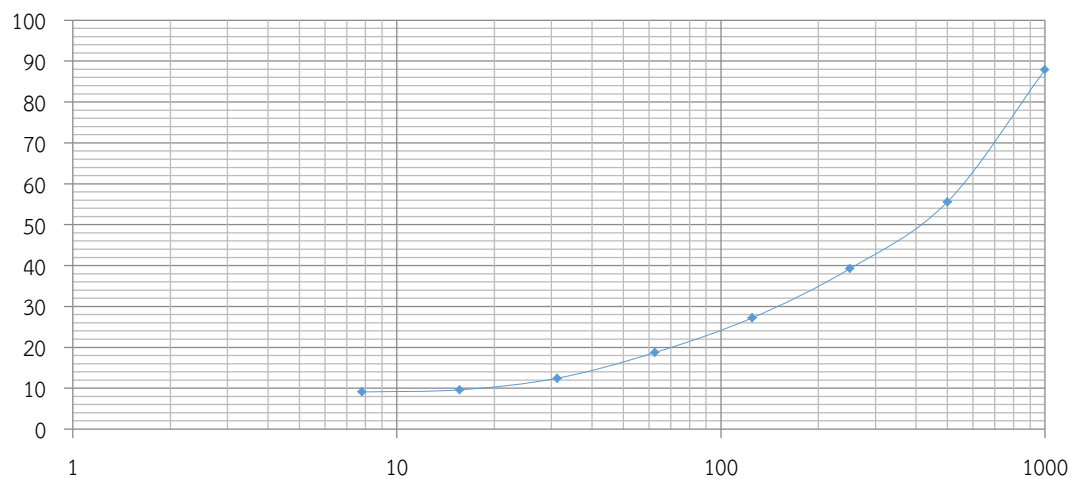


4. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดน้อยหน้า ข้าและขมิ้น
โดยวิธี ABTS assay



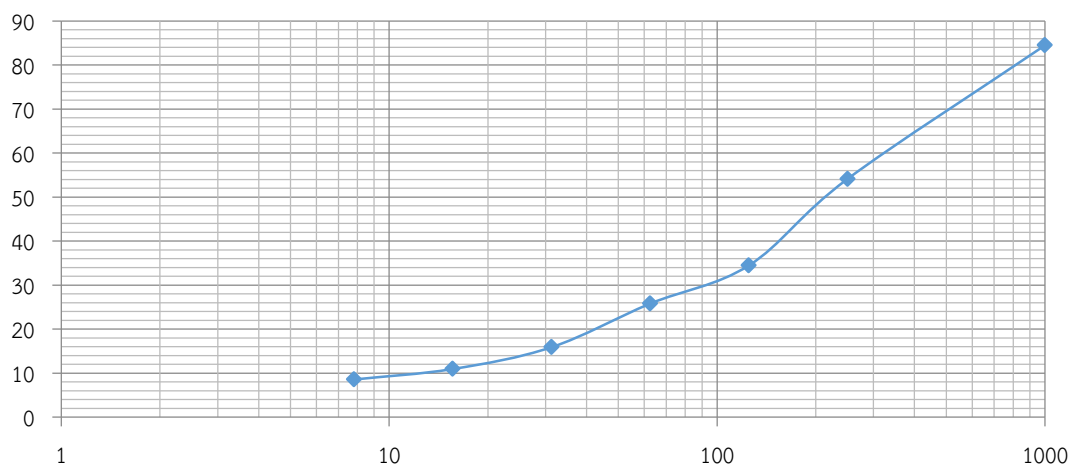
5. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นด้วยตัวทำละลาย dichloromethane โดยวิธี DPPH assay.

กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของ *Curcuma longa* (DCM) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % scavenging



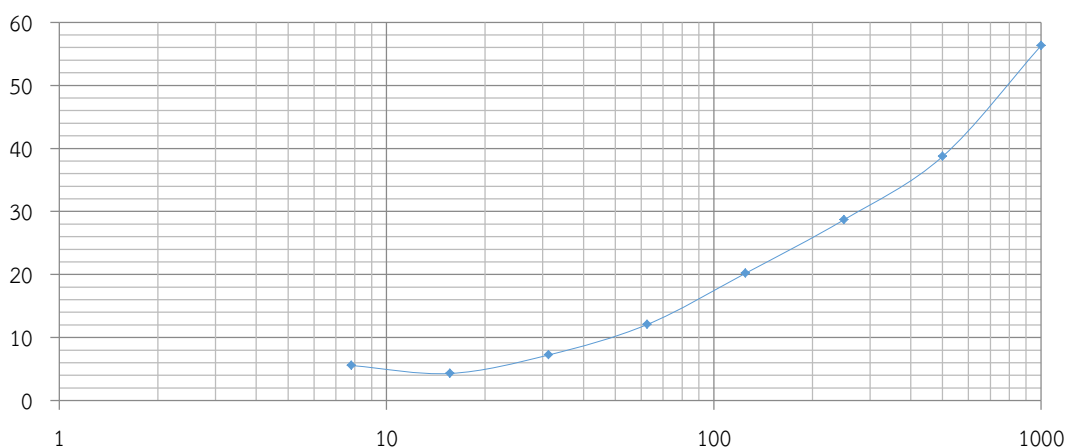
6. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยวิธี DPPH assay.

กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของ *Curcuma longa* (ETH) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % scavenging



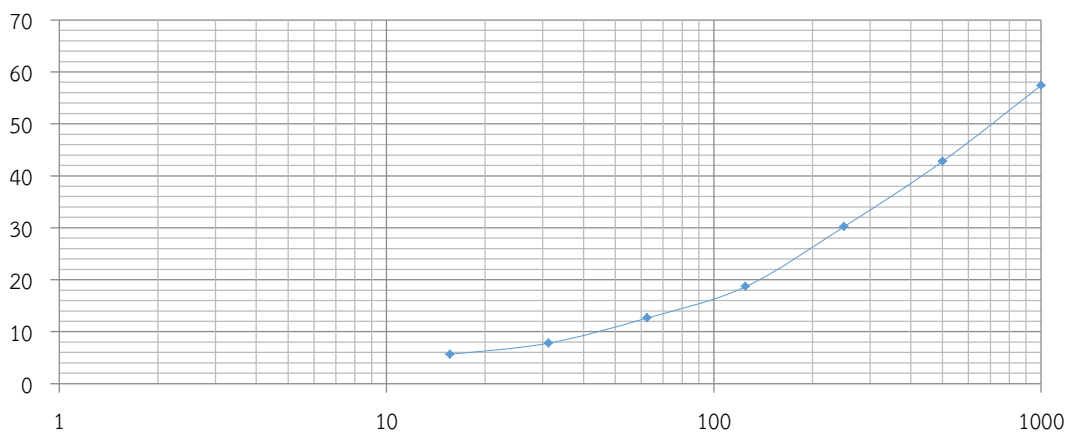
7. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดน้อยหน้าด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยวิธี ABTS assay.

กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของ *Annona squamosa* (ETH) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % scavenging



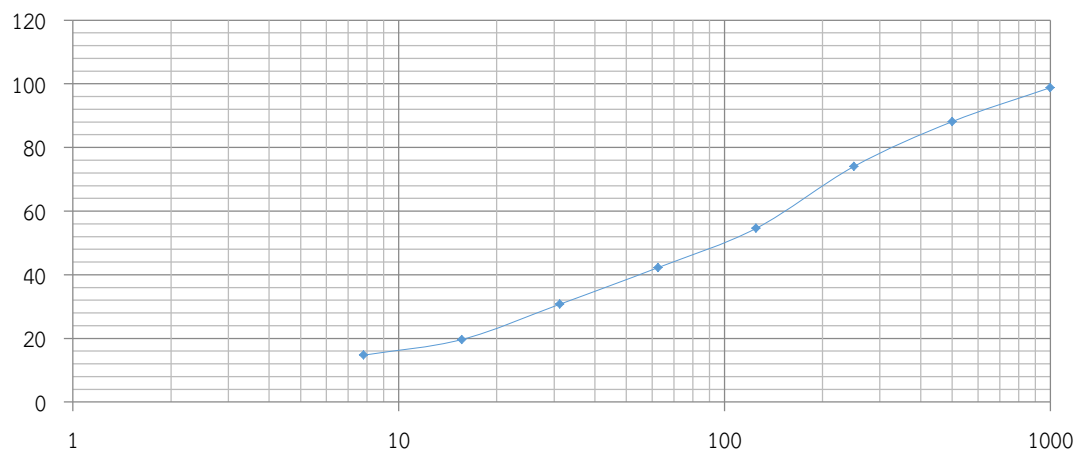
8. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดข่าด้วยตัวทำละลาย dichloromethane โดยวิธี ABTS assay.

กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของ *Alpinia galanga* (DCM) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % scavenging



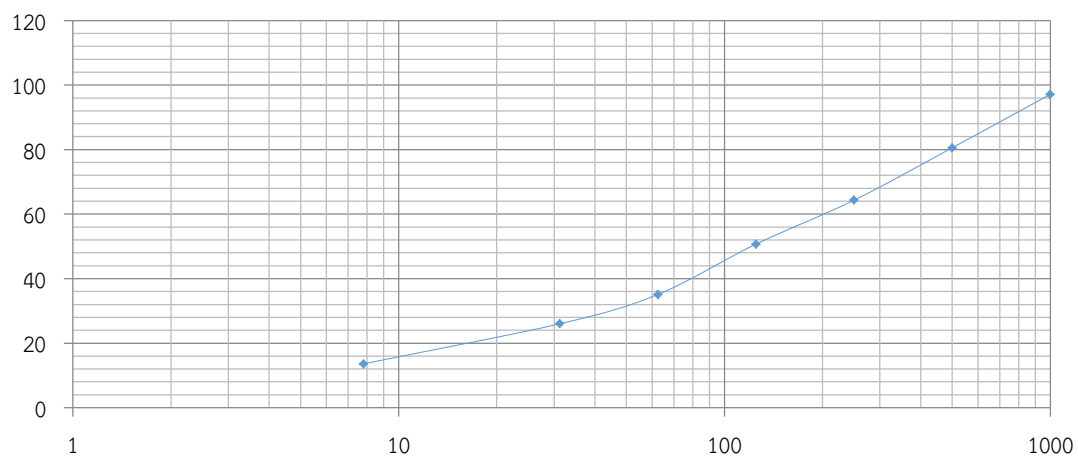
9. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นด้วยตัวทำละลาย dichloromethane โดยวิธี ABTS assay.

กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของ *Curcuma longa* (DCM) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % scavenging

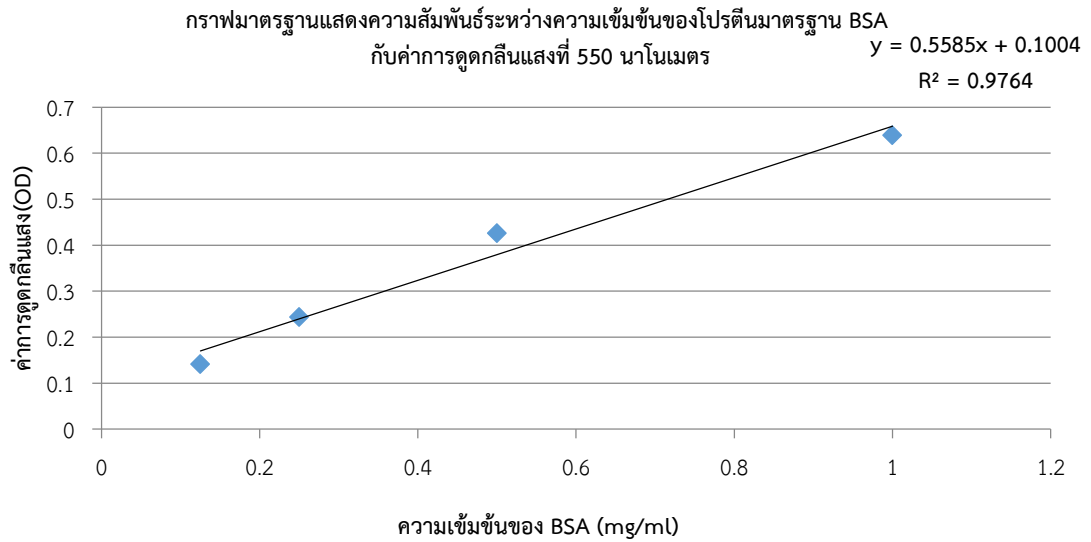


10. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นด้วยตัวทำละลาย ethanol โดยวิธี ABTS assay.

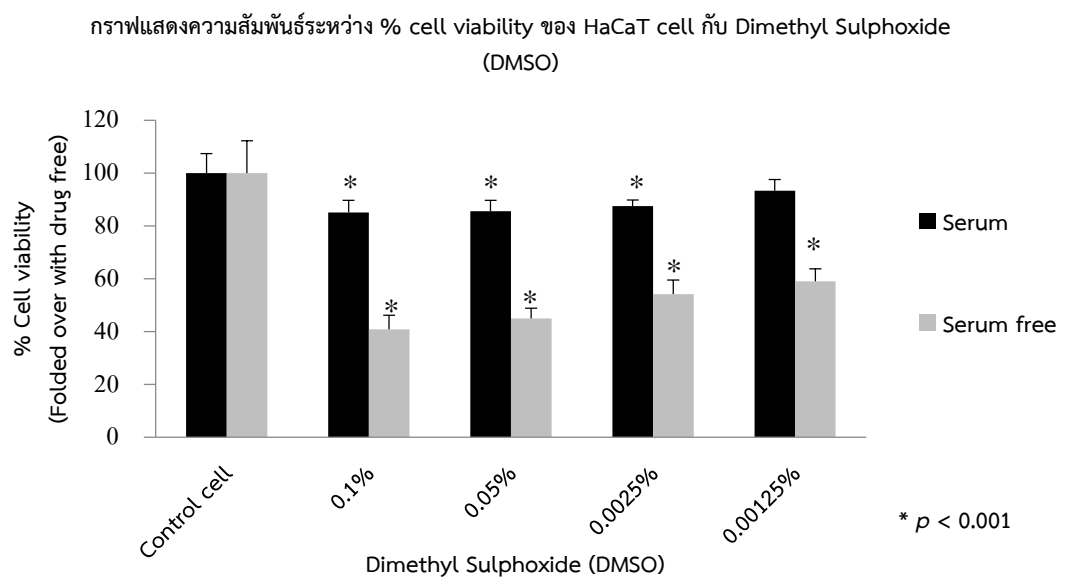
กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของ *Curcuma longa* (ETH) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % scavenging



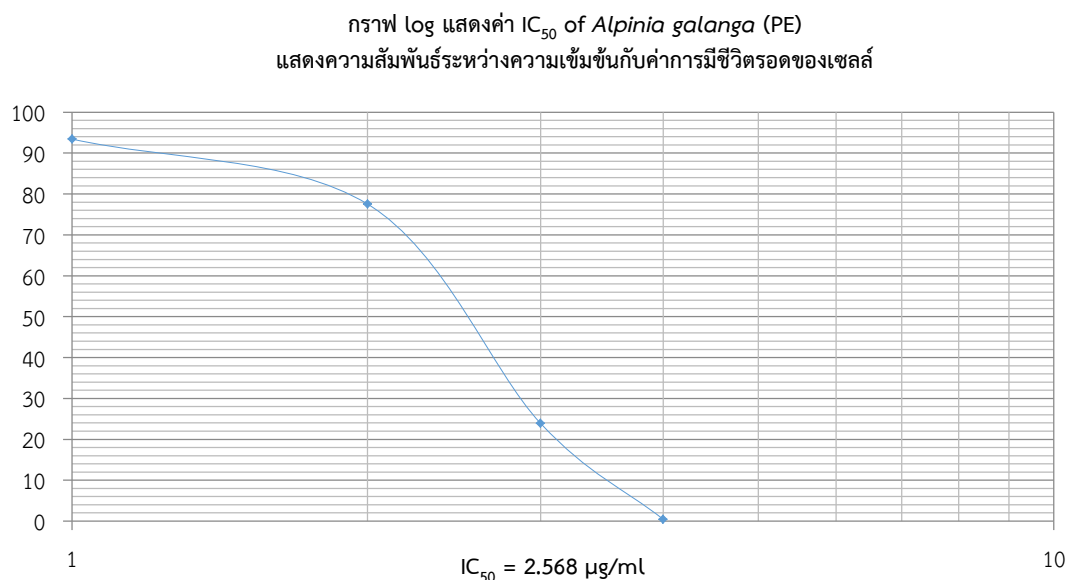
11. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวมใน HaCaT cells ด้วยวิธี Bradford assay



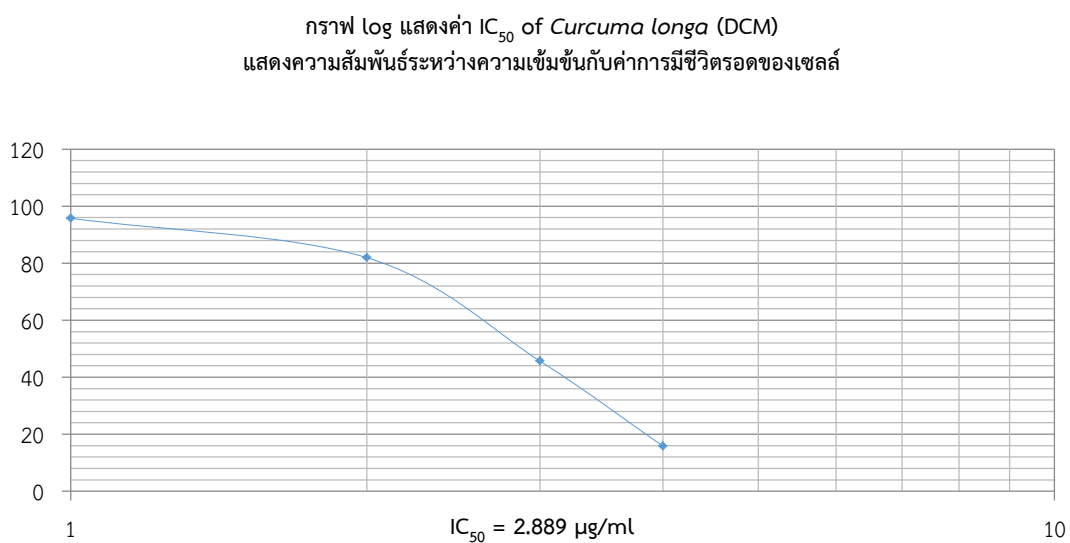
12. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Dimethyl Sulphoxide (DMSO) เพื่อนำมาใช้เป็นตัวทำละลาย Crude extract โดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT (Human keratinocyte cell line)



13. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดฆ่าด้วยตัวทำละลาย petroleum ether โดยเทคนิค MTT assay.

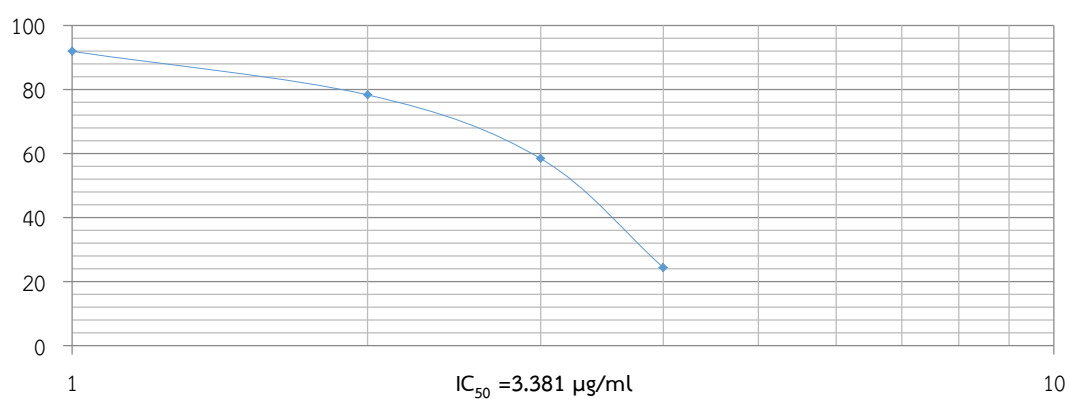


14. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นด้วยตัวทำละลาย dichloromethane ด้วยตัวทำ โดยเทคนิค MTT assay.



15. กราฟ log แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดขมิ้นด้วยตัวทำละลาย ethanol ด้วยตัวทำละลายโดยเทคนิค MTT assay.

กราฟ log แสดงค่า IC_{50} of *Curcuma longa* (ETH)
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์



ตารางที่ 1. แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดลองด้วยสารสกัดจากเนื้อหย่าน้ำ

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An1	Protein disulfide-isomerase	P07237	4.76	57081	15(6)	37%	R.ILEFFGLK.K K.QLAPIWDK.L K.ENLLDFIK.H R.NNFEGETK.E R.EADDIVWILK.K R.LITLLEEMTK.Y K.NFEDVAFDEK.K K.YQLDKDGVVLFK.K K.YKPESEEL TAERI.I K.LGETYKDHENIVAK.M K.ILEFIFIDSDHTDNOR.I K.HNQLPLVIEFTQTPK.I R.NNFEGETK.ENLLDFIK.H K.OFLQAAEAIDDIPFGITSNSDVFSK.Y R.TGPAATLLPDGAAAESL.VESSEVAVIGFFK.D

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An3	Protein disulfide-isomerase A3	P30101	5.98	56747	24(12)	44%	K.LINFAVVASR.K K.QAGPASVPLR.T R.TADGIVSHLK.K K.YGVSQYPTLK.I R.TADGIVSHLKK.Q K.FVMQEEFSR.D R.LAPEYEAAATRL K.LSKDPNIVIAK.M K.LSKDPNIVIAK.M K.LSKDPNIVIAK.M R.DGEEAGAYDGPR.T R.FLQDYFDGNLKR.R K.SEPPIESNDGPPYK.V R.FLQDYFDGNLKR.Y R.EATNPPVIOEEKPK.K K.DLLIAYYDVYDYEK.N K.DLLIAYYDVYDYEK.N K.VVAENFDEIVNNENK.I.D

Spot No.	Protein name	Accession No	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An4	Prelamin-A/C	P02545	6.57	74095	12(9)	17%	R.LVEIDNGK.Q K.LLEGEER.L R.LADALQELRA K.EGDILAAQAR.L R.SLETENAGLR.L R.ITESEEVSR.E K.LRDLEDLAR.E R.LKLDLEALLNSKE K.LALDMEIHAYR.K R.SGAQASSTPLSPTRI R.TALINSTGEEVAMR.K
							K.DASIVGFFDDSFSEAHSEFLK.A K.TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR.T R.ISDTGSAGLMLVEFFAPWCGHQK.R + 2 C R.KTFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR.T K.FISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK.A

Spot No.	Protein name	Accession No	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	P14866	8.46	64092	5(2)	8%	K.LNWCVSK.Q + C R.FSTPEQAAK.N K.LGFSTAQHAS.- + C R.SSSGILLEWESK.S K.ASLNGADIYSGCCTLK.I + 2 C
An6	TATA-binding protein-associated factor 2N	Q92804	8.04	61793	2(1)	3%	K.GEATVSEFDDPPSAK.A
An7	Ornithine aminotransferase	P04181	6.57	48504	1(1)	3%	R.HQVLFIADEIQTGLAR.T
An10	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	5.37	70854	5(2)	7%	K.VGNPIITK.L + C R.LSKEDIER.M K.LLQDFFNGK.E R.RARFEELNADLFR.G K.SQIHDMVLVGGSTR.I

Spot No.	Protein name	Accession No	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An11	Tropomodulin-3	O9NXL2	5.08	39570	6(2)	26%	R.DNETLAELK.I K.FGYOFTQOGPR.T K.ENDAHLVEVNLNLIK.N K.YKDLDEDELLGNLSETELK.Q K.QLETVLDDLDPENALLPAGFR.Q
An12	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	-	4.95	33650	8(5)	17%	R.MYSYIPAR.V R.VP PPPPIAR.A R.MIAGQVLDINLAAEPK.V R.MIAGQVLDINLAAEPK.V
An15	Keratin, type II cytoskeletal 5	P1364Z	7.59	62340	1(1)	2%	R.NLDLDSIIAEVK.A
An16	Annexin A1	P04083	6.57	38690	5(2)	15%	K.VLDLELK.G K.GVDEATIIDLTK.R K.GLGTDEDTLLEILASR.T K.GLGTDEDTLLEILASR.T K.AAYLQETGKPLDETLKKA

Spot No.	Protein name	Accession No	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An18	Nucleophosmin	P06748	4.64	32555	3(0)	16%	K:GPSSVEDIK.A K:MSVQPTVSLGGFEITPPVILR.L
An21	Keratin, type II cytoskeletal 6A	P02538	8.09	60008	2(1)	5%	R:NLLDLSIIAEVK.A
An22	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	8.07	65393	2(1)	3%	R:NLLDLSIIAEVK.A
An23	Cathepsin D	P07339	6.10	44524	5(1)	11%	R:VGFFAEAAR.L K:VSTLPATLK.L K:LSPEDTLK.V R:YYTVFDRDNNR.V
An24	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT2	O96K07	5.30	132287	2 (1)	3%	R:FINHLCDPNIIIPV.R.V M:AAAAAGAAAAAAGEAPAEIMGALLLEKETR.G
An26	Peroxioredoxin-4	O13162	5.86	30521	3(0)	15%	R:GLFIIDDK.G K:DYGVWLEDSGHTLR.G K:ISKPAPYWGTAVIDGFEFK.E

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An27	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	P30084	8.34	31367	10(5)	34%	K.AFAAGADIK.E K.HWDHLTQVK.K K.SLAMEMWLTGDR.I K.EMQNLSFQDCYSSK.F + C K.ALNALCDGLIDELNQALK.T + C K.ALNALCDGLIDELNQALK.T + C K.ICPVETLVEFAIQCAEK.I + 2 C K.ICPVETLVEFAIQCAEK.I + 2 C K.AQFAQPEILIGTIPGAGGTOR.L K.AQFAQPEILIGTIPGAGGTOR.L
An28	Heat shock protein beta-1	P04792	5.98	22768	5(3)	21%	K.DGWEITGK.H R.GPSWDPFR.D R.QLSSGVSEIR.H

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (Unique)
An29	Thioredoxin-dependent peroxidase, mitochondrial	P30048	7.67	27675	8(3)	31%	K:TKDGVVETGK,H R:VSLDVNHFFAPDELTVK,T R:SVETTLRL K:DLSLDDFK,G K:GTAVVNGEKK,D K:HLNVNDLPVGR,S R:GLEIIDPNGVIK,H R:DYGVLLLEGGALR,G R:KNGGLGHMNIALLSDLTK,Q
An30	Peroxioredoxin-2	P32119	5.66	21878	8(4)	28%	R:GLEIIDGK,G K:KATAVWDGAFKE R:LSFDYGLK,T R:QITVNDLPVGR,S K:EGGLGPLNIPLLADVTR,R K:EGGLGPLNIPLLADVTR,R R:KEGGLGPLNIPLLADVTR,R K:EGGLGPLNIPLLADVTRR,L

ตารางที่ 2. แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดจากชา

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
A14	Alpha-enolase	P06733	7.01	47139	19 (12)	47%	K:YNOQLLR,I K:TIAPALVSK,K K:SCNCLLLK.V + 2 C R:SGKYDLDFKS K:VNOIGSVTESLQACKL + C R:IGAEVYHNLK,N R:AAVPSGASTGIYEALRLR,D K:DATNVGDEGGFAPNILENKE K:FTASAGIQVWGDDLTVTNPKR R:GNPTVEVDLFTSK,G R:YISPDQLADLYK,S K:FGANAILGVSLAVCKA + C R:SGETEDTFIADLVGLCTGQIK,T + C

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
A18	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	O9UNP9	5.41	33410	4(3)	17%	K:VNIQGSVTESLQACK.L + C R:AAVPSGASTGIYEALER.D K:DATNVGDEGGFAPNILENK.E K:SEIKDYPVVSIEDPFDDDDWGAWQK.F K:FTASAGIQWGDDELTVTNPK.R R:VLYVGGLAEEVDDK.V K:HVFEGEVTEGLDYL.R.Q K:VLYHAAFIPFGDITDIQPLDYETEK.H
A110	Cathepsin D	P07339	6.10	44524	9 (3)	20%	R:QVFGAATK.Q R:YTYV/FDR.D R:YTYV/FDRDNNR.V K:VSTLPAITL.K.L K:LSPEDYTLK.V K:FDGILGMAYPRI K:AYWQVHLDQVEVASGLTLCKE + C R:ISVNNVLPVFDNLMOQK.L

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
A11	Cathepsin B	P07858	5.88	37797	6(2)	18%	K.LPASFDAR.E K.IEPPGYSPTYK.Q + C R.GODHIGIESEFWAGIPR.T + C K.NGPVEGAFSVYSDFLLYK.S K.NGPVEGAFSVYSDFLLYK.S
A12	Prohibitin	P35232	5.57	29786	17(11)	57%	K.EFTEAVEAK.Q K.AAIIISAEGDSKA R.FDAGELTTOR.E K.DLQNVNITLR.I K.KAIIISAEGDSKA R.VLPSTTEILK.S R.I.LFRPVASQLPR.I R.I.LFRPVASQLPR.I R.I.FTSGEDYDER.V R.NITTYLPAGQSVLLQLPQ.- R.NITTYLPAGQSVLLQLPQ.-

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
A114	Ran-specific GTPase-activating protein	P43487	5.19	23296	1(1)	4%	R:FLNAENAOK.F K:AAELIANSLATAGDGLIELL.R.K K:AAELIANSLATAGDGLIELL.R.K K:AAELIANSLATAGDGLIELL.R.K R:AAATFGLILDDVSLTHLTFGK.E R:AAATFGLILDDVSLTHLTFGK.E K:FGLALAVAGGWNSALYVVDAGH.R.A
A115	Chromobox protein homolog 1	P83916	4.85	21405	1(1)	5%	K:NSDEADL.VPAK.E K:YFDKLN.- R:GLFIIDDK.G R:L.VQAFQYTDK.H R:QITLNDL.PVGR.S R:IPLLSDLTHQISK.D K:DYGVWLEDSGHTLR.G K:ISKRPAPYWEGTAVIDGFEK.E
A116	Peroxioredoxin-4	Q13162	5.86	30521	9(1)	46%	

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
A117	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	P30084	8.34	31367	5(3)	12%	K.HGEVCPAGWKPGSETIIPDPAGK.L + C R.TREEEGHFYAGGQVYPPGEASR.V + C K.AFAAGADIK.E K.AFAAGADIK.E K.HWDHLTOYK.K K.ALNALCDGLIDELNQALK.T + C K.ALNALCDGLIDELNQALK.T + C
A118	Heat shock protein beta-1	P04792	5.98	22768	4(3)	32%	K.DGVEITGK.H R.QLSSGVSEIR.H R.VSLDVNIHFAPDELTVK.T
A119	Endoplasmic reticulum resident protein 29	P30040	6.77	28975	11(9)	42%	K.WAEQYLK.I K.LNMEELSEK.Y K.SLNILTAFQK.K K.FDTQYPYGEK.Q

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
AI21	Keratin, type I cytoskeletal 9	P3552Z	5.14	62027	1 (1)	2%	R.SGGGGGGGLGSSGSIRS K.GALPLDTVTFFK.V K.I.LDQGEDFPASEMTRI K.I.LDQGEDFPASEMTRI R.LAENSASSDILLVAEVGSDYGDKL K.GQGVYLGMPGCLPVYDALAGEFFIRA + C K.GQGVYLGMPGCLPVYDALAGEFFIRA + C R.LAENSASSDILLVAEVGSDYGDKLNMEISEK.Y
AI22	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	9.16	59714	5 (3)	99%	R.LIIGDR.Q R.VLSIGDGIAR.V K.AVDSLVPGR.G R.VVDALGNAIDGK.G R.I.LGADTSVDLEETGR.V

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
A123	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P04179	8.35	24707	5 (4)	24%	KGELLEAIKR.D R.DFGSFDKEKE K.HHAAYVNNLNVTTEEK.Y K.GDVTQAQIALQPALK.F

ตารางที่ 3. แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดจากไขมันจากตัวทำละลาย dichloromethane

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CD1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	5.39	50944	11 (7)	22%	K.DLAGSIIIG.K R.LLIHQSLAAGIIGV.K.G K.LFECCPHSTDR.V + 2 C R.ILSISADIEITIGELI.K.K R.NILPLPPPPRR.G K.IDEPLGSEDR.I K.IILDISESPIK.G R.ILSISADIEITIGELI.K.K R.ILSISADIEITIGELI.K.K.I R.GSYGDLGGPIITTOVTIPK.D
CD7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	Q60812	4.93	32123	4 (2)	12%	K.SDVFAIFSK.Y R.MIASQWVDINLAAEPK.V R.VFIGNLNTLWVK.K R.MIASQWVDINLAAEPK.V
CD8	Cathepsin B	P07858	5.88	37797	3 (2)	12%	K.LPASFDARE

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CD9	Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	5.78	28705	3 (2)	12%	R.GQDHCIESEWAGIPR.T + C K.NGPVEGAFSVSDFLLYK.S K.IVLLQR.L R.NAYAVLYDIIILK.N
CD10	Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	8.15	65999	4 (2)	8%	K.SISISVAR.G R.FSSCGGGGSGAGGGFGSR.S R.SLIDLDSIIAEVKA
CD13	Peroxioredoxin-4	Q13162	5.86	30521	7 (3)	33%	R.VSVADHSLHLSKA R.GLFIIDDKGILR.Q R.IPLLSDLTHQSKD K.DYGVLEDSGHTLR.G R.LVQAFQYTDK.H R.QITLNDLPVGR.S K.ISKPAPYWEGTAVIDGFEK.E

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CD14	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	P30084	8.34	31367	5 (5)	22%	K.AFAAGADIK.E K.ALNALCDGLIDELNQALK.T + C K.ICPVETLVEEAIQCAEK.I + 2 C K.AQFAQPEILGTPGAGGTQRL K.ALNALCDGLIDELNQALK.T + C
CD15	Heat shock protein beta-1	P04792	5.98	22768	6 (5)	25%	K.DGVWETGK.H R.DWYPPHSRL R.GPSWDPPFR.D R.QLSSGVSEIR.H K.TKDGWETGK.H R.VSLDVNHFAPELTVK.T
CD16	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	P31942	6.37	36903	2 (2)	4%	R.ATENDIANFFSPLNPIR.V R.ATENDIANFFSPLNPIR.V
CD18	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	5.89	49198	6 (4)	11%	R.STGEAFVQFASQEIAEKA K.SNNVEMDWLKH R.EGRPSSGEAFVLESEDEVK.L R.YIEIFK.S R.STGEAFVQFASQEIAEKA

ตารางที่ 4. แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดจากไขมันจากตัวทำละลาย ethanol

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CE1	Protein disulfide-isomerase	P07237	4.76	57081	12(1)	22%	K.FFPASADR.T K.ENLLDFIK.H R.NNFEGEVTK.E R.TVIDYNGER.T R.EADDIVNWLLK.K K.YQLDKDGWLFK.K K.YKPESEEL.TAERI.I K.YKPESEEL.TAERI.I K.LGETTYKDHENIVIAK.M R.NNFEGEVTKENLLDFIK.H R.TGPAATTLLPDGAAAESLVESSEVAVIGFFK.D K.RTGPAATTLLPDGAAAESLVESSEVAVIGFFK.D
CE2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	5.39	50944	13(7)	27%	K.DLAGSIIIGK.G R.VWLLGGKPPDR.V K.GSDFDGLRL.L + C R.NLPLPPPPRR.G K.IDEPLLEGSEDR.I

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CE3	Elongation factor Tu, mitochondrial	P49411	7.26	49510	8(1)	19%	R.EHLLLAR.Q K.TTLTAATK.I R.GTWTGTLER.G K.KGDECELLGHSK.N + C K.KGDECELLGHSK.N + C K.LLDVAVDTYIPVPAR.D R.DKPHVNVGTTGHVDHGK.T
CE4	Fumarate hydratase, mitochondrial	P07954	8.85	54602	6(3)	13%	K.LHDALDAK.S K.SKEFAQIIK.I R.AAAAEVNOVDYGLDPK.I

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CE6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	P31942	6.37	36903	4(3)	9%	R.YIEFR.S K.EIAENALGK.H R.ATENDIANFFSPLNPIR.V R.ATENDIANFFSPLNPIR.V
CE7	Cathepsin B	P07858	5.88	37797	3 (2)	12%	K.LPASFDAR.E R.GODHCGIESEWAGIPR.T + C K.NGPVEGAFSWSDFLLYK.S
CE8	Cathepsin D	P07332	6.10	44524	3(1)	6%	R.VGFAEAAR.L K.LSPEDYTLK.V R.YYTVFDRDNNR.V
CE9	Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	5.78	28705	3 (2)	12%	K.IVLLQR.L R.NAYAVLYDIIK.N

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CE10	Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	8.15	65999	14(6)	22%	K.SISIVAR.G R.SLVNLGGSK.S R.TLLEGEESRM K.AOYEDIAQK.S R.TNAENEFVTIK.K K.LALDLEIATYR.T R.SLDLDSIIAEVK.A R.TNAENEFVTIKK.D K.WELLQQVDTSTR.T K.SLNNQFASFIDKVR.F R.THNLEPYEFESFINNLR.R R.THNLEPYEFESFINNLR.R R.SLDLDSIIAEVKAQYEDIAQK.S R.GGGGGGYGSSGGSSYGSSGGGGGGGGGR.G
GE12	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	Q9JNP9	5.41	33410	4(3)	17%	R.VL.VGGLAEEVDDK.V K.HVVFGEVTEGLDVL.R.Q K.VLHAAFIPIFGDITDIQIPLDYETEK.H

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
CE14	14-3-3 protein sigma	P31947	4.68	27757	4(1)	31%	K: DSTLIMQLLR;D K: TTFDEAMADLHTLSEDSYK;D R: EKVETELQGVCDTVLGLDShLIKE + C
CE15	T-complex protein 1 subunit theta	-	5.42	59583	1(1)	2%	K: LATNAAVTVLR;V

ตารางที่ 5. แสดงรายชื่อโปรตีนซึ่งตอบสนองต่อการทดสอบด้วยสารสกัดจากสารควอซีทิน (quercetin)

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q1	78 kDa glucose-regulated protein	P11021	5.07	72288	30(12)	41%	KETAAYLGKK R.LTPEEIER.M K.IITINDQNR.L K.VYEGEERPLTK.D K.EFFNGKEPSR.G K.EFFNGKEPSR.G R.VEIIANDQGNR.I K.ELEENVQPIISK.L R.TWNDPSVQQDIK.F R.TWNDPSVQQDIK.F R.TWNDPSVQQDIK.F R.ITPSYVAFTPEGER.L K.KSDIDENVLVGGSTR.I K.TKPYIQVDIGGGQTK.T K.NQLTSPENTYFDAK.R K.NQLTSPENTYFDAK.R K.NQLTSPENTYFDAK.R K.KTKPYIQVDIGGGQTK.T K.NQLTSPENTYFDAK.R.L

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q2	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	5.14	89266	7(3)	8%	K.SQIFSTASDNQPTVTIK.V K.SQIFSTASDNQPTVTIK.V K.SQIFSTASDNQPTVTIK.V K.VTHAWVTVPAYFNDAQR.Q K.DNHLLGTFDL TGIPPAPR.G K.DNHLLGTFDL TGIPPAPR.G K.IEWLESHQDADIEDFK.A K.KVTHAWVTVPAYFNDAQR.Q K.KVTHAWVTVPAYFNDAQR.Q R.IEIESFYEGEDFSETL.TRA R.IEIESFYEGEDFSETL.TRA R.IEIESFYEGEDFSETL.TRA K.L.YGSAGPPTGEEDTAEKDEL.- K.EDVGTWGDLDGTTYSQVGVFK.N + C K.AIGVKPPR.G K.LAGESESNL.R.K R.GILL.YGPPGTGK.T

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	5.39	50944	11(5)	22%	K.DLAGSILGK.G R:WLLIGKPPDR.V R:NLPLPPPPRR.G K.IDEPLGSEDR.I K.IILDUISESPK.G R.LLIHQSLAGGIIVK.G R.ILSISADIEITGELK.K R.ILSISADIEITGELK.K R.ILSISADIEITGELK.K R.ILSISADIEITGELK.K R.ILSISADIEITGELK.K R.ILSISADIEITGELK.K R.GSYGDLEGGPIITTTQVTTPK.D
Q4	Prelamin-A/C	P02545	6.57	74095	6(2)	12%	K.LLEGEER.L R.SLETENAGLR.L R.LKDLEALLNSKE

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q5	Prelamin-A/C	P02545	6.57	74095	7(2)	9%	K.LEAALGEAK.K R.DLEDLAR.E K.EGDLLAAQAR.L R.ITESEVSR.E K.KEGDLLAAQAR.L R.LKDLEALLNSK.E R.SGAQASSTPLSPTRI.I
Q6	Protein FAM221A	A4D161	6.33	33061	1(0)	8%	K.TDLEAIPQQCPIDLPCQVTGCQCRA.A
Q8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	P52597	5.38	45643	11(5)	26%	R.YIEVFK.S R.SYSDPPLK.F R.TEMDWLKH.H R.VHIEIGPDGR.V R.DLSTYCLSGMYDHR.Y + C K.HSGPNSADSANDGFVRL.L R.OSGEAFVELGSEDDVK.M

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q9	Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	8.15	65999	6(3)	13%	K.ITGEAFVQFASQELAEK.A K.ITGEAFVQFASQELAEK.A K.ATENDIYNFFSPLNPVR.V K.ATENDIYNFFSPLNPVR.V
Q10	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	P04181	6.57	48504	12(7)	36%	K.GLLNAIVK.E R.ESEIINIK.T K.LPSDVTAVR.G K.IVFAAGNFWGR.T K.SQVDKLTLSRA R.FAPPLVIKEDELRE K.TVQGPPTSDDIFER.E K.YGAHNHHPALPVALERR.G

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q12	Tropomodulin-3	Q9NYL9	5.08	39570	13(4)	36%	R.HQVLFIADEIQTLAR.T R.AFYNNVLGEEYITK.L R.WLAVDYENVVRPDIWLLGK.A R.VAAALEVLEENILAENADK.L K.CFSLAATR.S + C R.DNETLAEIK.I K.MLEENTNLIK.F K.QKPVQTFTEEK.V R.SNDPVATAFAEMLK.V K.ENDAHLVEVNLNLIK.N K.DLDEDELLGNLSETELK.Q K.ILPVEDEPPNPTNVEESLKR K.YKDLDEDELLGNLSETELK.Q K.ILPVEDEPPNPTNVEESLKR.Q K.ILPVEDEPPNPTNVEESLKR.T K.QLETVLDLDPENALLPAGFR.Q K.QLETVLDLDPENALLPAGFR.Q

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q13	DnaJ homolog subfamily B member 11	Q9UBS4	5.81	40489	4(2)	15%	R.TLEVEIEPQV.R.D K.GSLITFDVDFPK.E K.FODLGAAYEVLSDSEKR.K R.FQMTQEWQDECPNVK.L + 2 C
Q14	Elongation factor Tu	P49411	7.26	49510	20(9)	44%	REHLLAR.Q K.TTLTAATK.I R.GTVVTGTLER.G R.GTVVTGTLER.G R.AEAGDNLGALV.R.G K.KGDECELLGHSK.N + C K.LLDAVDTYIPV.PAR.D K.LLDAVDTYIPV.PAR.D R.GITNAAHVEYSTAAR.H R.HYAHTDQPGHADYV.K.N + C R.DKPHVNVGTIGHVDHGK.T K.GEETPVIVGSAI_CALEGR.D + C

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q15	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Q99729	8.22	36202	1(1)	2%	K.GEETPVVGSALCALEGR.D + C R.TTGTGLVTNTLAMTEEEK.N R.TTGTGLVTNTLAMTEEEK.N K.DAVQDSEMVELVELEIR.E K.DAVQDSEMVELVELEIR.E K.NMITGTAPLDGCLVVAANDGMPQTR.E + C R.ELLTEFGYKGEETPVVGSALCALEGR.D + C R.ELLTEFGYKGEETPVVGSALCALEGR.D + C R.GFGFILFK.D

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q17	Poly(rC)-binding protein 1	-	6.66	37474	8(3)	33%	K.IANPVEGSSGR.Q R.INISEGNCPERI.I + C R.IITLTGPTNAIFKA R.LVWPATQCGSLIGK.G + C R.ATTAGVPOSVTECVK.Q + C K.QICLVMLETTLQSPOGR.V + C K.GWASLDASTQTTHLTPNNLIGCIIGR.Q + C
Q19	PDZ and LIM domain protein 1	O00151	6.56	36049	9(3)	48%	K.WSPPLVTEEGK.R K.GCTDNLTLTVAR.S + C R.IKGTDNLTLTVAR.S + C R.VTPPEGYEVTVPK.- K.GHFFVEDQYCEK.H + C K.QSTSLVLQELLESEEK.G R.VITNQYNNPAGLYSSEINISFNNALESK.T K.AALANL.CIGDVITTAIDGENTSMMTHLEAQNRI.I + C K.TAASGVEANSRPLDHAQPSSLVIDKESEVYK.M

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q20	Annexin A2	P07355	7.57	38580	8(4)	24%	R.DALNIEFAIK.T K.GVDEVTVNIIILTNR.S K.GVDEVTVNIIILTNR.S K.SALSGLHLETVILGLLK.T K.SALSGLHLETVILGLLK.T K.GLGTDEDSLIEICSR.T + C K.GLGTDEDSLIEICSR.T + C MSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAVGSVK.A + C
Q21	Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	5.13	58792	9(6)	17%	R.LAADDFR.L R.VLDELTLTK.A R.LASYLDKVR.A K.VTMONLNDRL.L R.LKYENEVALR.Q

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
							R.ALEESNYELEGK.I K.GSLGGGFSGGFSGGSFSR.G K.NQILNLTTDNANILLQIDNAR.L K.TIDDLKNQILNLTTDNANILLQIDNAR.L
Q22	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	P31937	8.38	35306	1(1)	4%	K.HGYPLIYDVFPDACK.E + C
Q23	SAP domain-containing ribonucleoprotein	P82979	6.10	23656	3(1)	14%	R.FGLNVSSISR.K R.FNVPVSLSEK.K K.ITSEIPQTER.M
Q25	Cathepsin D	P07339	6.10	44524	4(1)	8%	R.VGFAEAAR.L R.YYTVFDR.D K.VSTLPATLK.L K.LSPEDYTLK.V
Q26	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	O75934	5.48	26115	2(1)	11%	R.EAAAAALVEEETRR.Y R.TTVQLENEYQIK.Q

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q27	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Q75489	6.99	30223	1(0)	6%	K.TYTDLTPIESAVSVFK.A
Q28	Endoplasmic reticulum resident protein 29	P30040	6.77	28975	4(3)	14%	K.WAEQYL.KI K.OGODNLSVKE K.SLNILTAFOK.K K.GALPLDVTTFYK.V
Q29	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	P19388	5.69	24536	5(1)	21%	R.IQAGDPVAR.Y K.EEVTLLAR.Y K.IIRPSETAGR.Y R.GYLVTODELDTLLEEFK.A R.GYLVTODELDTLLEEFK.A
Q30	Endoplasmic reticulum resident protein 29	P30040	6.77	28975	3(3)	11%	K.WAEQYL.KI K.SLNILTAFOK.K K.GALPLDVTTFYK.V

Spot No.	Protein name	Accession No.	pI	Mass (da)	Masses Matched	Protein sequence coverage (%)	Peptide (unique)
Q31	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	P31942	6.37	36903	2(0)	7%	R.VHIDIGADGR.A R.ATENDIANFFSPLNPIR.V
Q33	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	Q9NMVZ	9.08	71325	2(1)	2%	R.GLLLFVDEADAFLR.K R.GLLLFVDEADAFLR.K
Q34	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	7.67	27675	6(1)	38%	K.DLSLDDFK.G K.GTAVVNGEFLK.D K.HLSVNDLPVGR.S R.GLFIIDPNGVIK.H K.GKYLVLFFYPLDFTFVCPTEWAFSDK.A + C K.AFOYVETHGEGVCPANWTPDPSPTIKPSPAASKE
Q35	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	9.16	59714	6(5)	13%	R.VLSIGDGAR.V K.AVDSLVPGR.G R.WDALGNAIDGK.G K.TSAIDTIINQK.R R.ILGADTSVDLEETGR.V R.TGAIVDVPVGEELLGR.V

ภาคผนวก ข

น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการต้านโรคสะเก็ดเงิน

1. 10% FBS DMEM +PS

DMEM/High glucose ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมกับ fetal bovine serum (inactivated serum) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ PS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/ml) แบ่งใส่หลอดขนาดปริมาตร 50 มิลลิลิตรเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. MTT reagent

เตรียม MTT Reagent ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง MTT dye หนัก 50 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ให้เกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ประมาณ 15 นาที จากนั้นกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เพื่อให้ปราศจากเชื้อและกำจัดตะกอนที่ยังไม่ละลายออกไปเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. TNF- α

เตรียม stock TNF- α ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเติม 0.1% ของ BSA ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมกับ TNF- α หนัก 50 ไมโครกรัม แบ่งใส่ microcentrifuge ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4. 1X phosphate buffer saline pH 7.4

เจือจางจาก stock 10X PBS โดยการเติมน้ำ Milli Q ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมกับ 100 มิลลิลิตร ของ stock 10X PBS จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับล้างเซลล์หรือเตรียม MTT Reagent

2. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทย

1. DPPH assay (DPPH standard stock solution) เตรียมโดยละลาย DPPH หนัก 3.154 มิลลิกรัม ด้วยตัวทำละลาย ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. ABTS assay (ABTS 7 มิลลิโมลาร์) เตรียมโดย ละลาย ABTS หนัก 0.0192 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตหนัก 0.0033 กรัม ในน้ำกลั่น

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 8:12 บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้

3. Folin–Ciocalteu reagent

3.1 10% Folin reagent เตรียมโดย Folin–Ciocalteu reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 18 มิลลิลิตร

3.2 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 0.1 โมลลาร์ เตรียมโดยชั่ง Na_2CO_3 หนัก 5.30 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3 Gallic acid standard stock solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง Gallic acid หนัก 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4. Aluminium chloride colorimetric assay

4.1 10 เปอร์เซ็นต์ Aluminium chloride เตรียมโดยชั่ง 5 กรัม ละลายด้วยน้ำ กลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.2 quercetin standard stock solution เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม โดยชั่ง quercetin หนัก 0.5 กรัม ละลายด้วย ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แบ่ง ใส่ใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

Lysis solution

ชั่ง Urea หนัก 9.6 กรัม, CHAP หนัก 0.8 กรัม และ IPG buffer, pH 3-10 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่ microcentrifuge ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการวัดหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford Assay

1. Bradford solution

เจือจาง stock Bradford solution 1 ส่วน ด้วย Double distilled water 4 ส่วน จากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษ Whatman filter NO.1 เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศา เซลเซียส

2. เตรียมโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียม stock โปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง BSA หนัก 5 มิลลิกรัม ละลายด้วย Double distilled water ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นจึงแบ่งใส่ microcentrifuge ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

5. น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทำ 2D-GE เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน

1. Rehydration stock solution with IPG buffer

เตรียมโดยชั่ง urea หนัก 12 กรัม CHAPS หนัก 0.5 กรัม IPG buffer ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และ 50 ไมโครลิตรของ 1% solution bromophenol blue เติมน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. SDS equilibration buffer

เตรียมโดยตวง Tris-HCl, pH 8.8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร glycerol (85% v/v) ปริมาตร 69 มิลลิลิตร ชั่ง urea หนัก 72.07 กรัม SDS หนัก 4 กรัม และ 400 ไมโครลิตรของ 1% solution stock bromophenol blue เติมน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แบ่งใส่ centrifuge tube ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้จึงเติม DTT 100 มิลลิกรัม ใน 10 มิลลิลิตร ของ SDS equilibration buffer และ Iodoacetamide 250 มิลลิกรัม ใน 10 มิลลิลิตร ของ SDS equilibration buffer

3. 4X resolving gel buffer

เตรียมโดยชั่ง Tris base หนัก 181.7 กรัม เติมน้ำ Milli Q ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย HCl และเติมน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. 10% SDS

เตรียมโดยชั่ง SDS หนัก 5 กรัม ละลายด้วยน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 10% Ammonium persulfate

เตรียมโดยชั่ง Ammonium persulfate หนัก 0.1 กรัม จากนั้นจึงเติมน้ำ Milli Q ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น

6. 10X SDS electrophoresis buffer

เตรียมโดยชั่ง Tris-base หนัก 30.3 กรัม Glycine หนัก 144 กรัม และ SDS หนัก 10 กรัม เติมน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะใช้จึงเจือจางเป็น 1X

7. Agarose sealing solution

เตรียมโดยตวง SDS electrophoresis buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร Agarose หนัก 0.5 กรัม และ 200 ไมโครลิตร ของ stock bromophenol blue ผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ microcentrifuge tube ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. การเตรียม 12.5% gel

เตรียมโดยตวง monomer solution (30% Acrylamide and Bis-Acrylamide Solutions) ปริมาตร 25.02 มิลลิลิตร ผสมกับ 4x resolving gel buffer ปริมาตร 15 มิลลิลิตร 10% SDS ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตรและน้ำ Milli Q ปริมาตร 19.08 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม 10% ammonium persulphate ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 19.8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

9. Fixative solution

เตรียมโดยตวง acetic acid gracial ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับ 800 มิลลิลิตร ของ methanol เติมน้ำ Milli Q ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. สีย้อม Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250

เตรียมโดย ชั่ง ammonium sulphate หนัก 40 กรัม และ 85% phosphoric acid ปริมาตร 4.8 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ Milli Q ให้ได้ปริมาตร เท่ากับ 400 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ working dye ซึ่งเตรียมโดยชั่งสี Coomassie Brilliant Blue G-250 หนัก 0.4 กรัม ละลายด้วย methanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเตรียมเมื่อใช้เท่านั้น

11. เตรียม stock NH_4HCO_3 , 100 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง NH_4HCO_3 หนัก 79.06 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำ HPLC ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยจะเตรียมเมื่อใช้งานเท่านั้น

12. เตรียม 50 % ACN ใน 25 mM NH_4HCO_3

เตรียมโดยการเจือจาง stock NH_4HCO_3 100 mM ให้ได้ความเข้มข้น 50 mM NH_4HCO_3 ด้วยน้ำ HPLC จากนั้นจึงมาไปเจือจางด้วย ACN โดยใช้อัตราส่วน 1:1 จึงจะได้ 50 % ACN ใน 25 mM NH_4HCO_3 โดยจะเตรียมเมื่อใช้งานเท่านั้น

13. เตรียม extracts solvent, 5% formic acid ใน 50% ACN

เตรียมโดยตวง formic acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำ HPLC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม ACN ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

14. เตรียม 0.1 mg/ml ใน 25 mM NH_4HCO_3

เตรียมโดยชั่ง trypsin หนัก 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย น้ำ HPLC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (stock trypsin 1 mg/ml) นำ stock trypsin มาเจือให้มีความเข้มข้น 0.2 mg/ml ด้วยน้ำ HPLC จากนั้นจึงนำ trypsin ที่มีความเข้มข้น 0.2 mg/ml มาเจือจางด้วย 50 mM NH_4HCO_3 ด้วยอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน จะได้ 0.1 mg/ml ใน 25 mM NH_4HCO_3 ตามต้องการ

15. เตรียม solvent C (98% H_2O , 2% ACN, 0.1% formic acid) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

เตรียมโดยตวงน้ำ HPLC ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร ผสมกับ ACN ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ formic acid ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ solvent C (98% H_2O , 2% ACN, 0.1% formic acid) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามต้องการ

ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์ คำย่อและคำอธิบาย

คำย่อ	คำอธิบาย
HaCaT	Human Keratinocyte Cell Line
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
2D-GE	2-dimension gel electrophoresis
MS	mass spectrometry
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
PE	petroleum ether
DCM	dichloromethane
ETH	ethanol
DPPH	2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
FBS	fetal bovine serum
PBS	phosphate buffer saline
PS	penicillin- streptomycin
n	nano
μ	micro
/	per
%	percent
X	fold or time
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
g	gram
mg	milligram
Dw	distilled water
M	molar
GAE	gallic acid equivalent
AlCl ₃	aluminium chloride

NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
rpm	revolutions per minute
IEF	isoelectric focusing
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ACN	acetonitrile
S.E.M	Standard Error of Mean
↑	Up
↓	Down

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐพงศ์ ขาวจิตร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับสองจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เมื่อปีการศึกษา 2553 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษาในหลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

ผลงานทางวิชาการ

ศราวุธ สุทธิรัตน์ ทวีพร พันธุ์พานิช ณัฐพงศ์ ขาวจิตร ทิวากร คาคหมาย สุรศักดิ์ บรรลือทรัพย์ อำไพ ตั้งอนุชิตชาญชัยและบุญนิภา สุวรรณกาล "การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส เมลิออยโดซิสและสครับไทฟัส ในระยะเฉียบพลัน ด้วยวิธี IgM-IFA โดยใช้แอนติเจนแยกชนิดในการทดสอบเดียว" วารสารวิชาการสาธารณสุข ปีที่ 30 ฉบับที่ 3 พฤษภาคม-มิถุนายน 2554 หน้า 406-412.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

