

การทดสอบหาฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย



นางสาววิสาข์ ทองระกาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS FOR IN VITRO
ANTI-PSORIATIC ACTIVITY



Miss Visa Thongrakard

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การทดสอบหาฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจาก
สมุนไพรรไทย

โดย

นางสาววิสาข์ ทองระภาค

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

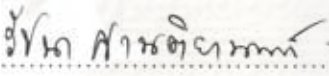
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

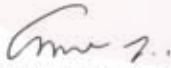
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วณิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชณา ศานติยานนท์)


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


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.อุรา รัชชตานนท์ชัย)

ศูนย์วิทยุโทรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิสาข์ ทองระภาค : การทดสอบหาฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย.
(SCREENING OF THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS FOR IN VITRO ANTI-
PSORIATIC ACTIVITY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน
เทนคำเนาวิ, 131 หน้า.

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งที่มีการอักเสบของผิวหนังอย่างเรื้อรัง และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังมากกว่าปกติ สำหรับประชากรไทยพบว่า โรคสะเก็ดเงินจัดอยู่ในอันดับ 1 ใน 10 ของโรคผิวหนังที่พบได้บ่อย การรักษาผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินด้วยวิธีดั้งเดิมไม่สามารถสร้างความพึงพอใจให้กับผู้ป่วยอย่างเต็มที่ เนื่องจากผลข้างเคียงและการดื้อยาเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน คณะผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นถึงความสำคัญดังกล่าว ดังนั้นจึงประสงค์จะทำการศึกษาสารสกัดของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ได้มีการใช้รักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ เพื่อรักษาโรคสะเก็ดเงิน การศึกษาดังนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบหาชนิดของสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงิน โดยใช้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ (HaCaT) เป็น in vitro model ทำการประเมินฤทธิ์ด้านการแบ่งเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ Neutral red assay และศึกษาหากกลไกการต้านการแบ่งเซลล์ผิวหนังในระดับโมเลกุล โดยใช้เทคนิค RT-PCR และ Western blot เพื่อดูการแสดงออกของ TGF- α ในระดับ mRNA และโปรตีน ตามลำดับ เมื่อประเมินฤทธิ์ด้านการแบ่งเซลล์พบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ HaCaT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.7, 6.3 และ 6.3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดสมุนไพรไทยจากข่าเท่านั้นที่สามารถลดระดับการแสดงออกของ TGF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน สรุปการศึกษาได้ว่า สารสกัดสมุนไพรไทยจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า อาจมีสารออกฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงิน และในอนาคตอาจนำไปศึกษาและประยุกต์ใช้เป็นการรักษาอีกทางเลือกหนึ่งของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินได้

ภาควิชา.....เคมีคลินิก..... ลายมือชื่อนิสิต.....วิสาข์ ทองระภาค.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2552.....

5177219437 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : PSORIASIS / THAI MEDICINAL / HYPERPROLIFERATION

VISA THONGRAKARD : SCREENING OF THAI MEDICINAL PLAN
EXTRACTS FOR IN VITRO ANTI-PSORIATIC ACTIVITY. THESIS ADVISOR :
ASST.PROF. TEWIN TENCOMNAO, Ph.D., 131 pp.

Psoriasis is a chronic inflammatory and hyperproliferative skin disorder. In Thai population, psoriasis has been considered as one of the top ten most common skin disorders. The current conventional therapies for psoriasis have not fully met the needs of patients, mostly due to anti-psoriasis drugs have side effects, and patients are developing drug resistance when long term therapy. Therefore, numerous crude extracts of Thai medicinal herbs, which have been traditionally used for the treatment of various skin diseases, were investigated for anti-psoriatic activity using HaCaT cell line as an in vitro model. MTT assay and Neutral red assay were employed to evaluate for anti-proliferative effect. RT-PCR and Western blot were performed to measure mRNA and protein level of TGF- α , respectively. Three extracts from ethanol fractions, namely *Curcuma longa*, *Alpinia galanga* and *Annona squamosa* showed significant growth inhibitory effect in HaCaT ($P < 0.05$). Their calculated IC_{50} values based on logarithmic graph were 6.7, 6.3 and 6.3 $\mu\text{g/ml}$, respectively. However, only *Alpinia galanga* significantly inhibited the expression of TGF- α mRNA and protein ($P < 0.05$). This study demonstrated that the biologically active substances in *Curcuma longa*, *Alpinia galanga* and *Annona squamosa* might have the anti-psoriatic effect. They may be further studied and applied for treating psoriasis as a therapeutic option in the future.

Department : ..Clinical Chemistry.....

Student's Signature : Visa Thongrakard.....

Field of Study : ..Clinical Biochemistry.....

Advisor's Signature : .....

..and Molecular Medicine.....

Academic Year : 2009.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวัล ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนข้อคิดดี ๆ ระหว่างการทำงานวิจัย ศิษย์ขอขอบพระคุณอาจารย์ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ดร.อุรสา รัชชัตานนท์ชัย ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจาก ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2552 และ ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยกรรมการผู้จัดการใหญ่โรงพยาบาลกรุงเทพ ราชวิทยาลัย และ คุณสุทัศน์ ใจยา ที่ประสานให้คณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์สมุนไพรจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระรัตนราชสุตาฯ สยามบรมราชกุมารี

ขอขอบคุณ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี (Center for Excellence in Omics-Nano Medical Technology Project) ที่มีส่วนสำคัญในการผลักดันให้การดำเนินโครงการวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงอย่างมีประสิทธิภาพ

ขอขอบคุณ โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวิจิตร ทางการปฏิบัติทางการแพทย์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ป.โท และ ป.เอก ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
โรคสะเก็ดเงิน.....	4
ความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน.....	5
ชนิดของโรคสะเก็ดเงิน.....	5
สาเหตุของการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	7
การรักษาโรคสะเก็ดเงิน.....	20
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัย.....	22
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	24
การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration).....	29
การตรวจวัดการทำงานของเซลล์ โดยวิธี MTT assay.....	30
การตรวจวัดกิจกรรมของเซลล์ โดยวิธี Neutral Red accumulation assay.....	31
การสกัด Total RNA.....	32
การวัดความเข้มข้นของ Total RNA โดยการวัดค่า Optical Density (OD).....	35

บทที่	หน้า
การกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ Deoxyribonuclease (DNase I).....	35
การสร้าง cDNA จากอาร์เอ็นเอ.....	35
การทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน TGF- α ด้วยเทคนิค PCR.....	36
การออกแบบ Primers.....	38
การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยการใช้ Nonidet-P40.....	39
การวัดความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธี Bradford assay.....	39
การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล.....	39
การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน.....	40
การป้องกันการเกิด Non-specific.....	41
การติดตามผล.....	42
การตรวจวัดคุณสมบัติรีดิวซ์ของสารประกอบฟีนอล (Reducing property) จากสารสกัดสมุนไพรไทย โดยวิธี Folin Ciocalteu Phenol assay.....	43
การวิเคราะห์ผล.....	44
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	45
ผลการศึกษารวบรวมข้อมูลสมุนไพรไทย.....	45
ขมิ้น.....	45
ข่า.....	49
ขิง.....	50
ชุมเห็ดเทศ.....	54
ทองพันชั่ง.....	57
น้อยหน่า.....	58
บัวบก.....	59
มะคำดีควาย.....	62
ทับทิม.....	64
พลูคาว.....	67
เสลดพังพอนตัวเมีย.....	70
ผลการสกัดสมุนไพร โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration).....	72
ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดสมุนไพรไทย.....	72
ผลการทดสอบการกระตุ้นการแสดงออกของ TGF- α ด้วย IFN- γ และ TNF- α ..	74
ผลการตรวจวัดการทำงานของเซลล์ โดยวิธี MTT assay.....	76

บทที่	หน้า
ผลการตรวจวัดกิจกรรมของเซลล์ โดยวิธี Neutral Red accumulation assay...	80
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า ที่มีผลต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน TGF- α	82
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า ที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ TGF- α	86
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	90
รายการอ้างอิง.....	98
ภาคผนวก.....	116
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	131



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารบ่งชี้ต่าง ๆ ที่พบในโรคสะกดเงิน.....	18
3.1 ขั้นตอนการเติมน้ำยา เพื่อกำจัด DNA ปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง RNA.....	35
3.2 ขั้นตอนการเติมน้ำยา เพื่อสร้าง cDNA จาก RNA.....	36
3.3 ขั้นตอนการเติมน้ำยา เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA.....	37
3.4 Primers จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน และขนาดของผลิตภัณฑ์.....	37
3.5 ปฏิกริยา และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของยีน TGF- α และ β -actin.....	37
3.6 ขั้นตอนการเติมสารละลาย เพื่อตรวจปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยวิธี FCP assay.	43
4.1 ผลการสกัดสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซน และผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในสมุนไพรไทย.....	73

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงินบริเวณผิวหนัง.....	4
2.2 ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	7
2.3 EGFR network และผลของการจับกันระหว่าง EGF family และ EGFR receptor.....	10
2.4 กระบวนการกระตุ้นการแสดงออกของ TGF- α ผ่าน EGFR.....	11
2.5 ความสัมพันธ์ของสิ่งแวดล้อม ลักษณะทางพันธุกรรม และระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	16
2.6 การรักษาโรคสะเก็ดเงินด้วยวิธีต่าง ๆ.....	20
3.1 เซลล์ผิวหนัง HaCaT (Human keratinocyte cell line).....	22
3.2 สวนสมุนไพร สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี.....	23
3.3 การสกัดสารจากสมุนไพรไทย.....	29
3.4 ปฏิกริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay.....	30
3.5 ขั้นตอนการสกัด Total RNA.....	34
3.6 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันของ TGF- α ทั้ง 2 variants.....	38
3.7 การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล.....	40
3.8 การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน.....	41
3.9 การติดตามผล โดยวิธี Two-step detection.....	42
4.1 ขมิ้น.....	45
4.2 ข่า.....	49
4.3 ชิง.....	50
4.4 ชุมเห็ดเทศ.....	54
4.5 ทองพันชั่ง.....	57
4.6 น้อยหน่า.....	58
4.7 บัวบก.....	59
4.8 มะคำดีควาย.....	62
4.9 ทับทิม.....	64
4.10 พลูควา.....	67
4.11 เสดดพังพอนตัวเมีย.....	70

ภาพที่	หน้า
4.12 ผลการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ	74
4.13 กราฟการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ	75
4.14 กราฟผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเอทานอล โดยวิธี MTT assay.....	77
4.15 กราฟผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเฮกเซน โดยวิธี MTT assay.....	78
4.16 กราฟผลการทดสอบสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล โดยวิธี MTT assay.....	79
4.17 กราฟผลการทดสอบสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล โดยวิธี Neutral Red accumulation assay.....	80
4.18 กราฟเปรียบเทียบผลการทดสอบสาร dithranol ระหว่างเซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้น และถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ	81
4.19 ผลการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล.....	82
4.20 ผลการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดข่า จากตัวทำละลายเอทานอล.....	83
4.21 ผลการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล.....	84
4.22 กราฟผลการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล.....	85
4.23 ผลการแสดงผลของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล.....	86
4.24 ผลการแสดงผลของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดข่า จากตัวทำละลายเอทานอล.....	87
4.25 ผลการแสดงผลของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล.....	87

ภาพที่	หน้า
4.26 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัด ขมิ้น ข่าและน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล.....	88
4.27 โปรตีนตัวอย่างที่นำมาแยกบน SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brillian blue G.....	89
5.1 โครงสร้างของ 1'-acetoxychavicol acetate (ACE).....	94
5.2 สารกลุ่ม curcuminoids พบในส่วนเหง้า (rhizome) ของขมิ้น.....	94
5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	96



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งที่มีการอักเสบของผิวหนังอย่างเรื้อรัง และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังมากกว่าปกติ โรคสะเก็ดเงินสามารถพบได้ทั่วโลก และทำให้สูญเสียค่าใช้จ่ายมากกว่า 3 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี [1, 2] มีรายงานว่าอัตราการเกิดโรคสะเก็ดเงินมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อชาติ [3] อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณเป็นอัตราเฉลี่ยแล้วอัตราการเกิดโรคจะอยู่ในช่วงร้อยละ 0.2 ถึงร้อยละ 4.8 โรคสะเก็ดเงินสามารถพบได้ตั้งแต่แรกเกิด แต่จะพบมากในช่วงอายุ 15-30 ปี ไม่พบความแตกต่างของอัตราการเกิดโรค และลักษณะอาการทางคลินิกระหว่างเพศหญิงกับเพศชาย [3-5] นอกจากนี้โรคสะเก็ดเงินยังทำให้ผู้ป่วยมีอาการทางคลินิกที่รุนแรงขึ้น [6] ในประเทศสหรัฐอเมริกาจะพบผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินรายใหม่ปีละประมาณ 150,000 ราย โดยมีอายุเฉลี่ยน้อยกว่า 30 ปี [7] นอกจากนี้ยังพบว่า ร้อยละ 40 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะสามารถพัฒนาไปเป็นโรคไขข้ออักเสบจากโรคสะเก็ดเงิน (psoriatic arthritis) โดยที่ร้อยละ 5 จะเป็นโรคไขข้ออักเสบชนิดรุนแรงจนนำไปสู่ความพิการในที่สุด [8] สำหรับประชากรไทยพบว่า โรคสะเก็ดเงินจัดอยู่ในอันดับ 1 ใน 10 ของโรคผิวหนังที่พบได้บ่อย [9] การปรากฏรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินสามารถมองเห็นได้ง่าย ซึ่งนอกจากจะสร้างความไม่พึงพอใจให้กับผู้ป่วยแล้วยังส่งผลกระทบต่ออัตราการลดลงของการจ้างงาน รายได้ และคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยอีกด้วย [10, 11] การรักษาผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินด้วยวิธีดั้งเดิมนั้นไม่สามารถสร้างความพึงพอใจให้กับผู้ป่วยได้อย่างเต็มที่ [12] ในปัจจุบันมีการรักษาทางชีววิทยา (biologic therapies) ซึ่งเป็นการรักษาที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น [13] โดยเป้าหมายของการรักษาทางชีวภาพจะมุ่งไปที่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte และไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่เชื่อว่าเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคสะเก็ดเงิน อย่างไรก็ตามยังมีประเด็นสำคัญที่ต้องคำนึงถึงนอกเหนือจากการรักษาผู้ป่วยให้หายจากโรคสะเก็ดเงิน เช่น การดื้อยาเมื่อใช้ยาชนิดนั้นติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน การกลับมาเป็นโรคเมื่อหยุดใช้ยา ความปลอดภัย และค่าใช้จ่ายที่ต้องสูญเสียไปกับการรักษา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาวิธีการรักษาใหม่ ๆ ที่ให้ประสิทธิภาพการรักษาดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการรักษาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ลดผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นกับผู้ป่วยทั้งระหว่างการรักษา และหลังการรักษา รวมทั้งลดภาระค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยลง [6]

ปัจจุบันสมุนไพรไทยสามารถใช้รักษาโรคต่าง ๆ ได้มากมาย อีกทั้งมีผลข้างเคียงน้อยเมื่อเทียบกับยาแผนปัจจุบัน คณะผู้วิจัย เล็งเห็นถึงความสำคัญดังกล่าว ดังนั้นจึงประสงค์จะทำการ

ประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการต้านโรคสะเก็ดเงิน (anti-psoriatic activity) ของสมุนไพรไทย บางชนิดที่ได้มีการใช้รักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ ในงานสาธารณสุขมูลฐาน เช่น ขมิ้นชัน ข่า พญาคาล และบัวบก [14] โดยจะศึกษาถึงกลไกการต้านโรคสะเก็ดเงินที่เกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human keratinocyte cell line [HaCaT]) ซึ่งนิยมใช้เป็น in vitro model สำหรับการศึกษารักษาโรคสะเก็ดเงิน [15, 16] ผลของการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ จะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่ เพื่อให้เข้าใจกลไกในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน และนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคสะเก็ดเงินด้วยสารสกัดจากสมุนไพรไทย เพื่อเป็นความหวังใหม่ให้กับผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจ และรวบรวมความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรไทย ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังประเภทต่าง ๆ
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ สำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน และสำรวจหาฤทธิ์ดังกล่าว โดยการทดลองประเมินฤทธิ์ด้านการแบ่งเซลล์ผิวหนัง
3. เพื่อศึกษาหากลไกการต้านการแบ่งเซลล์ผิวหนังผ่านทาง TGF- α โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

ขอบเขตของการวิจัย

สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง การใช้สมุนไพรจากแหล่งที่มาเดียวกัน จะลดปัญหาของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น แร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของดิน สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น

คณะผู้วิจัย จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่ใช้สำหรับงานสาธารณสุขมูลฐานในการรักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ เช่น โรคกลาก และโรคเกื้อลอน โดยจะประเมินฤทธิ์ด้านการแบ่งเซลล์ผิวหนังมนุษย์ และฤทธิ์การลดการแสดงออกระดับ mRNA และระดับโปรตีนของ tumor growth factor alpha (TGF- α) ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของโรคสะเก็ดเงิน โดยทำการศึกษาในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงมนุษย์ (human keratinocyte cell line [HaCaT]) ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะ in vitro model

ข้อจำกัดการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้จะทำการทดสอบสมุนไพรไทยจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง และนำมาทดสอบปฏิกิริยากับเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงมนุษย์เท่านั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคสะเก็ดเงินอย่างแท้จริง
2. องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปต่อยอดการวิจัย เพื่อพัฒนาเป็นยาสมุนไพรไทยสำหรับการรักษาโรคสะเก็ดเงินที่ไม่มีผลข้างเคียง หรือผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยลง อีกทั้งยังนำไปสู่การวิจัยเพื่อพัฒนาแนวทางการบรรเทาอาการผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
3. ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีแนวทางในการรักษาเพิ่มมากขึ้น
4. คาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้อง ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง ในหัวข้อเรื่อง Screening of Thai medicinal plant extracts for in vitro anti-psoriatic activity เช่น ในวารสาร Ethnopharmacology (impact factor 2.049) Phytomedicine (impact factor 2.330) หรือ Biofactors (impact factor 1.23)

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ หรือระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติ หรือระดับนานาชาติ

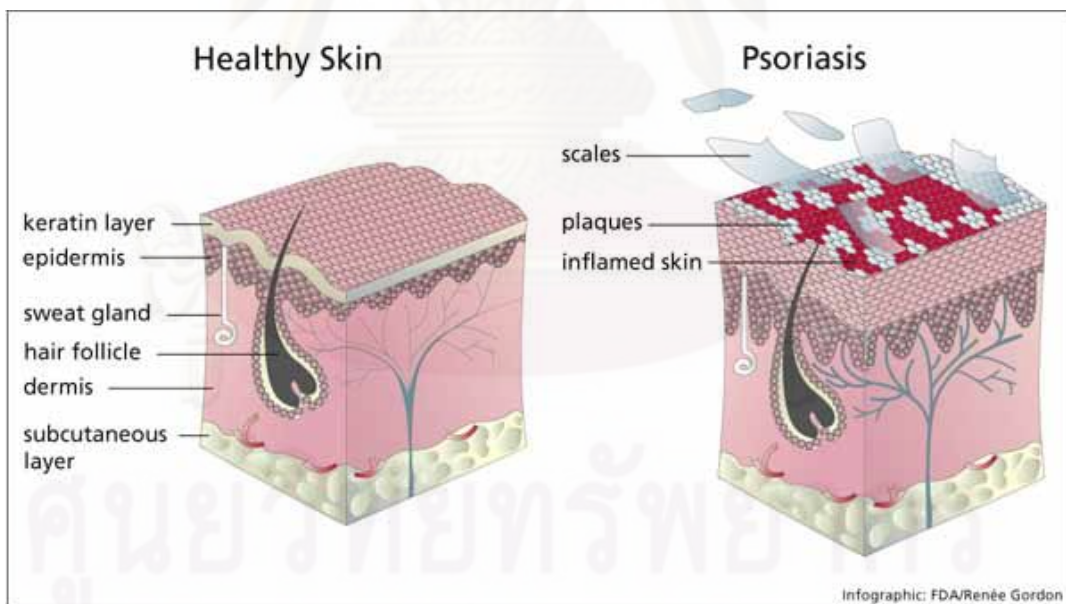
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคสะเก็ดเงิน

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังเรื้อรัง (chronic skin disease) ที่มีการตกสะเก็ด (scaling) และการอักเสบ (inflammation) ของผิวหนัง ลักษณะรอยโรคทั่วไปจะมีผื่นสีแดงที่หนา และนูนขึ้น เป็นรูปวงรี มีขอบเขตชัดเจน และปกคลุมด้วยสะเก็ดสีเทาเงิน (silvery white scale) (ภาพที่ 2.1) เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังอย่างรวดเร็ว (hyperproliferation) ร่วมกับการพัฒนาของเซลล์ผิวหนังที่ผิดปกติไป (abnormal differentiation) มักจะปรากฏรอยโรคบริเวณข้อศอก เข่า หนังศีรษะ แผ่นหลังส่วนล่าง ใบหน้า ฝ่ามือ และนิ้วเท้า อย่างไรก็ตามบริเวณส่วนอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กล่าวไว้แล้ว สามารถปรากฏรอยโรคให้เห็นได้เช่นกัน เช่น เล็บมือ เล็บเท้า เนื้อเยื่อในปาก และอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก [17]



ภาพที่ 2.1 การเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงินบริเวณผิวหนัง [18]

• ความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน [19]

มูลนิธิโรคสะเก็ดเงินแห่งชาติ (National Psoriasis Foundation) แบ่งระดับความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงินเป็น 3 ระดับ โดยประเมินจากคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยร่วมกับสัดส่วนร่างกายของผู้ป่วยที่ปรากฏรอยโรค ดังนี้

1. ระดับรุนแรงน้อย (mild psoriasis) มีหลักเกณฑ์ดังนี้ โรคสะเก็ดเงินไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ไม่พบความเสี่ยงเมื่อผู้ป่วยเข้ารับการรักษา หรือผู้ป่วยบางรายอาจไม่ต้องเข้ารับการรักษา พบรอยโรคปรากฏน้อยกว่าร้อยละ 5 ของสัดส่วนร่างกายทั้งหมด
2. ระดับรุนแรงปานกลาง (moderate psoriasis) มีหลักเกณฑ์ดังนี้ โรคสะเก็ดเงินส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย และผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาเพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิต อาจพบความเสี่ยงเมื่อผู้ป่วยเข้ารับการรักษา เช่น การรักษาอาจทำให้ผู้ป่วยมีค่าใช้จ่ายสูงขึ้นเนื่องจากยาที่ใช้ในการรักษามีราคาสูง และสิ้นเปลืองเวลา นอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายอาจไม่รู้ลึกถึงการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นหลังเข้ารับการรักษา พบรอยโรคปรากฏร้อยละ 2 ถึงร้อยละ 20 ของสัดส่วนร่างกายทั้งหมด
3. ระดับรุนแรงมาก (severe psoriasis) มีหลักเกณฑ์ดังนี้ โรคสะเก็ดเงินส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย รวมถึงการดำเนินชีวิตประจำวัน สังคมรอบข้าง และสุขภาพจิตของผู้ป่วย ผลการรักษาไม่เป็นที่พึงพอใจของผู้ป่วย พบรอยโรคปรากฏมากกว่าร้อยละ 10 ของสัดส่วนร่างกายทั้งหมด

• ชนิดของโรคสะเก็ดเงิน [20]

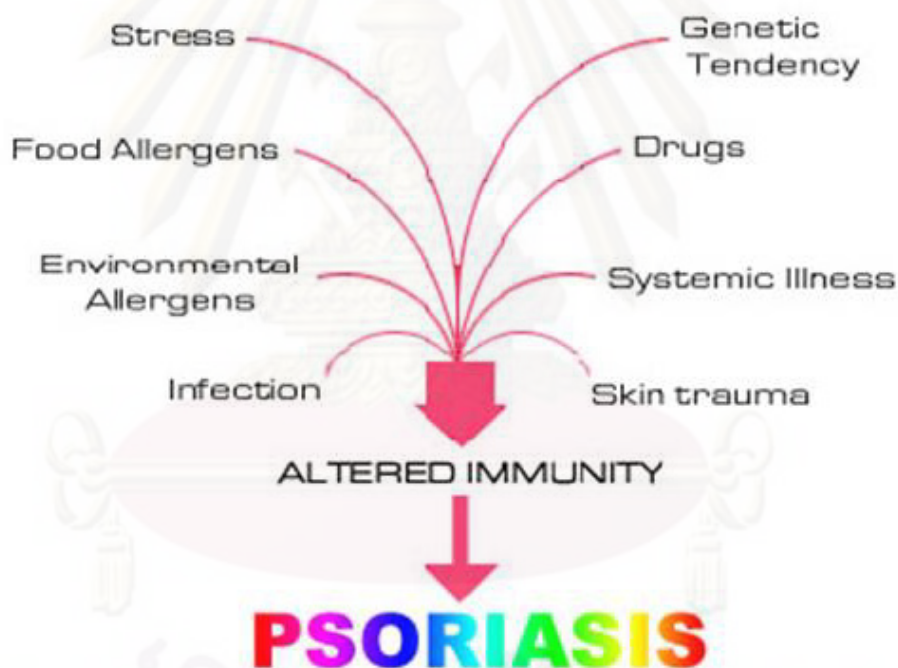
มูลนิธิโรคสะเก็ดเงินแห่งชาติ (National Psoriasis Foundation) แบ่งประเภทของโรคสะเก็ดเงินออกเป็น 5 ประเภท ดังนี้

1. Plaque (plaque psoriasis หรือ psoriasis vulgaris) เป็นประเภทที่พบได้บ่อยที่สุด โดยคิดเป็นร้อยละ 80 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินทั้งหมด ลักษณะที่ปรากฏคือ ผื่นสีแดงนูนจากการอักเสบส่วนบนของผื่นถูกปกคลุมด้วยสะเก็ดสีเทาเงิน มักพบที่บริเวณข้อศอก หัวเข่า หนังศีรษะ และแผ่นหลังส่วนล่าง

2. Guttate (guttate psoriasis) เป็นประเภทที่พบได้บ่อยในวัยเด็ก หรือวัยรุ่น ลักษณะที่ปรากฏคือ ผื่นสีแดง รูปร่างคล้ายหยดน้ำเล็กๆ ๆ (drop) ลักษณะผื่นไม่หนาตัวเหมือนกับประเภท plaque มักพบที่บริเวณลำตัว แขน และขา มีสิ่งกระตุ้นหลายประเภทที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินประเภทนี้ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory infections) การติดเชื้อสเตรปโตค็อกคัสบริเวณคอ (streptococcal throat infections) ต่อมทอนซิลอักเสบ (tonsillitis) ความเครียด การได้รับบาดเจ็บที่บริเวณผิวหนัง และการได้รับการรักษาด้วยยาบางชนิด เช่น ยาต้านมาลาเรีย
3. Inverse (inverse psoriasis) เป็นประเภทที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีน้ำหนักตัวมาก ลักษณะที่ปรากฏคือ ผื่นสีแดงอ่อน ราบเรียบ และวาวแสง มักพบบริเวณข้อพับต่าง ๆ เช่น รักแร้ ขาหนีบ ใต้ราวนม รวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก และกัน ผู้ป่วยประเภทนี้มักมีเหงื่อออกมาก บริเวณข้อพับต่าง ๆ หรืออาจได้รับสารก่อความระคายเคือง
4. Pustular (pustular psoriasis) เป็นประเภทที่พบได้ในวัยผู้ใหญ่ ลักษณะที่ปรากฏคือ ผื่นสีแดง และบริเวณรอบ ๆ ผื่นจะพบตุ่มหนองพุพอง ภายในหนองประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ พบได้ทั่วร่างกาย เช่น แขน และขา ผู้ป่วยประเภทนี้อาจมีสาเหตุมาจากยาบางชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน ได้รับสารก่อความระคายเคือง การสัมผัสรังสียูวี เป็นเวลานาน ภาวะตั้งครรภ์ การใช้ยาประเภทสเตียรอยด์ การติดเชื้อ ความเครียด และการหยุดใช้ยารักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างกะทันหัน ผู้ป่วยบางรายถึงแม้ว่าตุ่มหนองพุพองจะแห้งแล้วก็ตาม แต่พบว่าสามารถกลับมาเป็นตุ่มหนองพุพองใหม่ได้อีก เรียกผู้ป่วยประเภทนี้ว่า Zumbusch pustular psoriasis
5. Erythrodermic (erythrodermic psoriasis) เป็นประเภทที่พบได้น้อยที่สุด ลักษณะที่ปรากฏคือ เกิดการอักเสบบริเวณผื่นสะเก็ดเงิน พบได้ทั่วร่างกาย ลักษณะที่สำคัญคือ เป็น ๆ หาย ๆ กระจายทั่วร่างกาย ผิวหนังร้อนแดง และสะเก็ดหลุดลอกออกเป็นแผ่นได้ง่าย มักมีอาการเจ็บ และคันอย่างรุนแรง อัตราการเต้นของหัวใจสูงขึ้น และอุณหภูมิของร่างกายขึ้น ๆ ลง ๆ มีสิ่งกระตุ้นหลายประเภทที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินประเภทนี้ เช่น การหยุดใช้ยารักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างกะทันหัน การแพ้ยา การแพ้แสงแดดอย่างรุนแรง การติดเชื้อ รวมทั้งการได้รับยาบางชนิด เช่น ลิเทียม ยารักษาโรคมาลาเรีย และยารักษาโรคสะเก็ดเงินประเภทโคลทาร์ (coal tar)

• สาเหตุการเกิดโรคสะเก็ดเงิน

ในอดีตเชื่อว่าโรคสะเก็ดเงินมีสาเหตุหลักมาจากความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมบริเวณเซลล์ผิวหนัง ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังที่มากกว่าปกติ [21] ต่อมาในปี 1979 มีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินทำการปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) และได้รับยา cyclosporine A พบว่า ผู้ป่วยมีอาการของโรคสะเก็ดเงินดีขึ้น [22] เนื่องจากยา cyclosporine A มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte และการสร้างไซโตไคน์จาก T lymphocyte จึงเกิดความเชื่อว่า T lymphocyte มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน ดังนั้น การศึกษาหาสาเหตุการเกิดโรคสะเก็ดเงินจึงมุ่งเน้นไปที่บทบาทของ T lymphocyte เพิ่มมากขึ้น [23] ในปัจจุบันยังไม่มีการรายงานถึงกลไก และการดำเนินไปของโรคสะเก็ดเงินที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามโรคสะเก็ดเงินอาจมีปัจจัยต่าง ๆ กระตุ้นการเกิดโรคดังนี้ (ภาพที่ 2.2)



Psoriasis: Multifactorial Cause

ภาพที่ 2.2 ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน [24]

1. พันธุกรรม (Genetic factor)

ในปี 1972 Watson และคณะ ทำการศึกษาพบว่า ถ้าทั้งบิดา และมารดามีประวัติเป็นโรค สะเก็ดเงิน ลูกจะมีโอกาสเป็นโรคประมาณร้อยละ 50 ขณะที่ถ้าบิดา หรือมารดามีประวัติเป็นโรค สะเก็ดเงิน ลูกจะมีโอกาสเป็นโรคประมาณร้อยละ 16 แต่ถ้าทั้งบิดา และมารดาไม่มีประวัติเป็น โรคสะเก็ดเงิน ลูกจะมีโอกาสเป็นโรคประมาณร้อยละ 8 [25] ในปี 1974 Farber และคณะ ทำการศึกษาโรคสะเก็ดเงินในฝาแฝดพบว่า ฝาแฝดที่มาจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงินมากกว่าฝาแฝดที่มาจากไข่คนละใบ (dizygotic twins) ประมาณ 2-3 เท่า [26] แม้ว่าการศึกษาในครอบครัว (family studies) จะไม่สามารถทำให้ทราบ ถึงรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะนี้ได้แสดงให้เห็นว่า พันธุกรรมกับการเกิดโรคสะเก็ดเงินมีความสัมพันธ์กัน [27]

ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาความเชื่อมโยงของจีโนม (genomewide linkage study) กับโรคสะเก็ดเงินอย่างกว้างขวาง แต่เนื่องจากความซับซ้อนของโรคสะเก็ดเงินส่งผลให้ผล การศึกษาที่ได้มีความหลากหลาย [28, 29] อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาที่แสดงความสัมพันธ์ ของโรคสะเก็ดเงินกับยีนบริเวณ major histocompatibility complex (MHC) บนโครโมโซมคู่ที่ 6 [30, 31] เรียกยีน ณ ตำแหน่งนี้ว่า psoriasis susceptibility 1 (PSORS1) [32] ส่วนยีน ณ ตำแหน่งอื่น ๆ ที่พบความสัมพันธ์กับโรคสะเก็ดเงิน เช่น โครโมโซมคู่ที่ 17q25 (PSORS2) [33] โครโมโซมคู่ที่ 4q34 (PSORS3) [34] โครโมโซมคู่ที่ 1q (PSORS4) [35] โครโมโซมคู่ที่ 3q21 (PSORS5) [36] โครโมโซมคู่ที่ 19p13 (PSORS6) [37] และโครโมโซมคู่ที่ 1p (PSORS7) [38] เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่ายีน ณ ตำแหน่ง runt-related transcription factor 1 (RUNX1) binding-site variant บนโครโมโซมคู่ที่ 17q25 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเม็ดเลือด และระบบภูมิคุ้มกัน มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคสะเก็ดเงินเช่นเดียวกัน [39]

2. สิ่งแวดล้อม (Environmental factor)

อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นการเกิดโรคสะเก็ดเงิน มีรายงานว่า ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจำนวนมากมีอาการดีขึ้นในฤดูร้อน และกลับทรุดลงในฤดูหนาว นอกจากนี้ยัง พบว่า การได้รับบาดเจ็บอาจชักนำให้เกิดสะเก็ดเงินได้เนื่องจากการกระตุ้นของไซโตไคน์ที่ชักนำ ให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokines) หรือสิ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายตนเอง (autoantigen) ถูกเปิดเผยออก [40]

3. ยา (Drug)

กลไกการออกฤทธิ์ของยาบางชนิดอาจกระตุ้นการเกิดโรคสะเก็ดเงินได้ เช่น กลไกการออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ยับยั้ง beta-adrenergic อาจส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า และการลดลงของ cyclic AMP บริเวณชั้นหนังกำพร้า นอกจากนี้การใช้ลิเทียมอาจชักนำให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ที่ชักนำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวถูกกระตุ้น และเคลื่อนตัวมาสะสมอยู่บริเวณผิวหนัง [41]

4. การติดเชื้อ (Infection)

ในปี 1999 Gudmundsdottir และคณะ ทำการศึกษาพบความคล้ายกันของลำดับเบสจากเชื้อสเตรปโตค็อกคัสชนิด M กับเคราตินของมนุษย์ เช่น เคราติน 17 จึงเกิดสมมติฐานเกี่ยวกับการกระตุ้นเซลล์ผิวหนังของตนเอง (autoantigen) ในโรคสะเก็ดเงิน [42] ต่อมาเมื่อปี 2000 Owen และคณะ รายงานว่าการติดเชื้อสเตรปโตค็อกคัสบริเวณทางเดินหายใจส่วนบนเป็นเวลานานอาจชักนำให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน [43] นอกจากนี้ยังพบว่า การติดเชื้อเอชไอวีอาจกระตุ้นให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน หรือส่งผลให้ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีอาการที่รุนแรงขึ้น [44]

5. Keratinocyte hyperproliferation

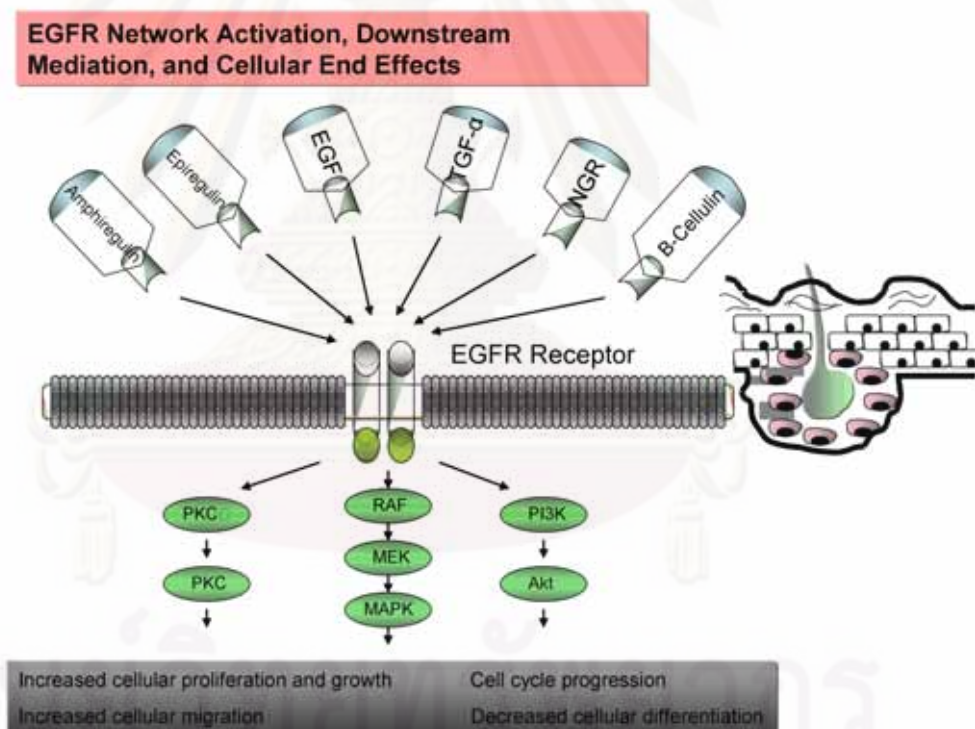
บริเวณผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิวหนังหลายชนิด ลักษณะที่เด่นชัดคือ การเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังชนิด keratinocyte ที่มากขึ้นกว่าปกติ มีการสะสมเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันบริเวณผิวหนัง และการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ส่งผลให้ผิวหนังร้อนแดง หนาตัวขึ้น และมีสะเก็ดปกคลุม โดยปกติอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังจะใช้ระยะเวลา 28-30 วัน แต่ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะใช้ระยะเวลาเร็วกว่าปกติ 28 เท่า ส่งผลให้การพัฒนา และเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิวหนังชั้นต่าง ๆ ผิดปกติตามไปด้วย เช่น การหายไปของผิวหนังชั้นกลาง (granular layer) และพบนิวเคลียสบริเวณชั้นผิวหนังชั้นนอกสุด (cornified layer) [45]

การแสดงออกของแอนติเจน (antigen) ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์บริเวณผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะมีการแสดงออกที่ผิดปกติไป เช่น การแสดงออกของ heterodimer keratin 6-keratin 16 และ heat-shock proteins พบการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติด (adhesion molecule) และการจดจำแอนติเจน (antigen recognition) ของ T lymphocyte เพิ่มสูงขึ้น เช่น intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) และ MHC class II antigen [46, 47] นอกจากนี้การพบการแสดงออกที่สูงขึ้นของ ICAM-1 (CD54), E-selectin (CD62E), vascular-cell adhesion molecule 1 (CD106) เป็นหลักฐานแสดงให้ทราบว่าเซลล์

ของผนังหลอดเลือด (vascular endothelial cell) ถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นนำไปสู่การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) บริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะกัดเงิน [48]

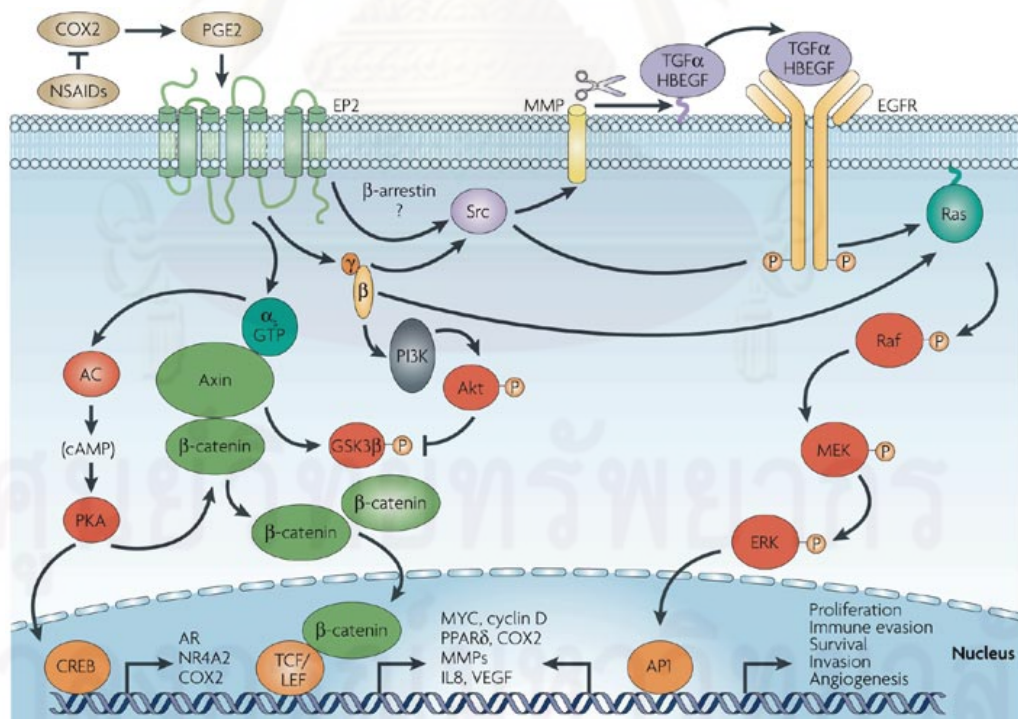
สารชีวเคมี เช่น Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor-alpha (TGF- α), Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6), Ornithine decarboxylase, Mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ Interleukin 6 เกี่ยวข้องกับกลไกการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในผู้ป่วยโรคสะกัดเงินจะพบสารชีวเคมีในกลุ่มนี้เพิ่มสูงขึ้น สารชีวเคมีแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ดังนี้

5.1 Epidermal growth factor (EGF) คือ growth factor ของ epithelial cell และ fibroblast cell เมื่อ EGF จับกับรีเซพเตอร์จำเพาะ (specific receptor) คือ epidermal growth factor receptor (EGFR) จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโต และการแบ่งตัวของเซลล์ [49]



ภาพที่ 2.3 EGFR network และผลของการจับกันระหว่าง EGF family และ EGFR receptor [50]

5.2 Transforming growth factor-alpha (TGF- α) ถูกสร้างมาจากเซลล์ macrophage, keratinocyte และเซลล์สมองเป็นหลัก TGF- α สามารถจับกับรีเซพเตอร์ของ EGF ได้ และส่งผลคล้ายกับกลไกของ EGF คือ กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง [51] เมื่อปี 1989 Elder และคณะ ได้ศึกษาพบว่า มีการแสดงออกของ TGF- α มากบริเวณผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ต่อมาในปี 1991 Nickoloff และคณะ พบว่า TGF- α จะอยู่บริเวณขอบบนของรอยโรค (epidermal roof) [52] TGF- α คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น growth factor จัดอยู่ในกลุ่มของ epidermal growth factor (EGF) family (ภาพที่ 2.3) ถูกค้นพบครั้งแรกในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (transformed fibroblasts) [53, 54] สายโพลีเปปไทด์ประกอบด้วย 50 อะมิโนเอซิก ลักษณะโครงสร้าง ร้อยละ 30 คล้ายกับ EGF อาจเรียกอีกชื่อว่า EGF-like TGF หรือ TGF type 1 [55] การสร้าง TGF- α เริ่มต้นจากสายโปรตีน (precursor) เป็นสายยาวติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (integral transmembrane protein) [56, 57] มวลโมเลกุลประมาณ 13-30 kDa จากนั้นจะผ่านกระบวนการย่อยโปรตีน (proteolytic) ได้เป็นโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ (soluble form) มวลโมเลกุล 6 kDa [58, 59] TGF- α จะออกฤทธิ์ผ่านทาง การจับกับรีเซพเตอร์ คือ epidermal growth factor receptor (EGFR) ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์ชนิด tyrosine kinase receptors (RTKs) อยู่ในกลุ่มของ ErbB family [57] มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ [60] (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 กระบวนการกระตุ้นการแสดงออกของ TGF- α ผ่าน ERFR [61]

5.3 Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) เป็นโปรตีนที่พบในเด็กแรกเกิด มีหน้าที่กระตุ้นการเจริญของกระดูก (bone) และกระดูกอ่อน (cartilage) ปกติจะไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในผู้ใหญ่ แต่ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกลับพบโปรตีนชนิดนี้สูงขึ้น เชื่อว่า BMP-6 สามารถส่งเสริมการทำงานของ growth factor ต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดรอยโรคในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ในปี 1996 Blessing และคณะ ได้ทำการทดลองในหนูพบว่า BMP-6 สามารถกระตุ้นให้หนูเป็นโรคสะเก็ดเงินได้ [62]

5.4 Ornithine decarboxylase เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในกระบวนการสร้างโพลีเอมีน (polyamine) เพื่อใช้ในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ เอนไซม์นี้จะส่งผลทางอ้อมในการทำให้เกิดรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน โดยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ผ่านกระบวนการไมโทซิส (mitosis) ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินถึงแม้ว่าจะอยู่ในระยะที่ไม่มีรอยโรคก็ตาม แต่ระดับของ ornithine decarboxylase จะยังคงมีปริมาณที่สูงอยู่เสมอ [63]

5.5 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) คือ serine/threonine-specific protein kinases ตอบสนองต่อการกระตุ้นจากสารภายนอกเซลล์ (extracellular stimuli) เช่น mitogen และควบคุมการทำงานต่าง ๆ เช่น gene expression, mitosis, differentiation และ cell survival/apoptosis รวมทั้งควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย พบว่า ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะพบ MAPK สูงขึ้นกว่าปกติ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังที่มากกว่าปกติ และนำไปสู่การเกิดรอยโรคในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน [64]

5.6 Interleukin 6 คือ ไซโตไคน์ที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บ หรือการติดเชื้อ [65, 66] กระตุ้นให้เซลล์ตับสร้าง acute phase plasma protein นอกจากนี้ยังส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวน และกระตุ้นการทำงานของ B lymphocyte และ T lymphocyte [65] มีเซลล์หลายชนิดที่สามารถหลั่ง interleukin 6 ได้ เช่น fibroblast cell, macrophage, endothelial cell และ keratinocyte ในปี 1989 Rachel และคณะ รายงานว่า interleukin 6 สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ keratinocyte ของมนุษย์ในงานเพาะเลี้ยงได้ [67]

6. Keratinocyte differentiation

เซลล์ผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมักจะมีเซลล์ผิวหนังที่มีการพัฒนาที่ผิดปกติไป ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ [68] ตัวอย่างสารชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาเซลล์ผิวหนัง เช่น Transglutaminase type I (TGase K), Skin-derived antileukoproteinase

(SKALP), Migration inhibitory factor-related protein-8 (MRP-8), Involucrin, Filaggrin และ Keratin ซึ่งสารชีวเคมีแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ ดังนี้

6.1 Transglutaminase type I (TGase K) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด cornified envelope (CE) ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยรักษาโครงสร้างของผิวหนังในชั้น stratum corneum ประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญคือ involucrin และ loricrin โดยที่ TGase K จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเชื่อมกัน (crosslinked) ของโปรตีนที่จะเป็นโครงสร้างของ CE พบว่า ในบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะมีการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดนี้มากเกินไป ทำให้เกิดการสร้าง CE มากกว่าปกติ นำไปสู่การเกิดลักษณะผิวหนังที่แข็ง (hard lesions) [69]

6.2 Skin-derived antileukoproteinase (SKALP) เป็นเอนไซม์ที่หลั่งมาจากเซลล์ผิวหนังบริเวณชั้นหนังกำพร้า มีหน้าที่หลักคือ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ไม่ให้เกิดการย่อยโปรตีน elastin ที่ช่วยให้เกิดความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อต่าง ๆ [70] พบว่า บริเวณผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะพบเอนไซม์ SKALP ในปริมาณสูง ส่งผลให้ผู้ป่วยมีลักษณะผิวหนังที่แข็ง [71]

6.3 Migration inhibitory factor-related protein-8 (MRP-8) เป็น Ca^{2+} -binding protein ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการจัดเรียง (reorganization) ของโปรตีนที่สร้างความแข็งแรงให้โครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) ปกติจะไม่พบโปรตีนชนิดนี้บริเวณผิวหนัง แต่กลับพบว่าในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และโรคผิวหนังอักเสบมีการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ ดังนั้น MRP-8 จึงอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน [72, 73]

6.4 Involucrin เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง cornified envelope (CE) โดยปกติระยะเริ่มต้นของการสร้าง CE จะมีระดับของ involucrin ที่สูง และหลังจากนั้นจะลดระดับลงเมื่อการสร้างเสร็จสมบูรณ์ แต่ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะมีระดับของโปรตีน involucrin สูงอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นบริเวณผิวหนังของผู้ป่วยจะมีการสร้าง CE เร็ว ๆ ผลสุดท้ายการสร้าง CE ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดลักษณะผิวหนังที่แข็ง [74]

6.5 Keratin expression ผิวหนังคนปกติจะพบการแสดงออกของเคราติน 1 (K1) และเคราติน 10 (K10) ในขณะที่ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะมีการแสดงออกของเคราติน 6 (K6) และเคราติน 16 (K16) บทบาทที่สำคัญของ K6 และ K16 คือ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น เกิดการสะสมบริเวณด้านบนของผิวหนัง (skin surface) จนกลายเป็น plaque [75]

6.6 Filaggrin เป็น intermediate filament-associated protein เกี่ยวข้องกับการเชื่อมกัน (cross-linked) ของเคราตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของ keratohyalin ใน granular layer ของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะไม่พบ filaggrin ทำให้ไม่มีการสร้าง granular layer ส่งผลให้ผิวหนังของผู้ป่วยจะกลายเป็นสะเก็ด (scaling) และหลุดลอกออกมาได้ง่าย [76]

7. Immunopathogenesis

การศึกษาในปี 1970 ได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน (ภาพที่ 2.5) [77] หลักฐานที่สนับสนุนแนวคิดเกี่ยวกับความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันในโรคสะเก็ดเงิน เช่น การมีเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้นบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte และ dendritic cell [78, 79] รวมทั้งลักษณะการอักเสบอย่างเรื้อรังแต่ไม่พบการติดเชื้อ หรือสิ่งที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแต่อย่างใด [29]

7.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (The innate immune system) มีหลักฐานเกี่ยวกับความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดในโรคสะเก็ดเงิน [80] พบว่า ระยะเริ่มต้น plasmacytoid dendritic cell จะถูกกระตุ้น และหลังไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงินคือ interferon- α [81] การกระตุ้น plasmacytoid dendritic cell สามารถกระตุ้นได้โดย antimicrobial peptide เช่น LL-37, cathelicidin และ DNA ผ่านทาง toll-like receptor (TLR) 9 การกระตุ้นในลักษณะนี้สามารถเกิดขึ้นกับ DNA ของเจ้าบ้าน (host DNA) ด้วย ดังนั้นผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจึงมีภาวะที่สามารถตอบสนองต่อ self antigen ได้ (immunologic tolerance) และไม่สามารถควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ [82]

7.2 บทบาทของ keratinocyte (The role of keratinocytes) keratinocyte เป็นเซลล์ผิวหนังชนิดหนึ่งสามารถตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยตอบสนองต่อไซโตไคน์ที่หลั่งมาจาก dendritic cell และ T lymphocyte รวมถึง interferon, tumor necrosis factor (TNF), interleukin-17 และ interleukin-20 family เมื่อ keratinocyte ถูกกระตุ้นจะหลั่งไซโตไคน์ที่ชักนำการอักเสบ (เช่น interleukin-1, interleukin-6 และ TNF- α) และ chemokine (เช่น interleukin-8 [CXCL8], CXCL10 และ CCL20) ส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบในโรคสะเก็ดเงิน [6] นอกจากนี้ keratinocyte ยังเป็นแหล่งของ antimicrobial peptide จำนวนมาก รวมถึง LL-37, β -

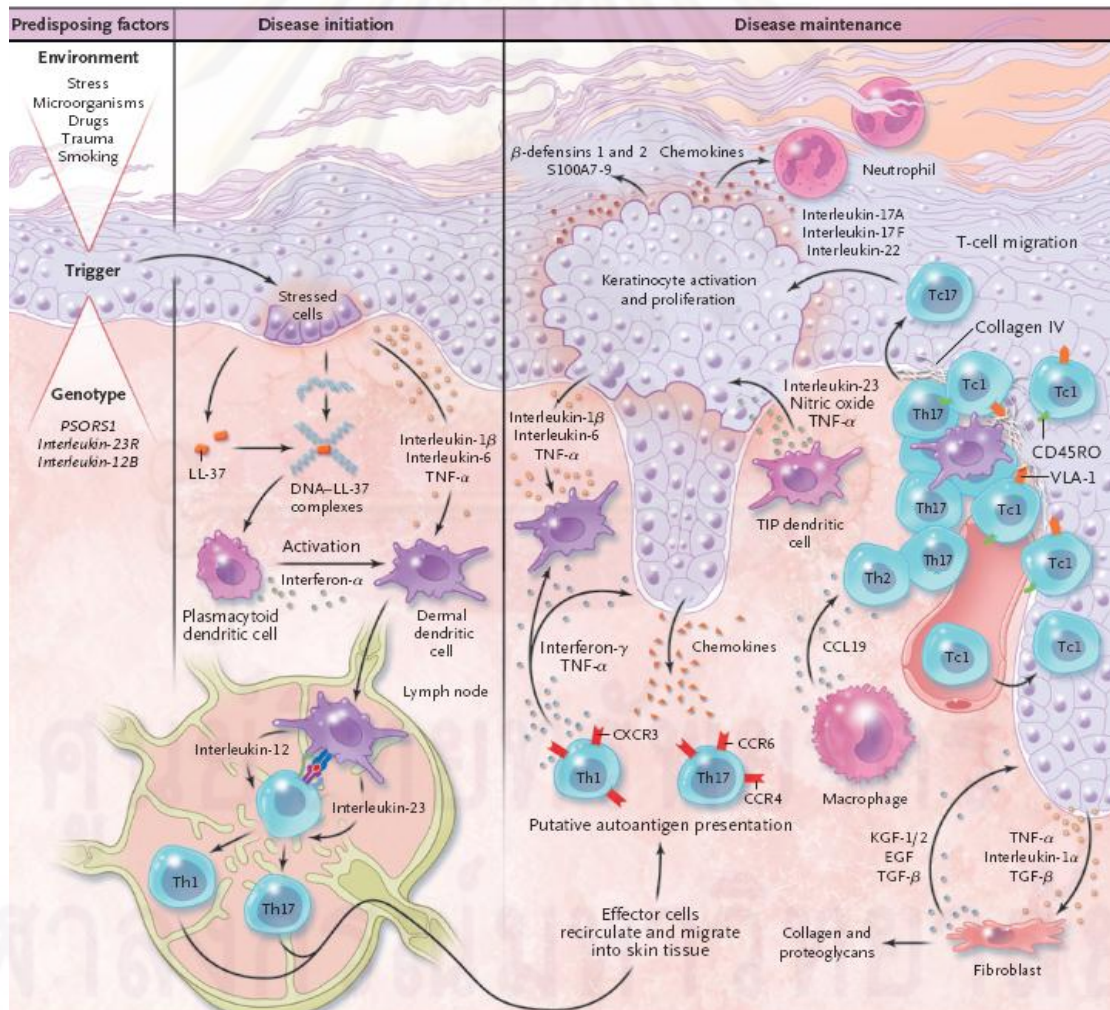
defensin และ S100A7 (psoriasin) พบว่า antimicrobial peptide เหล่านี้เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการดึงดูด (chemotactic) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมาให้อยู่บริเวณผิวหนัง [83]

7.3 Dendritic cell เป็นเซลล์ที่เชื่อมโยงระหว่างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดกับระบบภูมิคุ้มกันที่ได้มาภายหลัง พบ myeloid dermal dendritic cell เพิ่มสูงขึ้นบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน dendritic cell สามารถกระตุ้น T lymphocyte ให้เกิดการเพิ่มจำนวนตัวเอง (autoproliferation) ได้ จากนั้น T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นจะหลั่งไซโตไคน์ โดยเฉพาะ type 1 helper T cytokine (Th1 cytokine) [84] ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ดังนั้นการสะสมของ dendritic cell อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในโรคสะเก็ดเงิน [6]

7.4 T lymphocyte ในโรคสะเก็ดเงิน จะพบการเคลื่อนย้ายของ T lymphocyte บริเวณผิวหนังจากบริเวณชั้นหนังแท้ (dermis) ไปยังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) การเคลื่อนย้ายเกิดขึ้นจากการจับกันระหว่าง $\alpha_4\beta_1$ integrin (very late antigen 1 [VLA-1]) บน T lymphocyte กับ collagen IV บริเวณ basement membrane ของชั้นหนังกำพร้า [85] จากนั้น T lymphocyte จะหลั่งไซโตไคน์ต่าง ๆ แต่ที่มีความสำคัญคือ interferon- γ [86] และ interleukin-17 [87, 88] มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่า T lymphocyte ชนิดหลักที่พบบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินคือ T helper cell (Th cell) โดยเฉพาะ type 1 helper T (Th1) cell และ type 17 helper T (Th17) cell ไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้ naïve Th cell เปลี่ยนไปเป็น Th 1 cell หรือ Th 17 cell คือ IL-12, type I IFNs และ IL-23 [89-91] พบว่า Th17 cell เป็นเซลล์หลักที่ทำหน้าที่ตรวจตรา และทำลายสิ่งแปลกปลอม (immunosurveillance) บริเวณผิวหนังชั้นหนังกำพร้า นอกจากเซลล์ชนิดนี้ จะหลั่ง interleukin-17 แล้ว ยังสามารถหลั่ง interleukin-22 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เชื่อมโยงระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับความผิดปกติบริเวณชั้นหนังกำพร้าในโรคสะเก็ดเงิน กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังชนิด keratinocyte กระตุ้นการสร้าง antimicrobial peptide และสารเคมีที่ใช้ดึงดูดเซลล์ (chemokine) [92]

7.5 Cytokines, chemokines and adhesion molecules พยาธิสภาพการเกิดโรคสะเก็ดเงินพบการทำงานระหว่างไซโตไคน์ และ chemokine ร่วมกับ adhesion molecules [93, 94] โดยไซโตไคน์ที่ชักนำให้เกิดการอักเสบจะกระตุ้นการแสดงออกของโมเลกุลเกาะติด (adhesion molecule) บนเซลล์ผิวหนังชนิด endothelial cell และ keratinocyte [95, 96] ปกติเม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนที่ไปตามหลอดเลือด แต่เมื่อเกิดการแสดงออกของ adhesion molecule คือ E-selectin บน endothelial cell ของผนังหลอดเลือด เม็ดเลือดขาวจะวิ่งเข้าหาผนังหลอดเลือด

เลือด เกิดการจับกันระหว่าง ligand บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวกับ E-selectin บนผนังหลอดเลือด จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวจะกลิ้ง (rolling) ไปตามผนังหลอดเลือดไปยังบริเวณที่มีการหลั่ง chemokine และแทรกตัวออกจากผนังหลอดเลือด (extravasation) ไปสู่วิวหนังในที่สุด [97-101] พบ chemokine ที่สำคัญคือ CCL20 (macrophage inflammatory protein3 α หรือ MIP-3 α) [94], CCL27 (cutaneous T cell attracting chemokine หรือ CTACK) [102], monokine induced by interferon-g (MIG) [103], RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) และ monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) [45] โดยมีบทบาทสำคัญคือ ช่วยดึงดูด T lymphocyte ให้เคลื่อนที่ไปบริเวณ psoriatic plaques [94, 102] ขณะเดียวกันกลุ่ม effector T lymphocyte จะมีการแสดงออกของรีเซพเตอร์ (receptor) เพื่อจับกับ chemokine ที่ถูกหลั่งออกมา เช่น skin homing receptor CLA และ CC chemokine receptor 4 (CCR4) [104]



ภาพที่ 2.5 ความสัมพันธ์ของสิ่งแวดล้อม ลักษณะทางพันธุกรรม และระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน [6]

8. Neuropeptide

สารกลุ่ม neuropeptide เช่น substance P และ nerve growth factor รวมถึงรีเซพเตอร์คือ p75 neurotrophin receptor และ tyrosine kinase A เป็นอีกตัวกลางหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงิน โดยมีส่วนช่วยให้เกิดการดิ่งดูด และการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวที่สำคัญยังก่อให้เกิดปลายประสาทใหม่ที่ผิวหนังบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน [105, 106]

โดยสรุปแล้วการทราบถึงบทบาทของ T lymphocytes และสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อการดิ่งดูดเม็ดเลือดขาวจนนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคสะเก็ดเงินนั้นจะช่วยให้เกิดแนวทางการรักษา และบรรเทาอาการของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินได้ [107, 108]



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 สารบ่งชี้ (biomarker) ต่าง ๆ ที่พบในโรคสะเก็ดเงิน [109]

Proposed marker	Nature of expression in psoriasis	Source
Oxidative stress		
Thiobarbituric acid	↑	Blood
Malondialdehyde	↑	Tissue
Superoxide dismutase	↓	Blood
Glutathione peroxidase	↓	Blood
Catalase	↑	Blood
Neutrophil function	↑	Blood
Oxidised LDL	↑	Tissue
Anti-oxidised LDL antibody	↑	Blood
Cytokeratins	+	Tissue
Keratinocyte hyperproliferation		
Heat-shock proteins (27, 60)	+	Tissue
Connexins (26, 30)	↑	Tissue
Bcl-X, Bax, p53, Bak	↑	Tissue
Epidermal growth factor	↑	Tissue
TGF- α	↑	Tissue
Ornithine decarboxylase and MAPK activities	↑	Tissue
AP1, BMP-6	*	Tissue
Keratin (6, 16)	↑	Tissue
Abnormal keratinocyte differentiation		
TGase K	↑	Tissue
Keratin 1/10	↓	Tissue
Involucrin	↑	Tissue
SKALP	+	Tissue
MRP-8	+	Tissue
Filaggrin	-	Tissue

ตารางที่ 2.1 สารบ่งชี้ (biomarker) ต่าง ๆ ที่พบในโรคสะเก็ดเงิน (ต่อ)

Proposed marker	Nature of expression in psoriasis	Source
Inflammation		
Anti-calpastatin antibody	↑	Blood
C-reactive protein	↑	Blood
Fibrinogen	↑	Blood
Haptoglobin	↑	Blood
TNF- α , IFN- α , IFN- γ , interleukins (2, 6, 8, 12, 15, 17, 22, 23), LIF1	↑	Blood
Interleukins (1, 4, 5, 10)	↓	Blood
TGF- β , interleukin-18	†	Blood
Neuropeptides		
SP, VIP, PACAP-38, CGRP, NGF	↑	Tissue
Somatostatin	↓	Tissue

+ พบเฉพาะบริเวณรอยโรคในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเท่านั้น

- ไม่พบในผิวหนังคนปกติ

↑ การแสดงออกเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

↓ การแสดงออกลดลงในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

* พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออก

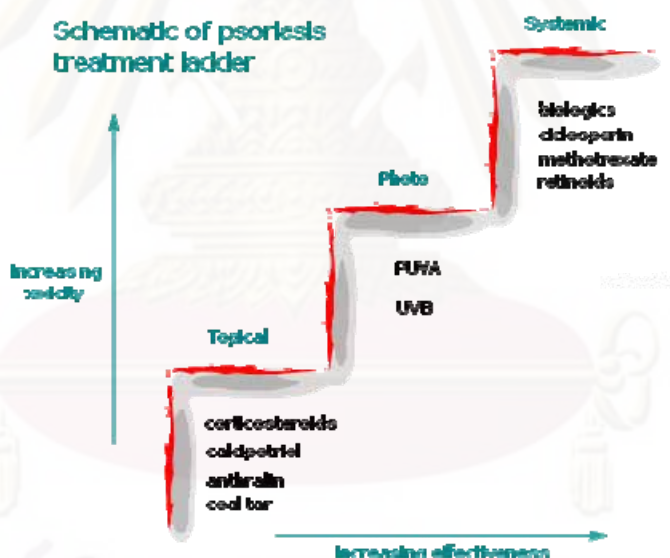
† วัดระดับการแสดงออกร่วมกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

• การรักษาโรคสะเก็ดเงิน

ปัจจุบันการรักษาโรคสะเก็ดเงิน อาจแบ่งได้ดังนี้ การใช้ยาทาเฉพาะที่ (topical therapy) [110] การฉายแสง (phototherapy) [111] และการให้ยารับประทาน (systemic therapy) [112-114] ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินประมาณร้อยละ 70-80 จะได้รับการรักษาตามอาการ ยาที่ใช้รักษาส่วนใหญ่จะมีกลไกการออกฤทธิ์เฉพาะส่วน เช่น fumarates และ cyclosporine จะกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) ขณะที่ retinoids และ methotrexate จะมีผลต่อการทำงานของ keratinocyte การใช้ vitamin D₃ analogues ร่วมกับ phototherapy หรือการใช้ systemic retinoids ร่วมกับ psoralen และ ultraviolet A phototherapy (RePUVA) อาจทำให้การรักษาโรคสะเก็ดเงินครอบคลุมมากขึ้น และให้ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น พบว่า การรักษาด้วย vitamin D₃ analogues และ retinoid tazarotene จะเป็นที่ยอมรับมากกว่าการใช้ anthralin หรือ coal tar อย่างไรก็ตามยาทั้งหมดที่กล่าวมาส่งผลให้เกิดอาการระคายเคือง หรือการอักเสบบริเวณผิวหนังที่บอบบางได้ [45]



ภาพที่ 2.6 การรักษาโรคสะเก็ดเงินด้วยวิธีต่าง ๆ [115]

ถึงแม้ว่ายาที่ใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินในปัจจุบันจะให้ผลการรักษาที่ดี แต่ยาต่าง ๆ ที่กล่าวมาสามารถใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินได้ในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น เนื่องจากการใช้ยาเหล่านี้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะเกิดผลข้างเคียงที่อันตรายได้ [116] นอกจากนี้ยังพบว่า ยิ่งประสิทธิภาพการรักษาให้ผลดีมากขึ้น ผลข้างเคียงของการรักษาก็เพิ่มขึ้นตามเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2.6) [115] เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาพบว่า มีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินส่วนหนึ่งสั่งซื้อยา และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้

รักษาโรคทางอินเทอร์เน็ต [117] อาจแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยเริ่มให้ความสนใจการรักษาทางเลือกมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ดังนั้นปัจจุบันจึงเริ่มมีการพัฒนาการรักษาทางเลือกโดยใช้สารสกัดจากพืช และสมุนไพรต่าง ๆ จะเห็นได้จากหลาย ๆ ประเทศได้พยายามศึกษา และพัฒนาการรักษาโรคสะกดเงินโดยการใช้สารสกัดจากพืช และสมุนไพร [118]

มีรายงานถึงสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะกดเงินได้ เช่น *Radix Peucedani*, *Ramulus Visci*, *Folium Ginkgo*, *Radix Astragali*, *Radix Phytolaccae* และ *Folium Notoginseng* [119] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า สาร Baicalin และ Scutellarein ที่สกัดจาก *Radix Scutellariae* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังในช่วงระยะ G_0 - G_1 phase ได้ [120]

เมื่อปี 2006 Wai-Pui Tse และคณะ ได้ทำการศึกษาสมุนไพรจีน 60 ชนิด พบว่า รากของ *Rubia cordifolia* L. (Rubiaceae), Realgar และ rhizome ของ *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae) มีฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงได้ [121]

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัยมีดังนี้

1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

1.1.1 เซลล์ผิวหนัง HaCaT (Human keratinocyte cell line) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof.Dr.N.E.Fusenig, German Cancer Research Centre, Heidelberg ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี



ภาพที่ 3.1 เซลล์ผิวหนัง HaCaT (Human keratinocyte cell line)
ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Invert Microscopy) โดยตรงกำลังขยาย 40 เท่า

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM/High glucose) (Hyclone) ที่มี fetal bovine serum (Hyclone) อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/ml (Hyclone) โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

1.2 ตัวอย่างของสมุนไพรไทย

สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง มีทั้งหมด 9 ชนิด ดังนี้

1.2.1 ขมิ้นชัน	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	เหง้า
1.2.2 ข่า	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	เหง้าและแง่ง
1.2.3 ขิง	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	เหง้าและแง่ง
1.2.4 ชุมเห็ดเทศ	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	ต้น
1.2.5 ทองพันชั่ง	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	ใบและก้านใบ
1.2.6 น้อยหน่า	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	ใบ
1.2.7 บัวบก	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	ทั้งต้น
1.2.8 มะคำดีควาย	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	ผล
1.2.9 ทับทิม	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	เปลือกของผลทับทิม
1.2.10 พลูดาว	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	ใบ
1.2.11 เสดดพังพอนตัวเมีย	ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ	ใบ



ภาพที่ 3.2 สวนสมุนไพร สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จ.ระยอง
สถานที่ผู้วิจัยไปเก็บสมุนไพรไทย สำหรับการวิจัยครั้งนี้

พิสูจน์ชนิดของสมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษาวิจัยโดย ศ.ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเก็บตัวอย่างของสมุนไพรไทยในพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยสามารถแบ่งได้เป็น 4 หมวดคือ

I. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากสมุนไพร

Ethanol	Merck, เยอรมนี
Hexane	Merck, เยอรมนี
Sterile Water (deionized water)	General Hospital Products

II. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพร ที่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง

Dulbecco's Modified Eagle Medium/ High glucose (DMEM: with 4 mM/L Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin Solution (10,000 units/ml Penicillin/ 10,000 µg/ml Streptomycin)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Fetal Bovine Serum (FBS)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline (PBS: without calcium without magnesium)	HyClone, สหรัฐอเมริกา
Recombinant Human TNF- α	Proteotech, สหรัฐอเมริกา
Recombinant Human IFN- γ	Proteotech, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
Neutral Red Dye	Merck, เยอรมนี

3-(4,5-dimethylthianisol-2-yl)-2,	Calbiochem, เยอรมนี
5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	
Trypan Blue Stain 0.4%	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Calcium chloride	Merck, เยอรมนี
Formaldehyde	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์, ไทย

III. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพร ที่มีผลต่อการแสดงออกของ TGF- α ในระดับ mRNA

TRI Reagent®	Molecular Research Center, สหรัฐอเมริกา
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Isopropanol	Merck, เยอรมนี
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega, สหรัฐอเมริกา
Oligo-dT 20-mer	Biobasic, แคนาดา
Primer	Biobasic, แคนาดา
Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)	Fermentas, แคนาดา
RiboLock™	Fermentas, แคนาดา
Taq DNA polymerase with	New England Biolabs, สหรัฐอเมริกา
DNA Ladder 100 bp	Fermentas, แคนาดา
GenePure LE Agarose	ISE BioExpress, สเปน

IV. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพร ที่มีผลต่อการแสดงออกของ TGF- α ในระดับโปรตีน

Tris, Ultra Pure	Research organic, สหรัฐอเมริกา
Sodium chloride	Merck, เยอรมนี
85% Phosphoric acid	Merck, เยอรมนี
Serva Blue G	AppliChem
Nonidet P 40	Biobasic, แคนาดา

Dithiothreitol (DTT)	Biobasic, แคนาดา
phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)	USB, สวิตเซอร์แลนด์
30% Acrylamide and Bis-Acrylamide Solutions	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Ammonium persulfate	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Sodium Lauryl Sulphate (Sodium Dodecyl Sulphate) SDS	Ajax Finechem, ออสเตรเลีย
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Glycine, USP grade	Research organic, สหรัฐอเมริกา
Polyxyethylene-20 sorbitan monolaurate (Tween 20)	Biobasic, แคนาดา
Bovine Serum Albumin	PAA, ออสเตรเลีย
2-mercaptoethanol	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Glycerol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling, แคนาดา
Rabbit polyclonal antibody (TGF- α)	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Rabbit polyclonal antibody (GAPDH)	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Kodak BioMak light film	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Kodak processing chemicals for autoradiography films	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

V. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอล

Folin Ciocalteu's phenol reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Gallic acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium carbonate	Merck, เยอรมนี

เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

BioRad Mini Protean 3	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Western transblot system	
Thermal Cycler	MJ Research Inc., สหรัฐอเมริกา
Gel Electrophoresis Apparatus	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Electrophoresis power supply	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Gel documentation (gel doc) systems	Syngene, อังกฤษ
Inverted microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Light microscope	Olympus Optical, ญี่ปุ่น
Larminar Flow Cabinet	E.S.I. Flufrance, ฝรั่งเศส
Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs)	Thermo Electron Corporation, สหรัฐอเมริกา
MiVac Quattro concentrator	GeneVac®, สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer (FINE VORTEX)	FINEPCR, เกาหลีใต้
6 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
96 well cell culture plate flat bottom with lid	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Cell Culture Flask (25, 75 cm ²)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Disposable Serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Nunc, เดนมาร์ก
Analytical Balances	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Multichannel pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Microcentrifuge tube (0.2 และ 0.6 ml.)	Axgen scientific, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml.)	Biologix Research company, สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (10, 200, 1000 µl.)	Sorenson TM BioScience, Inc., สหรัฐอเมริกา

Sterile aerosol pipette tip (10, 200, 1000 μ l.)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Block heater	Wealtec Corp., สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Sheldon Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Glassware	Pyrax, สหรัฐอเมริกา
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Incubator	Memmert, เยอรมนี
Water Bath	Memmert, เยอรมนี
-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80 °C ULT Deep Freezer	IIShin Lab, เกาหลีใต้
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Sonicator	Soniclean, สหรัฐอเมริกา
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลีใต้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

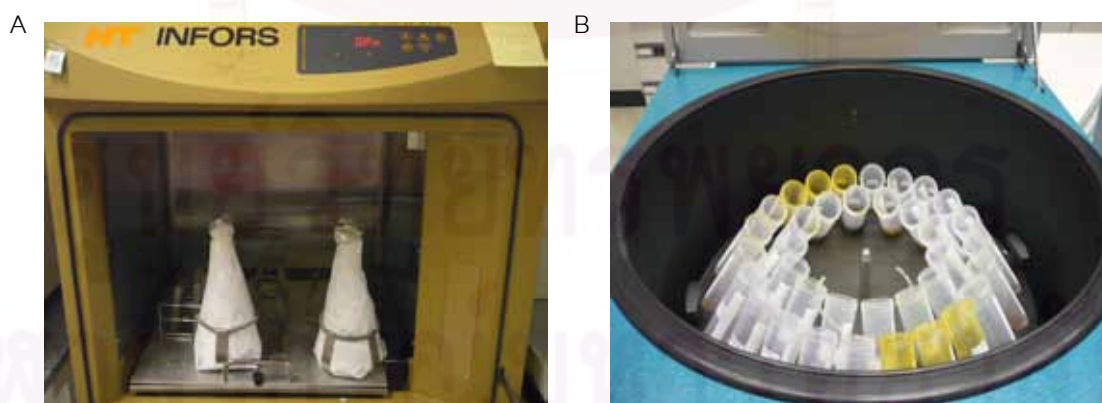
3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสำรวจ และรวบรวมความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรไทย ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังประเภทต่าง ๆ

เพื่อทราบถึงประเภทของสมุนไพรไทย ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังประเภทต่าง ๆ โดยสำรวจ และรวบรวมความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรไทย ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ จากเอกสารที่ผู้รู้ได้รวบรวมไว้ รวมทั้งรวบรวมข้อมูลสารออกฤทธิ์ของสมุนไพรไทยที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว ทั้งในและต่างประเทศ

3.2 การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration)

วิธีมาเซอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช หรือสมุนไพร โดยการหมักพืช หรือสมุนไพรกับตัวทำละลายจนกระทั่งเนื้อเยื่อของพืช หรือสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในพืช หรือสมุนไพรออกมาได้ เริ่มจากนำสมุนไพรสดมาล้างน้ำให้สะอาด และนำไปตากให้แห้ง บดสมุนไพรให้ละเอียด นำไปหมักกับตัวทำละลาย (อัตราส่วนระหว่างสมุนไพรบดแห้งกับตัวทำละลายคือ สมุนไพรบดแห้ง 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 5 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แรงเขย่า 120 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองส่วนใ้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำกากที่เหลือสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยตัวทำละลายชนิดเดิม แล้วรวมส่วนใ้ที่ได้เข้าด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธี evaporation ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ออกมา ละลายสารสกัดหยาบให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย dimethyl sulphoxide (DMSO) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.3)

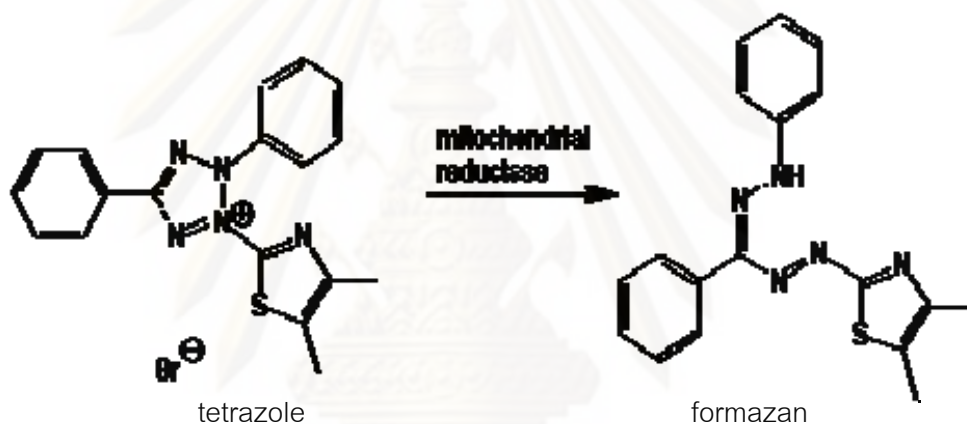


ภาพที่ 3.3 การสกัดสมุนไพรไทย (A) การหมักสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) (B) การระเหยตัวทำละลายออก โดยวิธี evaporation

3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคมะเร็งเกิดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย

3.3.1 การตรวจวัดการทำงานของเซลล์ โดยการตรวจวัดความสามารถในการเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ด้วยวิธี MTT assay [122]

เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assays) โดยสารสีเหลือง MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ NADPH ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan สีม่วง (ภาพที่ 3.4) สามารถละลายตะกอน formazan ด้วยสารตัวทำละลาย เช่น DMSO หรืออาจใช้ sodium dodecyl sulfate ที่เจือจางด้วยกรด hydrochloric จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 500-600 nm



ภาพที่ 3.4 ปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay [123]

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 1×10^4 เซลล์ กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ IFN- γ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังนี้ 1.) สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625 และ 0.1953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.) DMSO 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.) dithranol ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625 และ 0.1953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 4.) acetone 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 5.) DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ (positive control) 6.) อาหารเลี้ยงเซลล์ (negative control) โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ในตู้เพาะเลี้ยง

เซลล์ ที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด เติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5) 20 ไมโครลิตร (สารละลาย MTT 10 ไมโครลิตรต่อปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร) แล้วนำกลับเข้าไปในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งทั้งหมด เติม DMSO 200 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงจนตะกอนถูกละลายหมด ปั่นจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสด้านบน 100 ไมโครลิตร ใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) และค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เซลล์ตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้

คำนวณ % cell viability ดังนี้

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

คำนวณ IC₅₀ จาก Logarithmic graph

3.3.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเซลล์ (Cellular activity) โดยการตรวจวัดความสามารถในการเก็บกักเม็ดสี ด้วยวิธี Neutral Red accumulation assay [124]

เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assays) โดยสารสีแดง Neutral Red (3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride) จะเข้าไปภายในเซลล์โดยการจับกับเม็ดสีของเซลล์ ซึ่งอาศัยพลังงาน ATP จากกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังนั้นหากเซลล์ตายจะไม่มีพลังงานดังกล่าวในการจับกับเม็ดสี

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 1×10^4 เซลล์ กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ IFN- γ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังนี้ 1.) สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625 และ 0.1953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.) DMSO 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.) dithranol ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625 และ 0.1953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 4.) acetone 1 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 5.) DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ (positive control) 6.) อาหารเลี้ยงเซลล์ (negative control) โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร ในตู้เพาะเลี้ยง

เซลล์ ที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด ดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งให้หมด แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสี Neutral Red 200 ไมโครลิตร แล้วนำกลับเข้าไปในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ให้นำสีส่วนเกินออกจากจานเพาะเลี้ยงโดยการคว่ำจานเพาะเลี้ยง ล้างเซลล์ และสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาดีไฮด์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (สารละลายนี้จะช่วยส่งเสริมให้เซลล์เกาะกับพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงได้ดียิ่งขึ้น) คว่ำจานเพาะเลี้ยงเพื่อนำสารละลายที่ใช้ล้างเซลล์ออก เติมห่วงทำละลายตะกอนคือ 1 เปอร์เซ็นต์ เกซีลแอซิติคเอซิก และ 50 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 200 ไมโครลิตร ดูดชั้นลงเพื่อละลายตะกอนสีให้หมด ปั่นจานเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนน้ำใสด้านบน 100 ไมโครลิตร ใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ดังนี้

คำนวณ % cell viability ดังนี้

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

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย ที่มีผลต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน TGF- α ด้วยเทคนิค RT-PCR

3.4.1 การสกัด Total RNA

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ IFN- γ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังนี้ 1.) สารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด คือ ขมิ้น ข่า และน้อยหน่า ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.) DMSO 0.0067 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับขมิ้น และ DMSO 0.0063 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับข่า และน้อยหน่า 3.) อาหารเลี้ยงเซลล์ (negative control) โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด ดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งให้หมด ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น 2 ครั้ง เติมน้ำยา Tri Reagent® 1 มิลลิลิตร ต่อเซลล์ 10 ล้านเซลล์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิตั้งที่ 15 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เติมสารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเอทิลแอลกอฮอล์ (24:1) ที่เย็นลงไป 200 ไมโครลิตร ต่อน้ำยา Tri Reagent® 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรงให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูเฉพาะส่วนน้ำใสชั้นบนสุด ซึ่งอาร์เอ็นเอจะอยู่ในชั้นนี้ 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซโพรพานอลที่เย็นลงไป 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาประมาณ 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเห็นตะกอนอาร์เอ็นเอสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย 75 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลในน้ำ (DEPC-treated water) ที่ปราศจาก เอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเอ (RNase) ปั่นที่ความเร็ว 7500 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC ที่ปราศจาก RNase ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ได้นานหลายเดือน (ภาพที่ 3.5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการสกัด Total RNA [125]

3.4.2 การวัดความเข้มข้นของ Total RNA ที่สกัดได้ ด้วยการวัดค่า Optical Density (OD)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 2 ไมโครลิตร ตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง NanoDrop เฉพาะสำหรับวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ โดยให้ค่า OD₂₆₀ มีค่าเท่ากับ 1.00 เทียบได้กับปริมาณอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ต้องเจือจางอาร์เอ็นเอด้วยน้ำกลั่นก่อน เครื่องจะทำการคำนวณค่าความเข้มข้นอาร์เอ็นเอจากสูตร $[RNA] = OD_{260} \times 40 \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 10^{-3}$

3.4.3 การกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัม มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ DNase I ดังตารางที่ 3.1 ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา ให้หยุดการทำงานของเอนไซม์ DNase I ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเติมน้ำยา เพื่อกำจัด DNA ปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง RNA

Reagent	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (µl)
10x DNase I Reaction buffer	1
DNase I	1
RNA	ขึ้นกับความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่าง
DEPC-treated water	เติมให้ปริมาตรของปฏิกริยาครบ 10 µl
รวมปริมาตรทั้งหมดเป็น 10 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที	
25 mM EDTA, pH 8.0	1
นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที	

3.4.4 การสร้าง complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อน 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT) ดังตารางที่ 3.2 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา คือ Pre-extended อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (1 รอบ) Extension อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที (1 รอบ) และ Inactivation อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (1 รอบ)

ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนการเติมน้ำยา เพื่อสร้าง cDNA จาก RNA

Reagent	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (μl)
DEPC-treated water	1.3
ImProm-II™ 5X Reaction Buffer	4
1.5 mM MgCl ₂	1.2
10 nM dNTP Mix	1
10 μM Oligo-dT 20 mer	1
40 unit RiboLock	0.5
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	1
RNA	10
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร	

3.4.5 การทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน TGF- α ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน TGF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT โดยใช้ cDNA จากขั้นตอน 3.4.4 เป็นต้นแบบ ผสมกับน้ำยา ดังตารางที่ 3.3 และใช้ primers ที่จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจ ดังตารางที่ 3.4 รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่อง ThermalCycler สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3.5 ตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) บน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความต่างศักย์ 90 โวลต์ ย้อมด้วยสีเอทีเดียมโบรมาйд และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้ว ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล เปรียบเทียบความเข้มของชิ้นผลิตภัณฑ์ (product band) เพื่อดูระดับการแสดงออกของ TGF- α เทียบกับชิ้นผลิตภัณฑ์ของยีนควบคุม (β -actin band)

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการเติมน้ำยา เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีนที่สนใจศึกษา

Reagent	ปริมาตรต่อ 4 ปฏิกริยา (μ l)
Milli-Q water	58.3 สำหรับ TGF- α 66.3 สำหรับ β -actin
10X Standard Buffer	13
DMSO	5
10 nM dNTP Mix	2
10 μ M Forward primer	0.5
10 μ M Reward primer	0.5
Taq-DNA polymerase	0.7
cDNA	5 สำหรับ TGF- α 3 สำหรับ β -actin
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร เพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR	

ตารางที่ 3.4 Primers จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน และขนาดของผลิตภัณฑ์

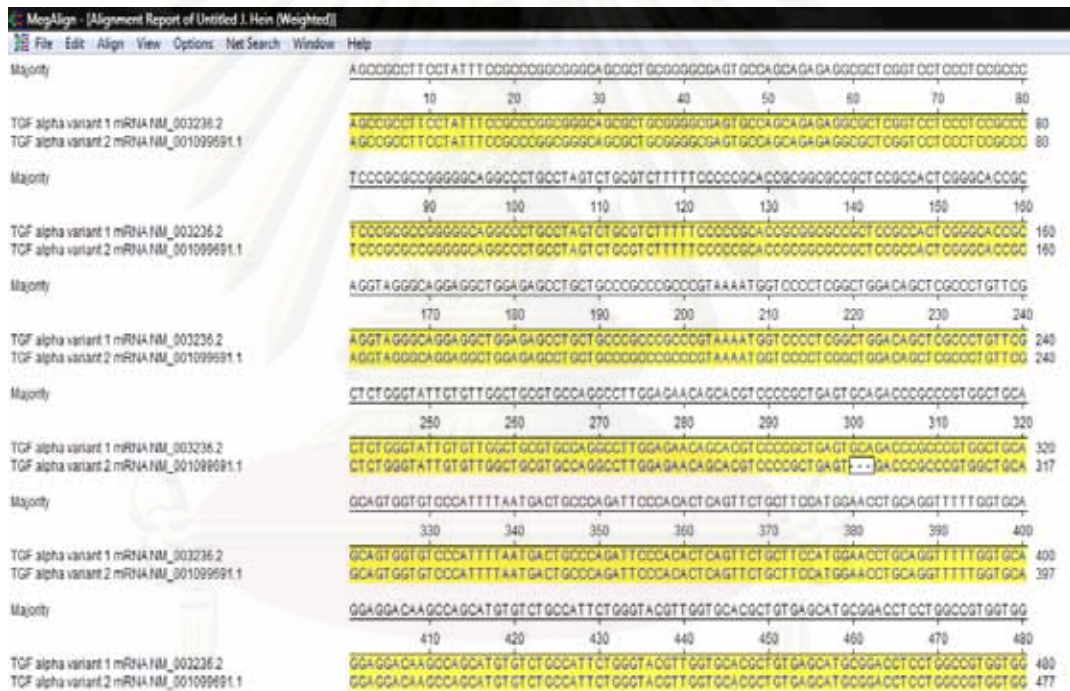
ยีน	ลำดับเบส	ขนาดผลิตภัณฑ์
TGF- α forward	5' GCT CGC CCT GTT CGC TCT G 3'	387 bp
TGF- α reverse	5' AGG GCC CGG CAC CAC TC 3'	
β -actin forward [126]	5' ACG GGT CAC CCA CAC TGT GC 3'	656 bp
β -actin reverse [126]	5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT 3'	

ตารางที่ 3.5 ปฏิกริยา และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของยีน TGF- α และ β -actin

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre-denature	94	5	1
Denature	94	1	40
Annealing	60	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	7	
Hold temp.	4	forever	-

3.4.6 การออกแบบ primers

คณะผู้วิจัยสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> พบว่า TGF- α มี 2 variants คือ NM_003236.2 เป็น variant 1 และ NM_001099691.1 เป็น variant 2 ดังนั้นคณะผู้วิจัย จึงได้ออกได้ primers ให้สามารถจับได้ทั้ง 2 variants โดยใช้โปรแกรม Lasergene® 7 (<http://www.biocompare.com/Articles/New Technology/1717/Lasergene-7-Software.html>) จากการใช้คำสั่ง MegAlign พบว่า ทั้ง 2 variants มีความแตกต่างกัน ณ ตำแหน่งเบสที่ 300-302 (ภาพที่ 3.6) จากนั้นจะใช้คำสั่ง PrimerSelect เพื่อออกแบบเส้น primers ตรวจสอบว่า primers ที่ออกแบบมานั้นสามารถจับได้ทั้ง 2 variants โดยใช้คำสั่ง SeqBuilder นอกจากนี้ได้นำลำดับเบสของ primers ที่ออกแบบมา ตรวจสอบกับฐานข้อมูล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) อีกครั้ง



ภาพที่ 3.6 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันของ TGF- α ทั้ง 2 variants

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย ที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน TGF- α ด้วยเทคนิค Western blot

3.5.1 การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยการใช้ Nonidet-P40 (NP-40) lysis buffer

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 mm จำนวนเซลล์ต่อจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 1×10^7 เซลล์ กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ IFN- γ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังนี้ 1.) สารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด คือ ขมิ้น ข่า และน้อยหน่า ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.) DMSO 0.0067 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับขมิ้น และ DMSO 0.0063 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับข่า และน้อยหน่า 3.) อาหารเลี้ยงเซลล์ (negative control) โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 8 มิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด ดูดส่วนน้ำใส่ด้านบนทิ้งให้หมด ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น 2 ครั้ง เติมน้ำ NP-40 lysis buffer ที่เย็น 500 ไมโครลิตร ชูด (scrape) เซลล์บนน้ำแข็งให้เซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง โดยใช้ที่ชูดเซลล์ที่เย็น (cold cell scraper) จากนั้นดูดทิ้งหมดใส่ในหลอดทดลองที่เย็นขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนในเครื่อง orbital shaker อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้งหมดใส่หลอดทดลองใหม่ที่เย็นขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บโปรตีนที่ได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธี Bradford assay [127]

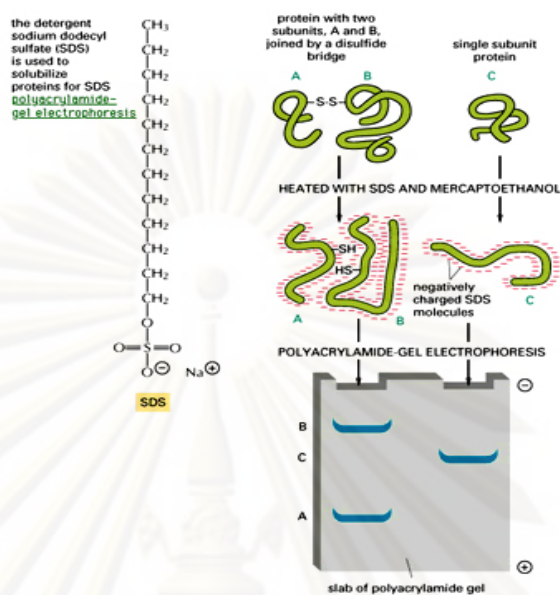
3.5.2 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธี Bradford assay

ดูดโปรตีน 2 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ Milli-Q 98 ไมโครลิตร เติมน้ำ bradford working buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ดูดมา 100 ไมโครลิตร ใส่จาน 96 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจาก standard curve และคูณ dilution factor กับความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้

3.5.3 การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล (SDS-PAGE)

เป็นการแยกโปรตีน โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโปรตีน (molecular weight) บนเจลอะคริลามิเด (acrylamide) แบบ denature gel หรือที่เรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) SDS เป็นสาร ionic detergent ที่จะเข้าไป

จับกับโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ และกลายเป็นประจุลบ จึงทำให้การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จะเป็นการแยกตามขนาดโมเลกุลของโปรตีน (ภาพที่ 3.7)



ภาพที่ 3.7 การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล (SDS-PAGE) [128]

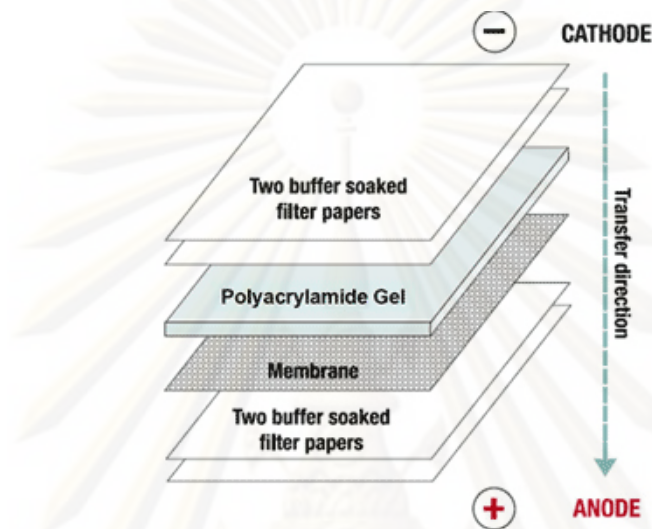
เตรียม 5 เปอร์เซ็นต์ stacking gel และ 15 เปอร์เซ็นต์ separating gel โดยใช้ polyacrylamide gel จากนั้นเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับ load ลงเจล 3 และ 20 ไมโครกรัม (GAPDH และ TGF- α ตามลำดับ) โดยเจือจางตัวอย่างโปรตีนด้วย laemmli sample buffer อัตราส่วน 1:1 (vortex และ spin down) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที load โปรตีนตัวอย่างลงเจลที่เตรียมไว้ แยกขนาดของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) บน 5 เปอร์เซ็นต์ stacking gel ด้วยความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และบน 15 เปอร์เซ็นต์ separating gel ด้วยความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 150 นาที

3.5.4 การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Immunoblotting)

เป็นการย้ายโปรตีน ที่ผ่านการแยกด้วย gel electrophoresis ลงสู่แผ่นเมมเบรน ที่มีประจุบวก คือ polyvinylidene fluoride (PVDF) หรืออาจใช้ nitrocellulose โดยใช้วิธี wet tank transfer เป็นการย้ายโดยอาศัย buffer tank

เตรียมแผ่น PVDF membrane โดยการแช่ใน absolute methanol เพื่อให้ PVDF membrane มีขี้ว ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน transfer buffer ที่เย็น จากนั้นลอกแผ่นเจลออกจากกระบอก นำไปแช่ใน transfer buffer ที่เย็นเช่นเดียวกัน ประคบเจลและแผ่น PVDF membrane ด้วยตลับประคบ โดยวางเรียงจากขี้วลบ (สีดำ) ไปขี้วบวก (สีแดง) ดังนี้ ฟองน้ำ

(fiber pad) กระดาษกรอง แผ่นเจล แผ่น PVDF membrane กระดาษกรอง และฟองน้ำ ตั้งตลับประกบลงในแท็งก์ (tank) โดยหันขั้วลบเข้าหาขั้วลบ และขั้วบวกเข้าหาขั้วบวก (ภาพที่ 3.8) เติม transfer buffer ที่เย็น ให้ท่วมตลับประกบ ปิดฝาแท็งก์ แล้วนำไปวางในภาชนะที่หล่อด้วยน้ำแข็ง โดยรอบ ถ่ายโอนโปรตีนที่กระแสไฟฟ้าคงที่ 150 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้นำแผ่น PVDF membrane มาแช่ใน TBS-T 5 นาที



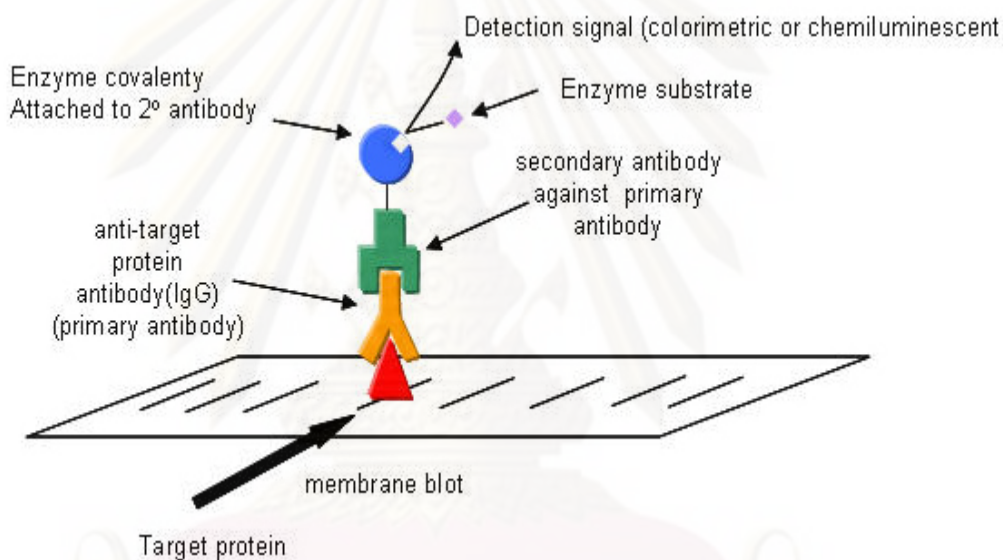
ภาพที่ 3.8 การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน [128]

3.5.5 การป้องกันการเกิด non-specific (Blocking)

หลังจากย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน โปรตีนจะจับอยู่กับเมมเบรน แต่ยังมีพื้นที่ว่างบนแผ่นเมมเบรนอยู่ ดังนั้นเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนตัวอื่น หรือแอนติบอดีกับแผ่นเมมเบรน จึงต้องทำการ blocking ด้วย blocking buffer คือ 5 เปอร์เซ็นต์ non-fat dry milk ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่นเมมเบรน ยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว สามารถทำโดยนำ PVDF membrane แช่ใน blocking buffer เขย่าเบา ๆ ด้วยเครื่องเขย่า (rotator) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนแผ่นเจลให้นำมาตรวจสอบว่า โปรตีนถูกถ่ายโอนมายังแผ่น PVDF membrane แล้วหรือไม่ ด้วยการย้อมสี coomassie blue เมื่อครบเวลา block ให้นำมาล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.5.6 การติดตามผล (Detection)

โดยวิธี two-step detection (ภาพที่ 3.9) ใช้ primary antibody เข้าไปจับโปรตีนที่มีความจำเพาะ โดยใช้อัตราส่วน 1:16000 สำหรับ anti-GAPDH และ 1:8000 สำหรับ anti-TGF- α บ่มไว้กับ PVDF membrane เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการจับอย่างสมบูรณ์ ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก โดยใช้ TBS-T ล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นใช้ secondary antibody คือ anti-rabbit HRP ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เข้าไปจับ primary antibody โดยใช้อัตราส่วน 1:16000 สำหรับจับ anti-GAPDH และ 1:10000 สำหรับจับ anti-TGF- α บ่มไว้กับ PVDF membrane เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการจับอย่างสมบูรณ์ ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก โดยใช้ TBS-T ล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



ภาพที่ 3.9 การติดตามผล โดยวิธี two-step detection [128]

3.5.7 การวิเคราะห์ผล (Analysis)

ใช้วิธี Chemiluminescent ในการวิเคราะห์ผล เป็นการติดตามการเรืองแสง โดยใช้ SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate เมื่อใส่ substrate ลงบนแผ่น PVDF membrane ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นจะติดตามการเรืองแสงโดยการประกบกับแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ หลังจากประกบฟิล์มแล้วให้ล้างฟิล์มโดยแช่ลงใน develop ที่เจือจางแล้ว 2 นาที ล้างฟิล์มในถาดล้าง 1 นาที แช่ฟิล์มลงใน Fixer ที่เจือจางแล้ว 3 นาที แล้วล้างฟิล์มในถาดล้าง 1 นาที ตากฟิล์มให้แห้ง

3.6 การตรวจวัดคุณสมบัติรีดิวซ์ของสารประกอบฟีนอล (reducing property) จากสารสกัดสมุนไพรไทย โดยวิธี Folin Ciocalteu Phenol assay (FCP) [129]

Folin Ciocalteu Phenol assay เป็นวิธีการตรวจสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถบิรจาคอิเล็กตรอน หรือรีดิวซ์สารประกอบอื่น ๆ สารประกอบฟีนอลจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง สามารถรีดิวซ์สารละลาย Folin Ciocalteu Phenol reagent ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนไปเป็นสารละลายที่มีสีน้ำเงิน ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอลในสิ่งตัวอย่าง การตรวจวิธีนี้ใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอล(Phenolic content) ในสิ่งตัวอย่าง แสดงค่าในหน่วยมิลลิกรัม โดยเทียบกับ Gallic acid ต่อน้ำหนักสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalent (GE) mg/g of dry weight)

ผสมสารละลาย ดังตารางที่ 3.6 ดังนี้ 1) blank 2) สารมาตรฐาน 3) สารสกัดสมุนไพร กับ 10 เปอร์เซ็นต์ Folin Ciocalteu Phenol reagent 500 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่มีด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่มีด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0.78125 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ตารางที่ 3.6 ขั้นตอนการเติมสารละลาย เพื่อตรวจปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยวิธี FCP assay

Reagents	Blank (µl)	Standard (µl)	Sample (µl)
1. สารสกัดสมุนไพร	-	-	500
2. สารละลาย Gallic acid	-	500	-
3. Deionized distilled water	500	-	-
4. Folin Ciocalteu Phenol reagent	500	500	500
เขย่า และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 นาที			
5. สารละลาย Na ₂ CO ₃	350	350	350
เขย่า และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs.) ที่ 750 nm เทียบกับ blank			

4. วิเคราะห์ผล

การทดสอบทั้งหมดจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า P -value น้อยกว่า หรือเท่ากับ 0.05 (ความมั่นใจ 95 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้โปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 17.0 (SPSS, สหรัฐอเมริกา) และแสดงผลเป็น รูป ตาราง และกราฟ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel เวอร์ชัน 2007 (Microsoft, สหรัฐอเมริกา)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการศึกษารวบรวมข้อมูลสมุนไพรไทย

เพียง บุรณธรรม (2539) ได้รวบรวมไว้ และจากการค้นคว้าจากแหล่งความรู้อื่น ๆ คณะผู้วิจัย พบว่า สมุนไพรทั้ง 11 ชนิดต่อไปนี้ มีศักยภาพอาจจะใช้ในการรักษาโรคสะกดเงิน ดังนั้น จึงเห็นสมควรนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการสำหรับโครงการวิจัยนี้

1. ขมิ้น [14]

ชื่อสามัญ

Turmeric, Curcuma

ชื่อวิทยาศาสตร์

Curcuma Longa Linn., *Curcuma domestica* Valetton.

ชื่อวงศ์

Zingiberaceae

ชื่อท้องถิ่น

ขมิ้นแกง ขมิ้นชัน ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขมิ้น ตายอ สะยอ หมิ้น



ภาพที่ 4.1 ขมิ้น

จาก วิสาข์ ทองระกาศ

สรรพคุณ

เหง้า

ใช้รักษาแผลในลำไส้ เจริญอาหาร ขับลม คลายกล้ามเนื้อเรียบในลำไส้ที่เกร็งตัว บรรเทาอาการวิงเวียน ไม่สบาย มีฤทธิ์ต้านวัณโรค รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน ดมแก้หวัด ฝั้นคั้นระงับอาการชัก ขับปัสสาวะ ลดไข้ ฆ่าเชื้อพยาธิ ป้องกันโรคหนองใน อาการฟกช้ำ รักษาแผลสด บรรเทาอาการท้องขึ้น ทำให้ผายลม รักษาไข้ผอมเหลือง ไข้ท้องมาน รักษาพิษ เสมหะ และโลหิต

ใช้เป็นยาขัดพื้น แก่หญิงที่ตกโลหิต รักษาโลหิตออกทางทวารหนัก และทวารเบา นอกจากนี้จะใช้เดี่ยว ๆ แล้ว ขมิ้นยังเป็นส่วนผสมของตำรับยาสมุนไพร รักษาโรคต่าง ๆ คือ เหง้า จะมีส่วนผสมของน้ำมันมะพร้าว ใช้เป็นยาสมานแผลสด และแผลถลอก หรือใช้ผสมกับยานวดเพื่อคลายเส้นยาคุมธาตุ รักษาเคล็ดขัดยอก รักษาชันนะตุในเด็ก บรรเทาอาการปวดฟัน เหงือกบวม และน้ำกัดเท้า ส่วนในเหง้าขมิ้นมีสารสีเหลืองเรียกว่า curcumin และ resin นอกจากนี้ยังมีน้ำมันระเหยประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย borneol, camphene, zingerene, 1,4-cineol, sabinene และ phellandrene สารที่อยู่ภายใน หัวขมิ้นเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการทดสอบกรดบอริกที่มีในผงชูรสปลอม

ใบ

ใช้ผสมกับยานวดเพื่อคลายเส้น ใช้ผสมทำเป็นยาอายุวัฒนะ รักษาเมะเร็งริดสีดวงทวาร ปวด มวน รักษาซาง ฝีดาษ ชัก อากาไรใช้ รักษาผมที่หงอก ผมร่วง ผมคัน รักษาอุบัติเหตุ ท้องอืด ท้องเฟ้อ รักษาแผลโรคผิวหนังผื่นคัน บำรุงผิว รักษาอาการท้องเดิน ปวดท้อง ธาตุพิการ อุจจาระเป็นมูกโลหิต ลดอาการบวม รักษาไข้ปวดหัวตัวร้อน สารพัดไข้ ปวดศีรษะ รักษากาฬ รักษาพิษสำแลง-ของแสลง รักษาฝี บิดตานทราง ถ่ายท้อง ท้องเดิน ท้องร่วง ลดการขับปัสสาวะ รักษาเมือกโลหิต โลหิตเน่า ขับน้ำคาวปลา รักษาตาลขโมย แมงเคียนกินรากผม เหา รังแค กษัย บำรุงโลหิต เจริญอาหาร ผสมกับยาต้มห้ามโลหิตจากทวารทั้ง 9 หรืออาเจียนเป็นโลหิต ผสมยารักษาโรคเกี่ยวกับกระเพาะอาหาร และลำไส้ ปวดเมื่อยตามร่างกาย บำรุงน้ำมัน เป็นฝ้า โรคหนองใน เบาขัด รักษาอาการลมวิงเวียน โรคปวดในข้อ โรคเหน็บชา คลื่นเหียนจุกเสียดและลมขึ้นสูง โรคประสาท ผสมยาทาฝี รักษาแผลเรื้อรังเน่าร้าย ขับปัสสาวะในสตรี รักษาอาการปวดบวมท้องขึ้นลงท้องอันเกิดจากโยธาตุกำเริบ

ตำรับยา

แก่งขมิ้น

ให้ตัดเอาแก่งขมิ้นขนาดพอควรนำมาล้างให้สะอาด ต้มให้ละเอียด คั้นเอาแต่น้ำเจือสุก นำมากินครั้งละประมาณ 2 ช้อนโต๊ะ วันละ 3 - 4 ครั้ง หรือเติมเกลือเล็กน้อยให้กินง่ายขึ้น ใช้รักษาอาการท้องร่วง บิด

ผงขมิ้น

ให้ใช้ผงขมิ้น 1 ช้อนโต๊ะ นำมาผสมกับน้ำมันมะพร้าว หรือน้ำมันหมู 2-3 ช้อนโต๊ะ เอามาเคี่ยวด้วยไฟอ่อน แล้วคนให้ทั่วจนเป็นสีเหลือง แล้วใช้น้ำมันที่ได้ใส่แผล หรือใช้พอกตามบริเวณที่เป็นแผล และรักษาอาการเคล็ด

หัวขมิ้น

ให้นำหัวขมิ้นมาขูดเอาเนื้อขมิ้นทาบริเวณที่ยุ่งกัด จะทำให้หายคัน และตุ่มยุบหายไป

การศึกษาในปัจจุบัน

สารสกัดที่ได้จากส่วน rhizome ซึ่งก็คือ ส่วนของราก เรียกว่า curcumin เป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลายโมเลกุล เช่น transcription factor (NF-kB, AP-1, Egr-1 และ β -catenin) เอนไซม์ (COX2, 5-LOX, iNOS และ hemeoxygenase-1) cell cycle protein (cyclin D1 และ p21) ไซโตไคน์ (TNF, IL-1, IL-6, และ chemokines) receptor (EGFR และ HER2) และ cell surface adhesion molecule [130] มีการทดลองพบว่า curcumin สามารถยับยั้ง proliferation และ mineralization ของเซลล์ osteoblastic ผ่านทางการแสดงออกของ p21^{WAF1/CIP1} ซึ่งมีผลไปยับยั้งการทำงานของ cyclin-dependent kinase และการ phosphorylation ของ histone H1 [131] การศึกษาใน human promyelocytic leukemia (HL-60) cell พบว่า curcumin ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ที่จะไปกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kB (NF-kB) โดยป้องกันการสลายของ inhibitory protein I κ B α และการ translocation ของ p65 [132] การทดลองใน human monocytic macrophage cell line และ Mono Mac 6 พบว่า ยับยั้งการทำงานของ TNF และ IL-1 ที่กระตุ้นการสร้าง lipopolysaccharide (LPS) [133] การศึกษาในหนู และหนูตะเภา พบว่า ช่วยทำให้แผลหายเร็วขึ้น [134] โดย curcumin จะทำให้เกิดการสร้างคอลลาเจน เพิ่ม fibroblast กระตุ้นการสร้าง transforming growth factor-beta ซึ่งมีผลต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ เกิดการสร้าง extracellular matrix ส่งผลให้ประสิทธิภาพของกระบวนการหายของแผลดีและเร็วยิ่งขึ้น [135] และ curcumin ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (0.2 – 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) เมื่อนำมาทดลองร่วมกับ UVA หรือ visible light พบว่า ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ [136]

มีรายงานว่า curcumin สามารถใช้รักษาโรคผิวหนังได้หลายชนิด เช่น scleroma, psoriasis และมะเร็งผิวหนัง ป้องกันการเกิด free radical อีกทั้งยังสามารถลดการอักเสบโดยการยับยั้งการทำงานของ nuclear factor-kB สามารถยับยั้งโรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmune

diseases) โดยผ่านทางไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α และ IFN- γ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของเซลล์ในระบบ ภูมิคุ้มกัน เช่น JAK-STAT, AP-1 และ NF-kB [137]



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ข่า [138]

ชื่อสามัญ	Galangal, Greater Galangal, Chinese Ginger
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Alpinia galanga</i> (Linn.) Swartz., <i>Languas galanga</i> (Linn.) Stuntz.
ชื่อวงศ์	Zingiberaceae
ชื่อท้องถิ่น	ข่า ข่าใหญ่ ข่าหลวง ข่าหยวก เสะเออเคย สะเซย



ภาพที่ 4.2 ข่า
จาก วิสารข์ ทองระกาศ

สรรพคุณ**เหง้าแก่**

นำมาตำให้ละเอียด ใช้ทาบริเวณที่เป็นโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน ใช้เป็นยารักษาภายนอก หรือจะตำใช้ทำกระสายเป็นเหล้าโรง ทารักษาอาการคันในโรคลมพิษ

เหง้าแก่สด หรือแห้ง

ใช้รักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด ให้ใช้ประมาณเท่าหัวแม่มือ ใช้สดประมาณ 5 กรัม และเหง้าแห้งประมาณ 2 กรัม นำมาทุบให้แตกแล้วต้มเอาน้ำดื่ม

เหง้าสด

ใช้รักษาเกลื้อน นำเหง้าสดมาฝนผสมกับเหล้าโรง หรือน้ำส้มสายชู หรือตำ แล้วนำมาแช่ แอลกอฮอล์ ใช้ทาบริเวณที่เป็น และในเหง้ายังมี galangol ซึ่งเป็นน้ำมันและเป็น acrid resin มี น้ำมันระเหยประมาณ 0.5 – 5 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย cadinene, cineol, pinene, eugenol, methyl cinnamate, sesquiterpene และ dioxyflavonol

3. ขิง [138]

ชื่อสามัญ	Ginger
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.
ชื่อวงศ์	Zingiberaceae
ชื่อท้องถิ่น	ขิงเผือก ขิงแดง ขิงแกลง สะเอ เกีย



ภาพที่ 4.3 ขิง

จาก วิสาข์ ทองระกาศ

สรรพคุณ**ต้น**

ขับผายลม บรรเทาอาการจุกเสียดแน่นเฟ้อ บำรุงไฟธาตุ รักษาเนื้องอก คอเปื่อย ช่วยย่อยอาหาร ฆ่าพยาธิ รักษาโรคตา บิด ลมป่วง ท้องร่วงอย่างแรง อาเจียน

ใบ

ใช้ใบสด แล้วคั้นเอาน้ำกิน 15 มิลลิลิตร มีรสเผ็ด บรรเทาอาการฟกช้ำจากการหกล้ม หรือกระทบกระแทก ช่วยย่อยอาหาร ขับผายลม รักษาโรคกำเดา นิ้ว คอเปื่อย เบาลัด ฆ่าพยาธิ และโรคตา

ผล

รักษาอาการไข้ นอกจากจะใช้เดี่ยว ๆ แล้วขิงยังใช้ผสมในยารักษาต่าง ๆ คือ รักษาเมะเร็ง กรามข้าง มะเร็งดอกบุก หนองใน ทำให้หญิงที่แต่งงานแล้ว แต่ไม่มีบุตรสามารถมีบุตรได้ เป็นยาบำรุงน้ำนม ยาอายุวัฒนะ บรรเทาอาการคอแห้ง เจ็บอก กระจายน้ำ ตามืด ตาฟาง ตาต้อกระจก วิงเวียนหัว โรคประสาทพิการ ปวดเอว

ราก

จะมีรสเผ็ด และขม ทำให้เนื้อแห้งสดชื่น ขับลม ทำให้เสียงไพเราะ ช่วยให้การขับถ่ายสะดวก ฆ่าพยาธิ เจริญอาหาร รักษาบิด นิว อากาโร

เหง้า

ใช้ทั้งเหง้าแก่ และเหง้าอ่อน ทำเป็นเครื่องเทศ เครื่องดื่ม กลบรส แต่งกลิ่น ทางยาใช้ขับลม รักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ คลื่นไส้ อาเจียน ไอ หอบ ขับปัสสาวะ บำรุงธาตุ รักษาบิด และรักษาพิษจากบัวเห่ (*Pinellia pedatisecta* Schott) และเทียนหน้าแซ (*Arisaema consanguineum* Schott) และปู ปลา นก รวมถึงเนื้อสัตว์อื่นเป็นพิษ

เปลือกเหง้าแห้ง

ใช้ประมาณ 1.5 – 5 กรัม ต้มน้ำกิน รสขม ขับปัสสาวะ ขับลม รักษาอาการท้องอืดแน่น อากาโรบวม น้ำ ใช้ภายนอก รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน และแผลมีหนอง

น้ำมันระเหย

ใช้ผสมเป็นน้ำเชื่อม รับประทานครั้งละ 10 – 15 มิลลิลิตร ในเหง้าจะมีน้ำมันระเหยประมาณ 0.25 – 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย camphene, cineol, pellandrene, linalool, zingiberene, borneol พวกที่ทำให้มีรสเผ็ด และร้อน ได้แก่ zingerone และ scogol มีเม็ดสีแป้ง และ resin

ข้อมูลทางเภสัชวิทยา และทางคลินิก

1. ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร มีฤทธิ์สามารถป้องกันอาการคลื่นไส้ อาเจียนได้ นอกจากนี้แล้วยังพบว่า เมื่อนำน้ำต้มที่สกัดจากเหง้า ความเข้มข้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ใส่ปากสุนัขที่ทำให้สลบแล้ว จะพบว่าที่หลอดอาหาร และกระเพาะอาหารในครั้งแรกมีผลทำให้ลดกรด และน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ระยะต่อมาจะออกฤทธิ์ช่วยกระตุ้นกรด และน้ำย่อยออกมากขึ้น แต่ถ้าให้สุนัขกินผงขิงแห้งประมาณ 0.1 – 1 กรัม จะมีสารเมือกในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้น และกรดเกลือก็จะออกมากขึ้น ทำให้การย่อยโปรตีนที่กระเพาะลดต่ำลง และจะมีเอสเทอร์ของไขมันเพิ่มขึ้น น้ำที่แช่สกัดได้จากเหง้าสามารถยับยั้งการทำให้สุนัขอาเจียน ด้วยอะโปมอร์ฟิน ส่วนกระต่ายนั้นให้กินน้ำขิงที่มี zingerone จะมีผลสามารถทำให้ลำไส้คลายตัว และมีการบีบตัวลดลง

2. ฤทธิ์ต่อระบบประสาท สารสกัดได้จากเหง้าขิงด้วยน้ำร้อน ความเข้มข้นประมาณ 0.15 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ต่อต้านอาการชัก ที่เกิดจากการให้ยา Metrazol แก่เซลล์ประสาทหอยทาก

(Snail neurons) นอกจากนี้ยังพบว่า มีฤทธิ์ในการทำเป็นยาเฉพาะที่ต่อระบบประสาท Sciatic nerve ของกบ การสกัดด้วยเมธานอลประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์สามารถลดอาการปวดในหนูถีบจักร

3. ฤทธิ์รักษาโรคมะเร็ง ใช้เหง้าสด เอามาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดเปลือกนอกให้แห้ง นำมาหั่นเป็นฝอย แล้วตำให้ละเอียด ใช้ห่อผ้าก๊อซทำเป็นก้อนเหลี่ยมเล็ก ๆ นำมาวางตามจุดแห่งเข็ม แล้วใช้พลาสติกปิดไว้ให้อยู่หนึ่ง ที่จุดแห่งเข็ม จากคนไข้ 40 ราย ก่อนวางมีอาการไข้ 4 – 6 ชั่วโมง หลังจากการวางยาแล้วประมาณ 8 ชั่วโมง ให้เอาห่อยาออก แล้วพอกยาอีก 2 ครั้ง ได้ผลช่วยระงับอาการไข้ได้ 36 ราย ได้ทำการตรวจโลหิตแล้วไม่พบเชื้อ แต่ไม่ได้ผลอีก 4 ราย

4. ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดที่ได้จากขิงนั้นไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (เชื้อหนอง) *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

5. ฤทธิ์การฆ่าพยาธิ พบว่า สามารถฆ่าพยาธิใบไม้ได้ และยังสามารถปวดท้องจากพยาธิตัวกลมในลำไส้ โดยใช้เหง้าขิงสดประมาณ 60 กรัม นำมาต้มคั้นเอาแต่น้ำมาผสมกับน้ำเชื่อมให้มีปริมาตรครบ 60 กรัม นำมาต้มคั้นเอาแต่น้ำมาผสมกับน้ำเชื่อมให้มีปริมาตรครบ 60 มิลลิลิตร หลังจากที่ได้กินยานี้แล้ว อาการปวดท้องจะลดลง และหายไปเอง หูดขาเจียน ส่วนอาการอืดอืดปวดมวนท้อง ตามปรกติแล้วหลังจากที่กินยานี้ประมาณ 1 – 3 วัน ก็จะหายไป ถ้าอาการจุกแน่นหายไปก็จะรับประทานยาขับพยาธิตัวกลมได้

6. ใช้ทำเป็นยาขัดฟัน โดยการนำมาผสม Magnesium silicate, Rock salt, Borax, สีสียด, ฟริกไทยดำ, Alum, เสงี่ยมหวาน, Pyrethrum, Mastic และยาสูบ จากการที่ได้ทดลองกับเด็กอายุประมาณ 10 ขวบ ที่มีอาการเหงือกบวม หินปูนจับ ฟันมีสี หรือฟันผุ มีผลปรากฏว่าฟันและเหงือกดีขึ้น ภายใน 1 เดือน และอาการดีขึ้นยังดีต่อไปเป็นเวลาประมาณ 12 ปี

7. ฤทธิ์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และโปรโตซัว นำน้ำที่แช่สกัดจากเหง้าขิงพบว่า มีฤทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (*Trichophyton violaceum*) และเชื้อโปรโตซัว (*Trichomonas*)

8. ฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง สารสกัดจากตัวทำละลายต่าง ๆ นำไปทดลองฆ่าเซลล์มะเร็งชนิด Ca-Ehrlich-Ascites พบว่า สารสกัดด้วยน้ำมันไม่ได้ผล แต่สารสกัดด้วยเมธานอลมีผลเล็กน้อย

การศึกษาในปัจจุบัน

สารสกัดจากขิงที่ชื่อว่า 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dodecenedione (I6) นำมาทดลองใน human leukemia cells พบว่า มีฤทธิ์ในการต่อต้านเนื้องอก (anti-tumor) นอกจากนี้เมื่อนำมาทดลองใน human promyelocytic leukemia พบว่า I6 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ โดยมีฤทธิ์ต่อ cell cycle ไปยับยั้งที่ G1 และทำให้เกิดการตายของเซลล์ [139]



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ชุมเห็ดเทศ [138]

ชื่อสามัญ	Candelabra bush, Ringworm bush
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.
ชื่อวงศ์	Leguminosae-Caesalpinioideae
ชื่อท้องถิ่น	ขี้คาก ชุมเห็ดใหญ่ ตะลี่ปอ ลับมีนหลวง หมากกะลิงเทศ



ภาพที่ 4.4 ชุมเห็ดเทศ

จาก <http://medicinal-thaiherbs.blogspot.com>

สรรพคุณ

ทั้งต้น

ใช้ขับพยาธิในลำไส้ ถ่ายพิษตานทราย รักษาซาง โรคผิวหนัง ถ่ายเสมหะ รักษาฟกบวม รักษาริดสีดวง ดีซ่าน และฝี

ต้น

ใช้เป็นยารักษาคุตทะราด กลากเกลื้อน รักษาภษัยเส้น ขับพยาธิ ขับปัสสาวะ รักษาท้องผูก และทำให้หัวใจปรกติ

ใบ

จะมีกลิ่นฉุน ต้มน้ำกินเป็นยาระบาย อมบัววนปาก ใช้เป็นยาฆ่าพยาธิตาม ผิวหนัง รักษา กลากเกลื้อน ผิวหนังอักเสบ เป็นผื่นคัน เส้นประสาทอักเสบ รักษาภษัยเส้น ขับปัสสาวะ และรักษากระเพาะอาหารอักเสบ

ดอก

ใช้ 1 ช่อ ต้มน้ำกินเป็นยาระบาย ทำให้ผิวหนังดี มีสีมีเ

ฝัก

ใช้ผสมกับยารักษากลาก และเป็นยาขับพยาธิ

เมล็ด

ใช้รักษาอาการท้องผูก รักษาโรคผิวหนัง ขับพยาธิ

ราก

ใช้ผสมยาบำรุงธาตุ บำรุงธาตุ บำรุงธาตุ บำรุงธาตุ ใช้ต้มกินเป็นยารักษาตมูกเลือด ทำให้เจริญอาหาร มีคุณสมบัติเป็นยารักษาหิด และสิ่ว โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน ฆ่าพยาธิตามผิวหนัง เป็นยาระบายท้อง รักษาท้องผูก ถ่ายเสมหะ รักษาหูด และขับปัสสาวะ ทำให้หัวใจเป็นปกติ

ข้อมูลทางคลินิก และทางเภสัชวิทยา

1. สารสกัดจากใบ และฝักจะมี anthraquinone glycosides ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้ถ่าย และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรค
2. สารสกัดจากใบ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (sarcoma) ในหนูเล็ก โดยการฉีดเข้าที่ขา
3. สารสกัดจากใบ มีฤทธิ์ใช้กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบในลำไส้ หลอดลม หลอดเลือด กระเพาะอาหาร กระเพาะปัสสาวะ และมดลูก ทำให้มีการบีบตัวแรงขึ้น แต่ทำให้หลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจขยายตัว
4. สารสกัด glycoside จากใบ มีฤทธิ์ใช้กระตุ้นกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้การหดตัวแรงขึ้น แต่ไม่เปลี่ยนอัตราการเต้น ถ้าหัวใจเต้นช้ามาก ๆ จะเกิดอาการหัวใจหยุดเต้นในท่าบีบตัว (Systotic Arrest)
5. มีฤทธิ์ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารเล็กน้อย
6. ไม่มีฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อลาย
7. กดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง
8. ใช้กระตุ้นการหลั่งปัสสาวะ
9. สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถทำให้เกิดโรคในพืชคือ *Agrobacterium tumefaciens*
10. น้ำมันที่สกัดจากใบมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

11. สารสกัดของใบด้วยแอลกอฮอล์ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* และ *Staphylococcus aureus*

12. สารสกัดจากน้ำของใบชุมเห็ดเทศ จะมีความเข้มข้นประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถฆ่าเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกลาก



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ทองพันชั่ง [138]

ชื่อสามัญ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz

ชื่อวงศ์ Acanthaceae

ชื่อท้องถิ่น ทองคันชั่ง หญ้ามันไก่ ทองพันดูลย์



ภาพที่ 4.5 ทองพันชั่ง

จาก <http://www.skn.ac.th>

สรรพคุณ

ใบ

ใช้ใบสด หรือคั่วให้แห้ง นำมาชงในน้ำใช้ดื่ม เป็นยาช่วยขับปัสสาวะ หรือใช้เป็นยาระบายได้

ใบและราก

มีสารออกซีเมทิลแอนทราควิโนน (oxymethylantraquinone) เมื่อนำเอาใบประมาณ 5 – 8 ใบ และรากสดประมาณ 2 – 3 ราก นำมาตำให้ละเอียดแล้วคั้นเอาน้ำออก จากนั้นก็นำมาแช่ด้วยแอลกอฮอล์ หรือในสุรา แล้วใช้ทารักษาโรคผิวหนังกลากเกลื้อน หรือผื่นคัน

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. น้อยหน่า [138]

ชื่อสามัญ	Custard apple, Sugar apple, Sweet sop
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Annona squamosa</i> L.
ชื่อวงศ์	Annonaceae
ชื่อท้องถิ่น	หมักเขียบ ลาหนั่ง มะนอแน่น มะแน่น มะอจ้ำ มะโใจจ่า เตียบ



ภาพที่ 4.6 น้อยหน่า

จาก <http://www.skn.ac.th>**สรรพคุณ****ผล**

นำมาใช้ได้ 2 อย่างคือ ถ้าเป็นผลดิบจะเป็นยาแก้พิษงู แก้ฝีในคอ กลากเกลื่อน ฆ่าพยาธิ ผิวหนัง และผลแห้งแก้งูสวัด เริม แก้ฝีในหู ส่วนเปลือกนำมาใช้แก้พิษงูได้เช่นกัน

เมล็ด

เป็นยาฆ่าพยาธิตัวจิ๋ว ฆ่าเหา และแก้บวม

ราก

เป็นยาระบาย ทำให้อาเจียน แก้พิษงู ถอนพิษ เบื่อเมา

ใบ

แก้ขับพยาธิไส้ ฆ่าเหา แก้หิด แก้กลากเกลื้อน และแก้ฟกบวม

7. บัวบก [138]

ชื่อสามัญ	Asiatic pennywort
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.
ชื่อวงศ์	Umbelliferae
ชื่อท้องถิ่น	ผักหนอก ผักแว่น บัวบก จำปาเครือ กะบังนอก เตี้ยกำเช่า ฮักคัก ปะหนะ เอซาเด๊ะ



ภาพที่ 4.7 บัวบก

จาก <http://ampanthawong.tripod.com>

สรรพคุณ

ทั้งต้น

ใช้รักษาอาการช้ำใน เป็นยาบำรุงหัวใจ และบำรุงกำลัง รักษาอาการอ่อนเพลีย เมื่อยล้า ขับปัสสาวะ เป็นยาขับโลหิตเสีย รักษาโรคผิวหนัง ใช้รักษาบาดแผล รักษาอุบัติเหตุ ระวังรักษาพิษเนื่องจากถูกงูกัด และรักษาอาการเริ่มเป็นบิด ทำให้โลหิตแผ่ซ่าน รักษาอาการท้องร่วง นอกจากนี้ยังใช้ผสมในตำรับยาร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ เป็นยารักษาอาการร้อนในกระหายน้ำ รักษาเด็กที่เป็นซาง ตัวร้อน ผอมแห้ง รักษาโรคปากเปื่อย ปากเหม็น เจ็บคอ น้ำลายไหล

ข้อมูลทางคลินิก และทางเภสัชวิทยา

1. มีฤทธิ์ในการลดอาการอักเสบ โดยการนำเอาใบบัวบกที่อยู่เหนือดินมากิน จะสามารถลดอาการอักเสบได้
2. มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้ น้ำคั้นสด ๆ ของบัวบก จะมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้สารที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ผสมน้ำ ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด CA-9KB ได้ผล

3. มีฤทธิ์ในการสมานแผล โดยการนำเอาสารที่สกัดของบัวบกที่เรียกว่า madecassol และสารที่สกัดได้จากบัวบกคือ madecassic acid, asiatic acid และ asiaticoside ซึ่งเป็นสารเคมีพวกไตรเทอร์พีน (triterpene) ไปใช้สำหรับทาภายนอก เพื่อรักษาแผลในหนูขาวพบว่าสามารถทำให้แผลนั้นหายเร็ว

4. มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา เนื่องจากบัวบกเป็นยารักษาโรคผิวหนัง จึงได้นำไปทดลองกับเชื้อกลาก (*Trichophytum mentagrophytes* และ *Trichophytum tubrum*) พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อกลากได้ดี

5. มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยการนำเอาสารสกัดจากบัวบกทั้งต้นด้วยน้ำร้อนกับเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดหนองคือ *Staphylococcus aureus* พบว่า ได้ผลดี และยังมีผู้เอาอนุพันธ์ของ asiaticoside ที่ได้จากบัวบกคือ oxyasiaticoside นำไปทดลองกับเชื้อวัณโรค พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคได้ และนำไปทดลองกับหนูตะเภา ซึ่งทำให้เป็นวัณโรคก่อน แล้วฉีดสารละลาย asiaticoside พบว่า สามารถลดปริมาณแผลที่เกิดจากเชื้อวัณโรคในตับ ปอด ปมประสาท และม้ามได้

6. มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง โดยการนำเอาสารที่สกัดชนิดต่าง ๆ ของใบบัวบก นำไปทดลองจะมีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงพบว่า สารที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์สามารถฆ่าตัวอ่อนของแมลง *Pieris rapae cruciflora* ส่วนสารสกัดได้จากบัวบกด้วยน้ำร้อนฆ่าแมลงสาบอเมริกันได้ แต่ไม่สามารถฆ่าแมลงสาบเยอรมันได้

7. มีฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ เมื่อฉีดสารสกัดจากใบบัวบกเข้าใต้ผิวหนังของหนูถีบจักรตัวละ 0.2 ซี.ซี. จะมีผลในการยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อน เมื่อให้น้ำคั้นจากบัวบกทั้งต้นพบว่า ได้ผลคุมกำเนิดในหนูถีบจักรได้ ส่วนสารซาโปนินที่ได้จากบัวบก นำไปทดลองกับเชื้ออสุจิพบว่า ไม่มีผลต่อเชื้ออสุจิ

8. มีฤทธิ์ในการลดอาการแพ้ สารที่สกัดจากใบบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ผสมน้ำ 1:1 จะสามารถต้านอาการแพ้ได้ผล

9. มีฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อเรียบ สารที่สกัดได้จากใบบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ผสมน้ำ 1:1 จะสามารถลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบบริเวณลำไส้ของหนูตะเภาได้ ส่วนสารที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จะสามารถทำให้กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้กระต่ายตอนบนคลายตัว ลดการเกร็งของกล้ามเนื้อมดลูกในหนูขาวซึ่งไม่ได้ตั้งครรรภ์

10. มีฤทธิ์ลดความดันเลือด สารที่สกัดได้จากใบบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ผสมกับน้ำ 1:1 ช่วยลดความดันเลือดในหนูขาว เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำจะไม่มีผลลดความดันโลหิตในสุนัข แต่ถ้าฉีดสารที่สกัดนี้เข้าไปในหลอดเลือดดำสุนัขในขนาดประมาณ 50 มก./กก. จะได้ผลลดความดันเลือด

11. มีฤทธิ์ต่อระบบประสาท โดยฉีดสารที่สกัดได้จากบวบกดด้วยแอลกอฮอล์เข้าไปในช่องท้องของหนูขาวพบว่า มีฤทธิ์ในการเป็นยาระงับประสาท และ Ramaswamy พบว่า มีฤทธิ์เช่นเดียวกันในหนูถีบจักร ส่วนการฉีดเข้าหลอดเลือดดำในสุนัขโดยตรงพบว่า ไม่มีฤทธิ์เป็นยาระงับประสาท แต่เมื่อฉีดสารสกัดนี้เข้าในช่องท้องหนูขาว จะมีฤทธิ์ในการกดประสาท ส่วนการใช้สารสกัดด้วยน้ำ และแอลกอฮอล์ 1:1 จะไม่ได้ผลทั้งกระตุ้น หรือกดประสาท หรือฤทธิ์ในการรักษาอาการปวด เพราะอาจมีสิ่งปนปลอมในสารที่สกัดมา เมื่อฉีดสารสกัดอัลคาลอยด์แก่หนูขาวทางช่องท้องนั้น จะไปเสริมฤทธิ์ยานอนหลับประเภทบาร์บิทูเรท (barbiturate) และช่วยต้านฤทธิ์ยากระตุ้นประสาทชนิดแอมเฟตามีน (amphetamine) โดยมีผลเท่า ๆ กับยาคลอโปมาซีน (chlorpromazine) ส่วนในประเทศไนจีเรีย ได้มีผู้ทำการทดลองฉีดสารสกัดบวบกดด้วยแอลกอฮอล์เข้าทางช่องท้องหนูถีบจักร แต่ไม่สามารถต่อต้านโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease)

12. มีฤทธิ์ช่วยลดไข้ เมื่อฉีดสารที่สกัดได้จากบวบกดด้วยแอลกอฮอล์เข้าทางช่องท้องหนูขาว จะสามารถลดไข้ได้ประมาณ 1.2 องศาฟาเรนไฮต์ และเมื่อฉีดสารสกัดด้วยน้ำ และแอลกอฮอล์เข้าทางช่องท้องหนูถีบจักรจะไม่ได้ผลเลย

13. มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต้านทาน เมื่อให้ผงใบ และต้นบวบ ในรูปยาแขวนตะกอน (suspension) แก่หนูถีบจักรเพศเมียจะได้ผลดี แต่ถ้าใช้สารสกัดด้วยเมธานอลจะไม่ได้ผลเลย และนอกจากนี้ยังมีผู้พบฤทธิ์อื่น ๆ คือ มีฤทธิ์ช่วยลดน้ำตาลในเลือดหนูขาว เมื่อให้กินสารสกัดแอลกอฮอล์ และน้ำ จะมีฤทธิ์ต่อหัวใจ

14. มีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร โดยใช้สารที่สกัดได้จากผลแห้ง ให้คนไข้ทั้งชาย และหญิงรับประทาน และฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เมื่อส่องกล้องดูแผลพบว่า แผลนั้นหายเป็นปกติ ซึ่งฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารนี้ ได้รับการสนับสนุนโดยงานของ Cho นอกจากนี้ยังพบว่า ใช้ได้ผลดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับยาลดกรด และยา cimetadine ซึ่งเป็นยาลดการหลั่งกรด

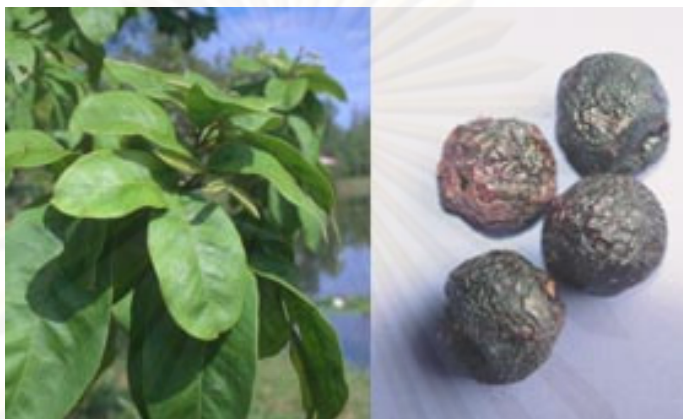
การศึกษาในปัจจุบัน

การศึกษาสารสกัดจากบวบกดใน SVK-14 keratinocytes พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต จึงเชื่อว่าสารสกัดที่ได้จากบวบกดสามารถนำมาต้านโรคสะเก็ดเงินได้ [140]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. มะคำดีควาย [138]

ชื่อสามัญ	Soap nut tree
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Sapindus rarak</i> DC.
ชื่อวงศ์	Sapindaceae
ชื่อท้องถิ่น	มะซัก ส้มป่อยเทศ ชะแซ ชะเหล่เด มะคำดีควาย



ภาพที่ 4.8 มะคำดีควาย

จาก <http://www3.easywebtime.com>**สรรพคุณ****เปลือกลำต้น**

นำมาต้มเอาน้ำกินเป็นยาแก้พิษไข้ แก้พิษร้อน แก้ฝีอักเสบ แก้ฝีหัวคว่ำ และเป็นยาแก้
กษัย

ใบ

นำมาปรุงใช้เป็นยาแก้พิษกาฬ แก้ทวารสา

ผล

ใช้ผลที่แห้งนำมาคั่วให้เกรียม จากนั้นใช้ปรุงเป็นยาดับพิษได้ทุกชนิด แก้กาฬภายใน แก้
ไข้ แก้หืด หอบ แก้โรคผิวหนัง และแก้เสลดสุ่มฝีที่เปื่อยพัง

เมล็ด

ใช้เมล็ดสด หรือแห้ง นำมาตำให้ละเอียด ใช้พอก หรือเอามาละลายน้ำล้างแผล และแก้
โรคผิวหนัง

ข้อมูลทางเภสัชวิทยา

จากการทดสอบความเป็นพิษ โดยการใช้สารที่สกัดจากผลด้วยแอลกอฮอล์ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขนาด 10 กรัมต่อกิโลกรัม โดยการทดลองฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ในขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายครั้งหนึ่งคือ 2.0 กรัมต่อกิโลกรัม ปรากฏว่าไม่พบอาการพิษ (ขนาดที่ใช้เท่ากับ 2083 เท่าของปริมาณยาที่ใช้ในตำรับยา)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ทับทิม [138]

ชื่อสามัญ Punic Apple, Pomegranate, Granades, Granats, Carthaginian Apple

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Punica granatum* L. var. *granatum*

ชื่อวงศ์ Punicaceae

ชื่อท้องถิ่น มะเกี๊ยะ มะก่องแก้ว พิลาขาว หมากจ้ง พิลา เจียะลื้อ



ภาพที่ 4.9 ทับทิม

จาก <http://student.nu.ac.th>

สรรพคุณ

เปลือกลำต้น

ในเปลือกของลำต้นจะมีอัลคาลอยด์ประมาณ 0.35 – 0.6 เปอร์เซ็นต์ และอัลคาลอยด์ในเปลือกของลำต้นนี้มีชื่อเรียกว่า Pelletierine และ Isopelletierine ซึ่งใช้เป็นยาถ่ายพยาธิได้ผลดี

ใบ

ใช้ใบสดนำมาต้ม กรองเอาน้ำใช้ล้างแผล เนื่องจากมีหนองเรื้อรังบนหัว หรือใช้ใบสดนำมาตำให้ละเอียด แล้วเอาไปพอกใบบริเวณที่เป็นแผลถลอก เนื่องจากหากล้ม

ดอก

ใช้ดอกที่แห้งประมาณ 3 – 6 กรัม นำมาต้ม กรองเอาน้ำดื่ม เป็นยาแก้ให้เลือดกำเดาแห้งตัว และแก้หูชั้นในอักเสบ หรือใช้ดอกแห้งนำมาบดให้ละเอียดแล้วใช้ทา หรือโรยบริเวณบาดแผลที่มีเลือดออก

เปลือกผล

ใช้เปลือกผลที่แห้งแล้วประมาณ 2.5 - 4.5 กรัม นำมาบดให้ละเอียด หรือนำมาต้มน้ำกิน ใช้เป็นยาแก้โรคท้องเสีย โรคบิดเรื้อรัง ถ่ายเป็นมูกเลือด ถ่ายพยาธิ ตกขาว ดากออก แผลหิด และกลากเกลื้อน

เมล็ด

ใช้เมล็ดที่แห้งแล้วประมาณ 6 - 9 กรัม นำมาบดให้ละเอียด หรือทำเป็นยาก้อนกิน เป็นยาแก้โรคปวด จุกแน่น เนื่องจากโรคกระเพาะอาหาร บำรุงกระเพาะอาหาร ทำให้เจริญอาหาร และแก้ท้องร่วง

เปลือกกราก

ใช้เปลือกกรากที่แห้งแล้วประมาณ 6 - 12 กรัม นำมาต้มน้ำกิน เป็นยาแก้ระดูขาว ตกเลือด ถ่ายพยาธิ หนองสิ้นลำไส้ แก้ท้องเสีย และโรคบิดเรื้อรัง

ข้อมูลทางคลินิก

1. บิดอะมีบา จากการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคบิดอะมีบาจำนวน 40 คน โดยใช้เปลือกผล เข้มข้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ใช้ต้มน้ำกินทุก ๆ หลังอาหารในปริมาณครั้งละ 20 มิลลิลิตร (ในช่วงที่กินยา ผู้ป่วยอาจมีอาการหุ้้อ หรืออึดอัดกังวลใจบ้าง แต่ต่อมาอาการก็จะหายเอง) ผลปรากฏว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

2. ถ่ายพยาธิตัวตืด จากการทดลองกับคนไข้ 9 คน โดยการใช้เปลือกกรากแห้ง หลังจากชูดฝอยนออกแล้วประมาณ 25 กรัม นำไปดอง หรือแช่น้ำ (300 มิลลิลิตร) นานประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นก็นำมาต้ม ตั้งไฟอ่อน ๆ จนให้น้ำเหลือประมาณ 100 มิลลิลิตร ใช้ดื่มก่อนที่จะรับประทานอาหารเช้า จากนั้นอีก 4 ชั่วโมง ก็ให้กินดีเกลือประมาณ 20 - 25 กรัม พยาธิตัวตืดจะออกมา จากการทดสอบปรากฏว่ามีผู้ป่วย 5 คน ที่เป็นพยาธิจากหมู 4 คน เป็นพยาธิจากวัว และอีก 1 คน ไม่ปรากฏผลอะไรเลย

3. แก้โรคบิดแบคทีเรีย จากการทดสอบกับผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จำนวน 50 คน โดยการใช้เปลือกผลที่แห้งแล้วต้มน้ำให้มีความเข้มข้น 50 - 60 เปอร์เซ็นต์ ให้ผู้ป่วยกิน 3 - 4 ครั้งต่อวัน ในปริมาณครั้งละ 10 - 20 มิลลิลิตร ผลปรากฏว่ามีผู้ป่วยจำนวน 49 คน มีอาการดีขึ้น อีก 1 คน มีอาการดีขึ้นภายหลัง

4. อาการอักเสบจากการติดเชื้อ จากการทดสอบคนป่วยที่เป็นไส้ติ่งอักเสบ ลำไส้อักเสบ ท่อน้ำดีอักเสบ ผิวน้ำเป็นแผลติดเชื้อ ต่อมมน้ำเหลืองอักเสบ และหลอดลมอักเสบจำนวน 415 คน

โดยการรับประทานเปลือกผลต้มให้เดือด กรองน้ำนำไปประเหยแห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียดเป็นผง นำมาใส่แคปซูลขนาด 250 มิลลิกรัม กินครั้งละ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 – 2 แคปซูล ผลปรากฏว่าผู้ป่วยมีอาการหายขาดเลย 305 คน อาการดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด 57 คน อาการดีขึ้น 36 คน และอีก 17 คน ไม่ได้ผลเลย

ข้อมูลทางเภสัชวิทยา

1. สารที่ได้จากการสกัดเปลือกกราก เปลือกผล และผล ด้วยแอลกอฮอล์ จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่าง ๆ หลายประเภท เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *S. schottmuelleri*, *Shigella paradysenteriae* B.H., *S. Montevideo*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *S. paradysenteriae* III-Z เปลือกผลที่มีได้จากการสกัดในความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีฤทธิ์ช่วยในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* Went. และ *Piricularia oryzae* Cav. น้ำที่สกัด หรือคั้นจากราก และใบ มีฤทธิ์ช่วยในการยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* และมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อไวรัสในยาสูบ

2. สารละลาย pelletierine hydrochloride ในน้ำในอัตราส่วน 1:10,000 มีฤทธิ์สามารถฆ่าพยาธิเส้นด้ายได้ดี ภายใน 5 – 10 นาที แต่ถ้าใช้ในอัตราส่วน 1:50,000 มีผลเพียงทำให้พยาธิระคายเคืองเท่านั้น แต่สำหรับในปัจจุบันได้ค้นพบว่า ตัวที่มีฤทธิ์ในการทำลายพยาธิที่จริง และได้ผลดีคือ isopelletierine ส่วนตัว pelletierine บริสุทธิ์ มีฤทธิ์ในการทำลายพยาธิได้เหมือนกัน แต่จะได้ผลดีต้องอยู่ในรูปอัลคาลอยด์แทนเนท เพราะอัลคาลอยด์แทนเนทไม่ถูกดูดซึม และละลายน้ำได้ยาก

3. จากการทดลองให้หนูตะเภา หรือหนูใหญ่ตัวเมียกินผงที่ละเอียดแล้วของเปลือกผล ปรากฏว่าผลของการตั้งท้องน้อยกว่าพวกที่ไม่ได้กิน ทดลองกับกระต่ายจากการใช้เปลือกกรากสกัดเอาน้ำ ทำให้เลือดของกระต่ายแข็งตัวได้เร็วขึ้นกว่าปรกติ

10. พลุคว [138]

ชื่อสามัญ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Houttuynia cordata* Thunb.

ชื่อวงศ์ Saururaceae

ชื่อท้องถิ่น ผักคาวทอง ผักคาวปลา พลุคว ผักก้านตอง ชื่อขอเช่า



ภาพที่ 4.10 พลุคว

จาก <http://www.igetweb.com>

สรรพคุณ

ทั้งต้น

มีรสเย็น และขุ่น ใช้เป็นยาแก้โรคบิด โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ขับปัสสาวะ แก้วบวม น้ำ แก้ไอ หลอดลมอักเสบ ปอดอักเสบ ฝีบวมอักเสบ ริดสีดวงทวาร หูชั้นกลางอักเสบ โดยการใช้น้ำ ต้มแห้ง หรือต้มนสดก็ได้ ใช้ปริมาณต่างกัน ถ้าเป็นต้มนสดให้ใช้ 30 – 60 กรัม นำมาตำคั้นเอาน้ำทาน รักษาภายนอกให้ตำพอก หรือต้มน้ำชะล้าง แต่ถ้าเป็นต้มนแห้งใช้ 15 – 30 กรัม ก่อนต้มให้แช่น้ำทิ้งไว้สัก 1 – 3 นาที ต้มให้เดือนประมาณ 5 นาทีก็ใช้ได้ แต่ถ้าเอาไปผสมกับยาอื่นให้ต้มยาชนิดอื่นให้เดือดก่อน

ข้อมูลทางคลินิก

1. ไอบกรน ใช้สารที่กลั่นได้จากต้นสด นำมาฉีดเข้าจุดแทงเข็ม จุดละ 0.5 มิลลิลิตร ฉีดติดต่อกัน 5 วัน วันละ 1 ครั้ง ซึ่งจะเป็น 1 รอบของการรักษา และทิ้งไว้ 1 วัน รักษาเป็นรอบที่ 2 ต่อไป จากคนไข้ 52 ราย ได้ผล 32 ราย อาการดีขึ้น 18 ราย ไม่ได้ผล 2 ราย ใช้เวลารักษา 1 – 2 รอบ

2. รักษาโดยใช้ยาฉีดเข้าที่จุดแทงเข็ม ซึ่งจะใช้ครั้งละ 2 มิลลิลิตรต่อวัน หรืออาจจะฉีดวันเว้นไว้ก็ได้ โดยการแบ่งฉีด 2 – 3 จุดสลับกัน ติดต่อกันนาน 2 สัปดาห์ จะเท่ากับ 1 รอบ แต่จะใช้การแทงเข็มรักษาพร้อมด้วย จากการรักษาคนไข้ 116 ราย ได้ผลโดยเฉลี่ยและประมาณ 97.4 เปอร์เซ็นต์

3. ปอดอักเสบ เป็นยาฉีดใช้ความเข้มข้น 1:1 ฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อวันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 มิลลิกรัม เป็นเวลา 7 – 10 วัน จะเท่ากับ 1 รอบ จากคนไข้ 12 ราย หาย 9 ราย หรือใช้ต้นสด 30 กรัม กับรากแห้ง 15 กรัม ต้มให้เดือด ใส่น้ำ 200 มิลลิกรัม กินครั้งละ 30 มิลลิกรัม วันละ 3 – 4 ครั้ง จากการตรวจด้วยรังสีเอกซ์ในคนไข้ 28 ราย หายขาด 26 ราย หลังจากกินยา 5 – 22 วัน จุดดำที่ปอดจะเล็กลง จำนวนเม็ดเลือดขาวกลับสู่ในระดับปกติ โดยเฉลี่ย 3.9 วัน

4. ผิวหนังเป็นแผลมีหนอง แผลงูสวัด และแผลติดเชื้อ ใช้ต้นสด 500 กรัม ใส่น้ำ 1.5 ลิตร กลับให้เหลือน้ำเพียง 1 ลิตร ใช้ทาตรงบริเวณที่เป็น จากคนไข้ 50 ราย หาย 48 ราย ไม่ได้ผล 2 ราย แต่บางรายต้องกินน้ำสกัดที่กลั่นได้ครั้งละ 10 – 20 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง

ข้อมูลทางเภสัชวิทยา

1. มีฤทธิ์ระงับปวด เร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ ห้ามเลือด รักษาปริมาณของเหลวในร่างกาย น้ำที่ได้จากการต้มนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูเล็ก จะมีผลระงับอาการไอ แต่ไม่มีฤทธิ์ขับเสมหะ

2. ฤทธิ์ขับปัสสาวะ ซึ่งเกิดจากกรดอินทรีย์ หรือปริมาณโปแตสเซียมในต้น ได้มาโดยน้ำคั้นจากต้นสด กรอกใส่ไตคางคก และหลอดเลือดที่ไตของกบ จะมีผลโดยการขยายหลอดเลือดฝอย ทำให้การไหลเวียนของเลือด และน้ำปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น

3. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค สาร decanoyl acetaldehyde ซึ่งจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Hemophilus influenzae*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus* แต่จะมีผลยับยั้ง *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhosa* ได้น้อยมาก และได้ทดลองให้หนูเล็กที่เป็นโรคมะเร็ง มีผลทำให้หนูเล็กตายช้ากว่าพวกที่ไม่ได้กินผักคาวตอง

สารเคมีที่พบ

ราก

มีน้ำมันระเหยเช่นกันคือ พวก decanoyl acetaldehyde

ใบ ดอก ผล

มีสารพวก flavones ซึ่งประกอบด้วย hyperin, reynoutrin, quercetin, isoquercitrin, quercetin

ต้น

ในญี่ปุ่นจะมีน้ำมันระเหย 0.0049 เปอร์เซนต์ ซึ่งประกอบไปด้วยสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ decanoyl acetaldehyde และนอกจากนี้ยังมีสารพวก capric acid, capric aldehyde, lauric aldehyde, myrcene, methyl-n-nonylketone แต่ปลูกในจีนมีน้ำมันระเหยที่ประกอบด้วย decanoyl acetaldehyde, bornyl acetate d-limonene, myrcene, camphene, α -pinene, carylphyllene, 2- undecanone, dedecanaldehyde และสารพวกโปรแตสเซียมคลอไรด์ โปรแตสเซียมซัลเฟต และ cordarine

การศึกษาในปัจจุบัน

การศึกษาศาสตร์สกัดจากผักคาวทอง (HcFs) พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ IL-4 และ IL-5 ใน Jurkat T cells, human mast cell line และ HMC-1 นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ใน Jurkat T cells [141]

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. เสลดพังพอนตัวเมีย

ชื่อสามัญ	-
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Clinacanthus nutans</i> (Burm.f.) Lindau
ชื่อวงศ์	Acanthaceae
ชื่อท้องถิ่น	พญาปล้องทอง เสลดพังพอนตัวเมีย



ภาพที่ 4.11 เสลดพังพอนตัวเมีย

จาก <http://www.krungshing.com>

ข้อมูลทางคลินิก

1.ฤทธิ์ลดการอักเสบ สารสกัดเอ็นบีวทานอลจากใบ เมื่อให้หนูขาวกิน [142, 143] สารสกัดน้ำจากใบ เมื่อให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง [144] จะลดการอักเสบของข้อเท้าหนูขาว ที่เกิดจากฉีดสาร carrageenan [142-144] สารสกัดเอ็นบีวทานอลขนาด 270 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะลดอาการบวมได้พอ ๆ กับแอสไพรินขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [143] cold cream ที่มีพญาปล้องทอง 5 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดน้ำของพญาปล้องทอง 5 เปอร์เซ็นต์ ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดเอทานอลจากใบในน้ำ ทาเฉพาะที่ให้หนูขาว สามารถลดการอักเสบเรื้อรังในหนูขาว [145] แต่ถ้าทาสารสกัดเอ็นบีวทานอลที่ผิวหนังจะไม่สามารถลดการอักเสบแบบเรื้อรังได้ [143] สารสกัดเอทานอลจากใบขนาด 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยไปยับยั้ง interleukin-1- β แต่ไม่มีผลต่อ interleukin-6 และ tumor necrosing factor- α [146, 147] สารสกัดเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ จากใบ ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase และ lipoxxygenase แต่สารสกัดน้ำไม่มีผล นอกจากนี้ สารสกัดเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ขนาด 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังยับยั้งการหลั่ง myeloperoxidase ด้วย [144]

2. รักษาสุขภาพ ผู้ป่วยโรคหลอดเลือด จำนวน 51 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ให้ได้รับการรักษาด้วยยาจากสารสกัดใบพญาปล้องทอง เปรียบเทียบกับยาหลอก ผู้ป่วยทุกรายมาพบแพทย์ภายใน 48

ชั่วโมง หลังจากมีอาการ โดยให้ทายาวันละ 5 ครั้ง เป็นเวลา 7-14 วัน จนกว่าแผลจะหาย พบว่าผู้ป่วยที่รักษาด้วยสารสกัดใบพญาปล้องทองแผลจะตกสะเก็ดภายใน 3 วัน และหายภายใน 7-10 วัน มีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับความเจ็บปวดลดลงเร็วกว่ากลุ่มยาหลอก และไม่พบผลข้างเคียงใดๆ



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการสกัดสมุนไพร โดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration)

ทำการสกัดสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แรงเฉย 120 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) พบว่า ตัวทำละลายเอทานอลสามารถสกัดสารออกจากสมุนไพรได้มากกว่าตัวทำละลายเฮกเซน (ตารางที่ 4.1)

4.3 ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดสมุนไพรไทย

ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดสมุนไพรไทยด้วยวิธี Folin Ciocalteu Phenol assay พบว่า สารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเอทานอลทุกชนิดมีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบ โดยมีปริมาณตั้งแต่ 0.35 ± 0.06 ถึง 27.57 ± 0.15 มิลลิกรัมของแกลลิก แอซิดต่อน้ำหนักแห้งเป็นกรัมของสารสกัดสมุนไพร (mg GAE/g sample) สารสกัดจากชุมเห็ดเทศพบปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุดคือ มีค่าเท่ากับ 27.57 ± 0.15 mg GAE/g sample รองลงมาคือ สารสกัดจากทองพันชั่งพบ 10.04 ± 1.12 mg GAE/g sample ส่วนสารสกัดจากประคำดีควายพบปริมาณสารประกอบฟีนอลล้น้อยที่สุดคือ มีค่าเท่ากับ 0.35 ± 0.06 mg GAE/g sample (ตารางที่ 4.1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซน และผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในสมุนไพรไทย

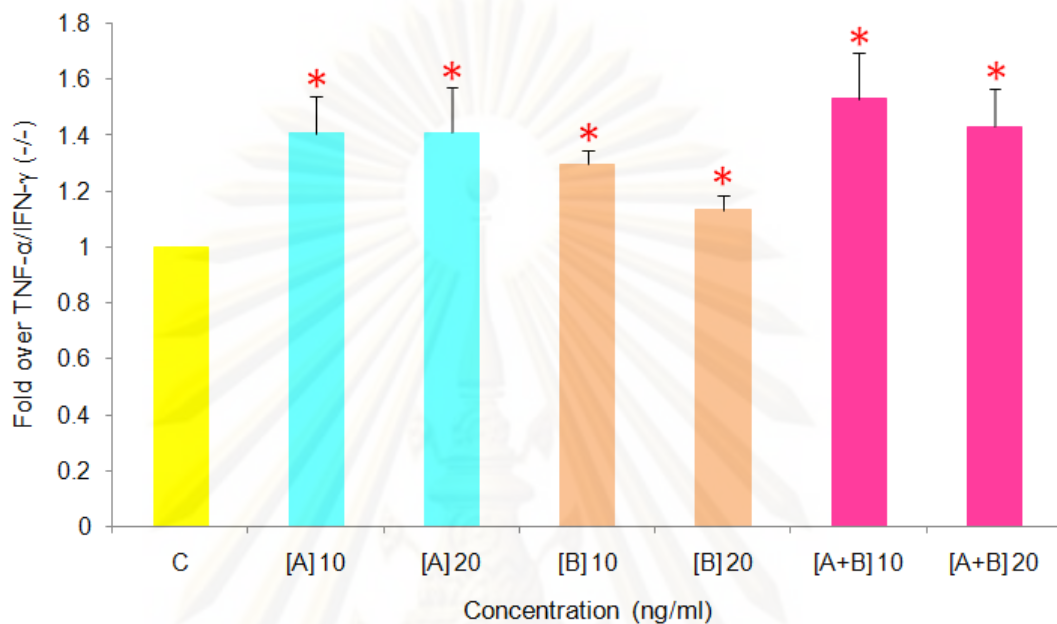
Name of medicinal material	Family	Part used	Extract yield (%)		Total phenolic content (mg GAE/ g sample)
			Ethanol	Hexane	
<i>Curcuma longa</i> L.	Zingiberaceae	Rhizome	9.6	2.5	7.49 ± 0.50
<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	Zingiberaceae	Rhizome	7.7	1.3	2.72 ± 1.37
<i>Punica granatum</i> L. var. <i>granatum</i>	Punicaceae	Fruit	30.3	0.8	6.16 ± 2.39
<i>Annona squamosa</i> L.	Annonaceae	Leave	11.7	5.3	4.02 ± 1.97
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Umbelliferae	Whole body	9.2	3.2	1.64 ± 0.84
<i>Sapindus rarak</i> DC.	Sapindaceae	Fruit	31.5	2.9	0.35 ± 0.06
<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	Saururaceae	Leave	7.0	5.0	5.08 ± 0.40
<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz	Acanthaceae	Leave	5.0	3.5	10.04 ± 1.12
<i>Clinacanthus nutans</i> (Burm.f.) Lindau	Acanthaceae	Leave	10.0	7.0	4.67 ± 3.60
<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	Leguminosae-Caesalpinioideae	Stalk	3.2	0.8	27.57 ± 0.15
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	Rhizome	15.0	4.0	4.44 ± 2.97

4.4 ผลการทดสอบการกระตุ้นการแสดงออก TGF- α ของเซลล์ HaCaT ด้วย IFN- γ และ TNF- α

ทดสอบการกระตุ้นการแสดงออกยีน TGF- α ของเซลล์ HaCaT ด้วย IFN- γ และ TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ทั้ง IFN- γ และ TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการแสดงออกยีน TGF- α ของเซลล์ HaCaT ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังภาพที่ 4.12 และ 4.13



ภาพที่ 4.12 ผลการแสดงออกของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง L = 100 bp ladder, 1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 2 และ 3 = เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ng/ml ตามลำดับ 4 และ 5 = เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ng/ml ตามลำดับ, 6 และ 7 = เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ร่วมกับ IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ng/ml ตามลำดับ, 8 = negative control สำหรับปฏิกิริยา RT และ 9 = negative control สำหรับปฏิกิริยา PCR



ภาพที่ 4.13 กราฟการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C = เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ และ TNF- α , A [10] และ A [20] = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ng/ml ตามลำดับ, B [10] และ B [20] = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ng/ml ตามลำดับ และ A+B [10] และ A+B [20] = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ng/ml ตามลำดับ พบว่า ทั้ง TNF- α และ IFN- γ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน TGF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (*)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย

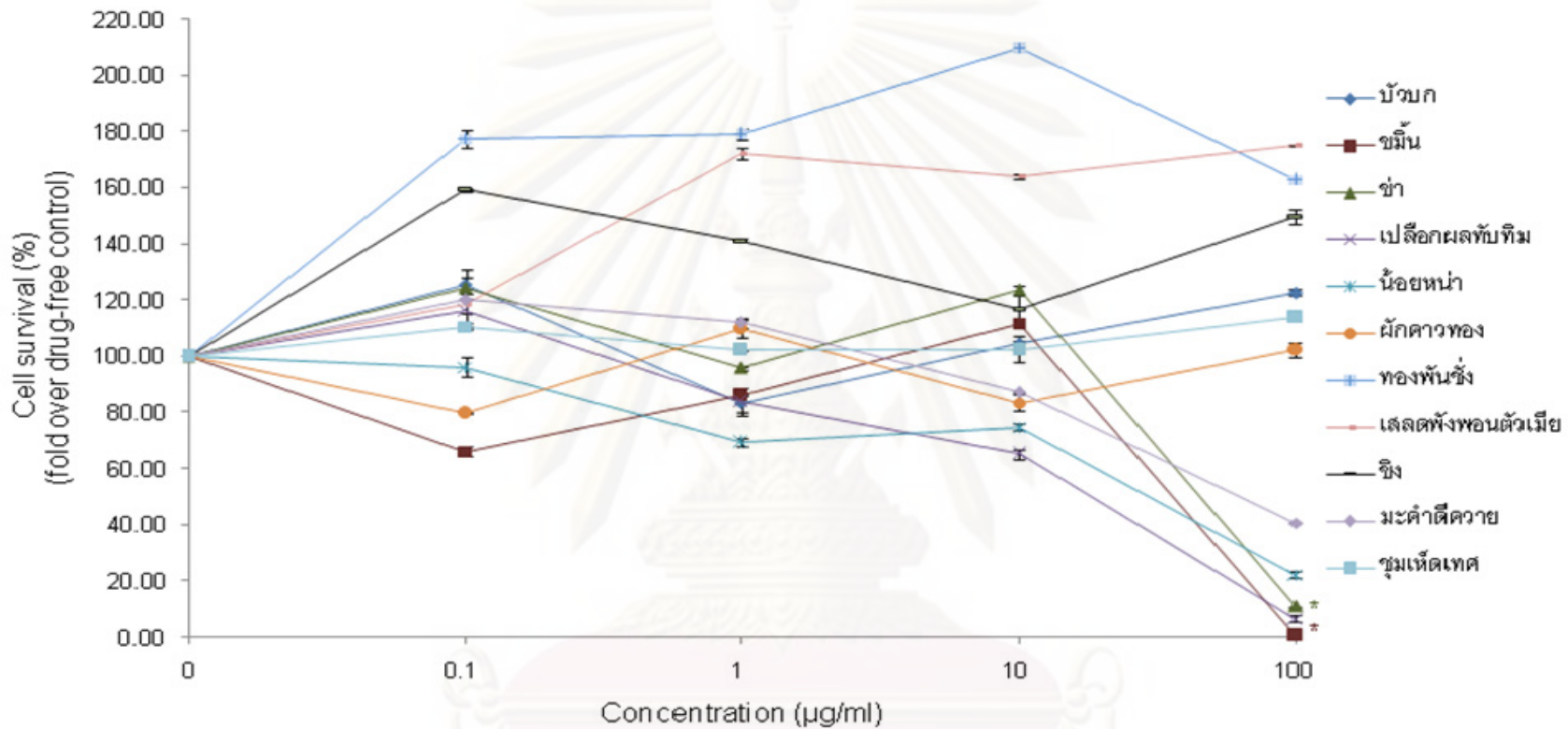
ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง 11 ที่สกัดได้จากตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซน ที่ความเข้มข้นของสมุนไพร 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625 และ 0.1953125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT โดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งตรวจวัดความสามารถในการเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ในเซลล์ และใช้วิธี Neutral Red (NR) accumulation assay ซึ่งตรวจวัดความสามารถในการทำกิจกรรม หรือการใช้พลังงาน ATP ของเซลล์ ในการทดสอบเซลล์ HaCaT จะถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรต่ออีก 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรเป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) มีค่าการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มควบคุมบวก (positive control) คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบกับ 100 เปอร์เซ็นต์ DMSO มีค่าการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดสอบที่ได้จะเป็นการเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่ม negative control

4.5.1 ผลการตรวจวัดการทำงานของเซลล์ โดยการตรวจวัดความสามารถในการเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (Metabolic capacity) ด้วยวิธี MTT assay

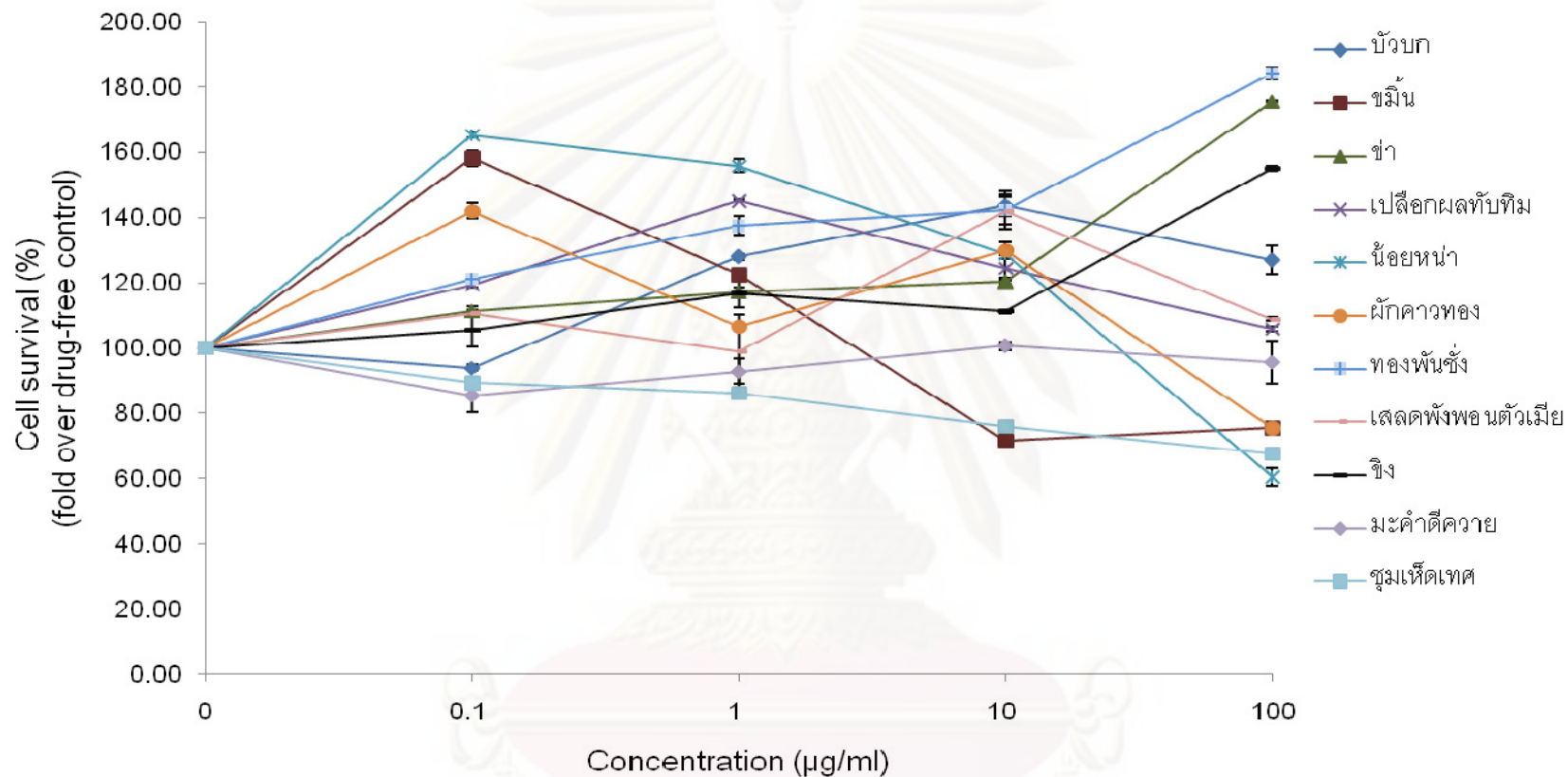
เมื่อทดสอบเซลล์ HaCaT กับสารสกัดสมุนไพรทั้ง 11 ชนิด จากตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซน พบว่า สารสกัดจากขมิ้น ข่า เปลือกผลทับทิม และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT (ภาพที่ 4.14) ส่วนสารสกัดสมุนไพรจากตัวทำละลายเฮกเซน ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT (ภาพที่ 4.15)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

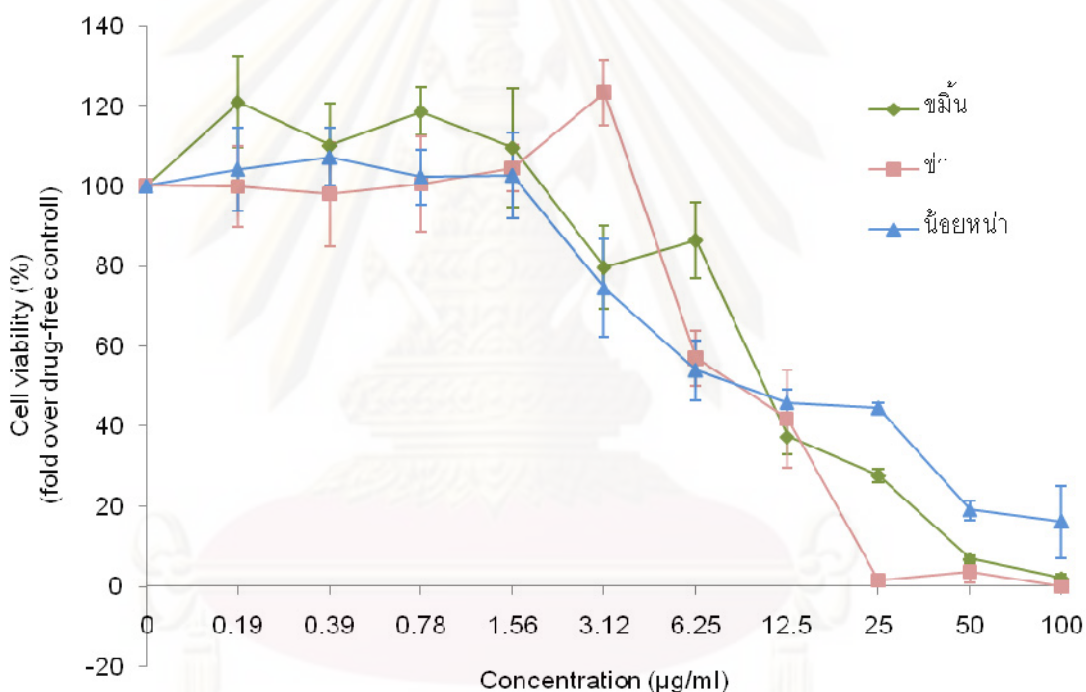


ภาพที่ 4.14 กราฟผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้นที่ 0.1, 1, 10 และ 100 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) พบว่า ขมิ้น และข่า ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml (*) สามารถลด % cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.15 กราฟผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเฮกเซน ความเข้มข้นที่ 0.1, 1, 10 และ 100 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) พบว่า ไม่มีสารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเฮกเซนที่สามารถลด % cell viability ได้

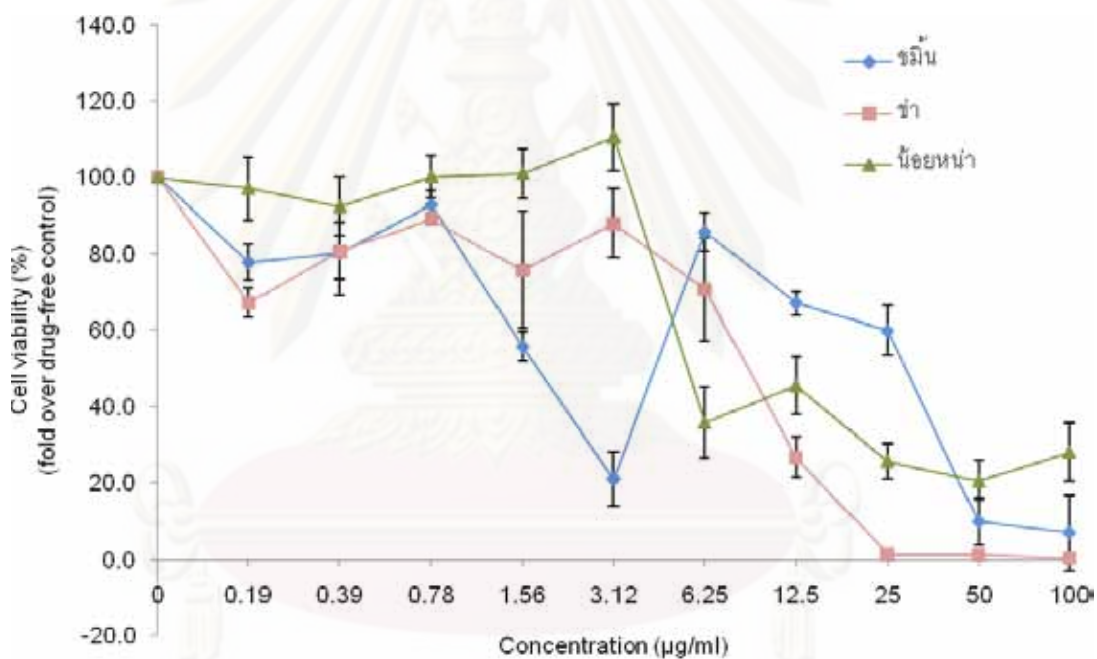
เมื่อนำสารสกัดขมิ้น ข่า เปลือกผลทับทิม และน้อยหน่า มาทำการทดสอบด้วยวิธี NR assay พบว่า สารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT ดังนั้นจึงนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มาทำการทดสอบด้วยวิธี MTT assay อีกครั้ง พบว่า สารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่าการมีชีวิตของเซลล์ได้สูงสุด คือ มีค่าเท่ากับ 1.95 ± 1.15 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดข่า ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่าการมีชีวิตของเซลล์ได้สูงสุดคือ มีค่าเท่ากับ 0 ± 1.27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากน้อยหน่า ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่าการมีชีวิตของเซลล์ได้สูงสุดคือ มีค่าเท่ากับ 16.05 ± 8.94 เปอร์เซ็นต์ สามารถคำนวณค่า IC_{50} ของขมิ้น ข่า และน้อยหน่า ได้เท่ากับ 6.7, 6.3 และ 6.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 กราฟผลการทดสอบสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1953125 ถึง 100 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง) พบว่า สามารถลด % cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

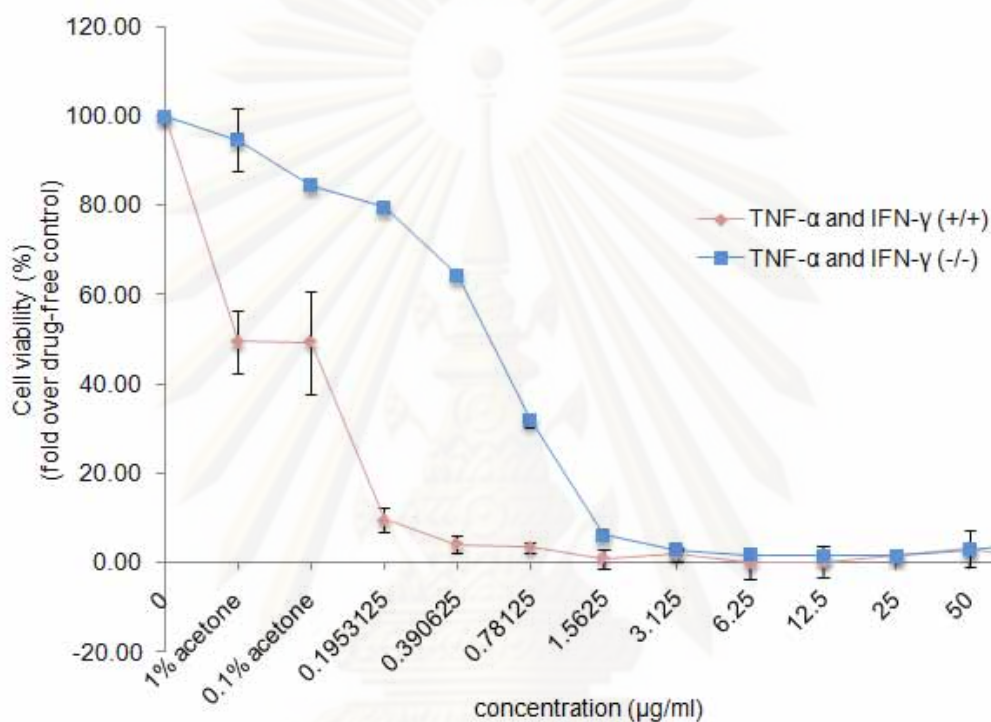
4.5.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเซลล์ (Cellular activity) โดยการตรวจวัดความสามารถในการเก็บกินเม็ดสี ด้วยวิธี Neutral Red accumulation assay

เมื่อนำสารสกัดขมิ้น ข่า เปลือกผลทับทิม และน้อยหน่า มาทำการทดสอบด้วยวิธี NR assay พบว่า สารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT ดังนั้นจึงนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มาทำการทดสอบด้วยวิธี NR assay อีกครั้ง (ภาพที่ 4.17) พบว่า สารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่าการมีชีวิตของเซลล์ได้สูงสุดคือ มีค่าเท่ากับ 6.87 ± 9.72 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดข่า ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่าการมีชีวิตของเซลล์ได้สูงสุดคือ มีค่าเท่ากับ 0.42 ± 1.47 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากน้อยหน่า ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่าการมีชีวิตของเซลล์ได้สูงสุดคือ มีค่าเท่ากับ 20.70 ± 5.23 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.17 กราฟผลการทดสอบสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1953125 ถึง 100 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี NR assay (ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง)

เมื่อเปรียบเทียบการทดสอบสาร dithranol ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1953125 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระหว่างเซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้น และถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.18) พบว่า เซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้น สามารถคำนวณค่า IC₅₀ ได้เท่ากับ 0.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไม่สามารถคำนวณค่า IC₅₀ ได้



ภาพที่ 4.18 กราฟเปรียบเทียบผลการทดสอบสาร dithranol ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1953125 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$ ระหว่างเซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้น และถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml พบว่า เซลล์ HaCaT ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.42 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่เซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ ไม่สามารถคำนวณหาค่า IC₅₀ ได้

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า ที่มีผลต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน TGF- α

ทดสอบในเซลล์ HaCaT ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า จะมีการแสดงออกของยีน TGF- α เพิ่มขึ้น จากนั้นทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากข่าทั้ง 3 ความเข้มข้นสามารถลดการแสดงออกของยีน TGF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.19 - 4.22



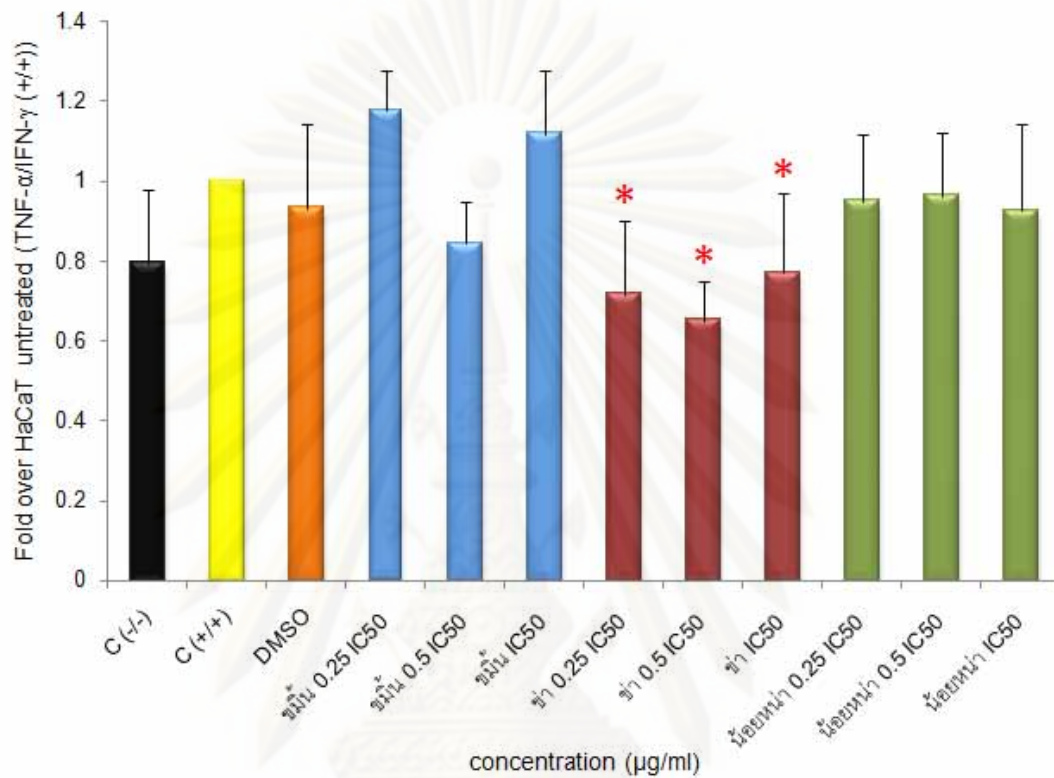
ภาพที่ 4.19 ผลการแสดงออกของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 1 = 100 bp ladder, 2 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 4 = เซลล์ที่ทดสอบกับ 0.0067% DMSO, 5 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 6 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀, 7 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น IC₅₀, 8 = negative control สำหรับปฏิกิริยา RT และ 9 = negative control สำหรับปฏิกิริยา PCR



ภาพที่ 4.20 ผลการแสดงผลของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดชาจากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 1 = 100 bp ladder, 2 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 4 = เซลล์ที่ทดสอบกับ 0.0063% DMSO, 5 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดชาที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 6 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดชา ที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀, 7 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดชา ที่ความเข้มข้น IC₅₀, 8 = negative control สำหรับปฏิกิริยา RT และ 9 = negative control สำหรับปฏิกิริยา PCR



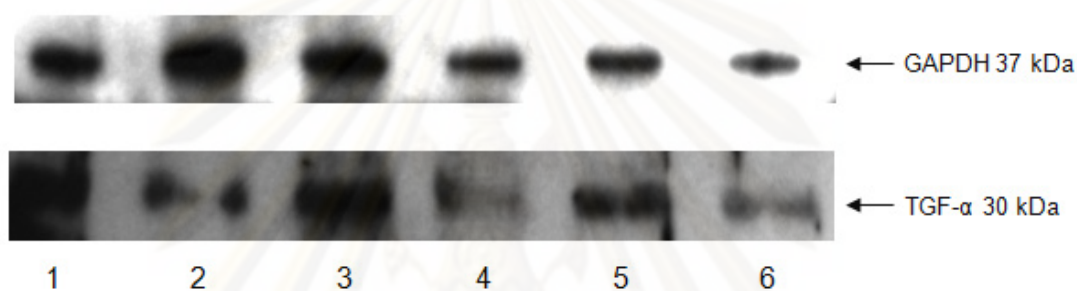
ภาพที่ 4.21 ผลการแสดงออกของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 1 = 100 bp ladder, 2 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 4 = เซลล์ที่ทดสอบกับ 0.0063% DMSO, 5 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 6 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า ที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀, 7 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า ที่ความเข้มข้น IC₅₀, 8 = negative control สำหรับปฏิกิริยา RT และ 9 = negative control สำหรับปฏิกิริยา PCR



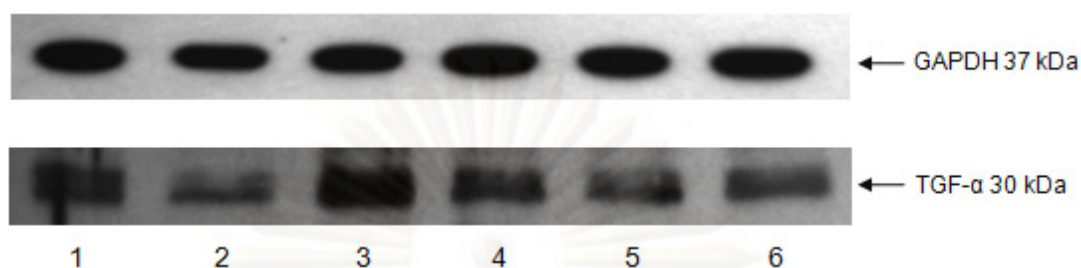
ภาพที่ 4.22 กราฟผลการแสดงออกของยีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง C (-/-) = เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ และ TNF- α และ C (+/+) = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ และ TNF- α พบว่า สารสกัดจากข่าทั้ง 3 ความเข้มข้น (*) สามารถลดการแสดงออกของยีน TGF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่า P -value เท่ากับ 0.008, 0.001 และ 0.048 ตามลำดับ

4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย ที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนของยีน TGF- α

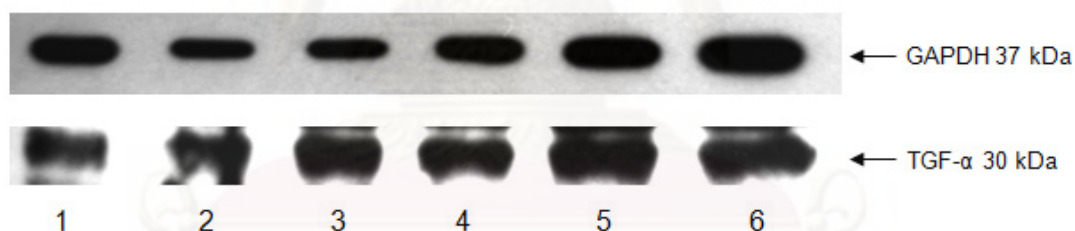
ทดสอบในเซลล์ HaCaT ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า จะมีการแสดงออกของโปรตีน TGF- α เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากข่า ที่ความเข้มข้น IC₅₀ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน TGF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.23 และ 4.26



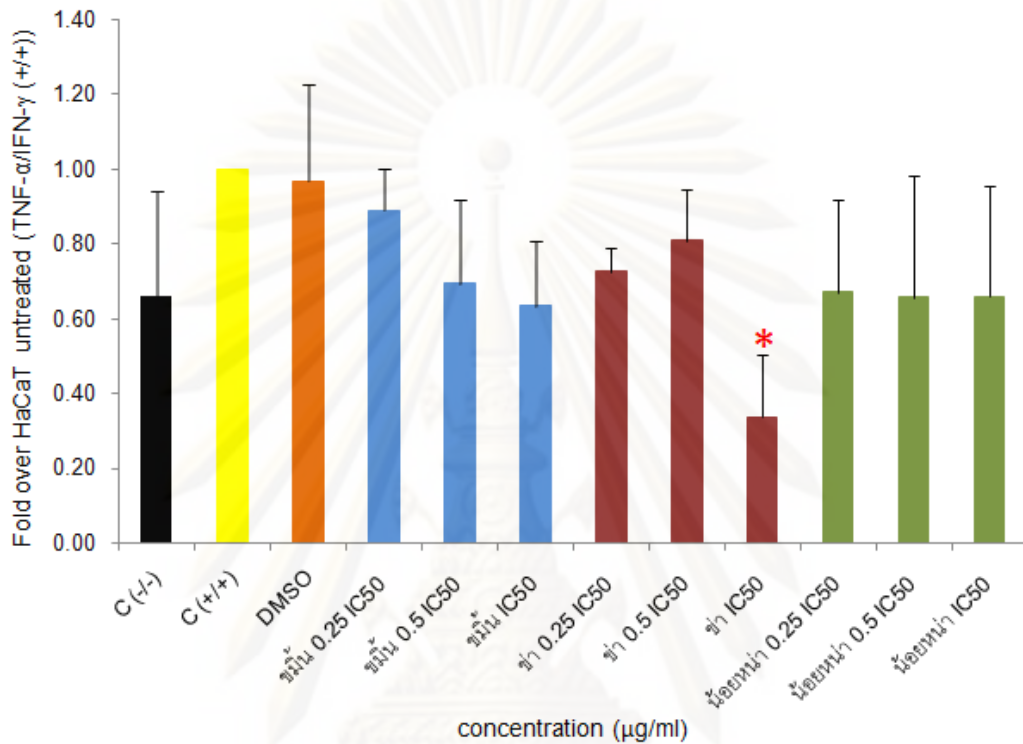
ภาพที่ 4.23 ผลการแสดงออกของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 3 = เซลล์ที่ทดสอบกับ 0.0067% DMSO, 4 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 5 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀ และ 6 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดขมิ้น ที่ความเข้มข้น IC₅₀



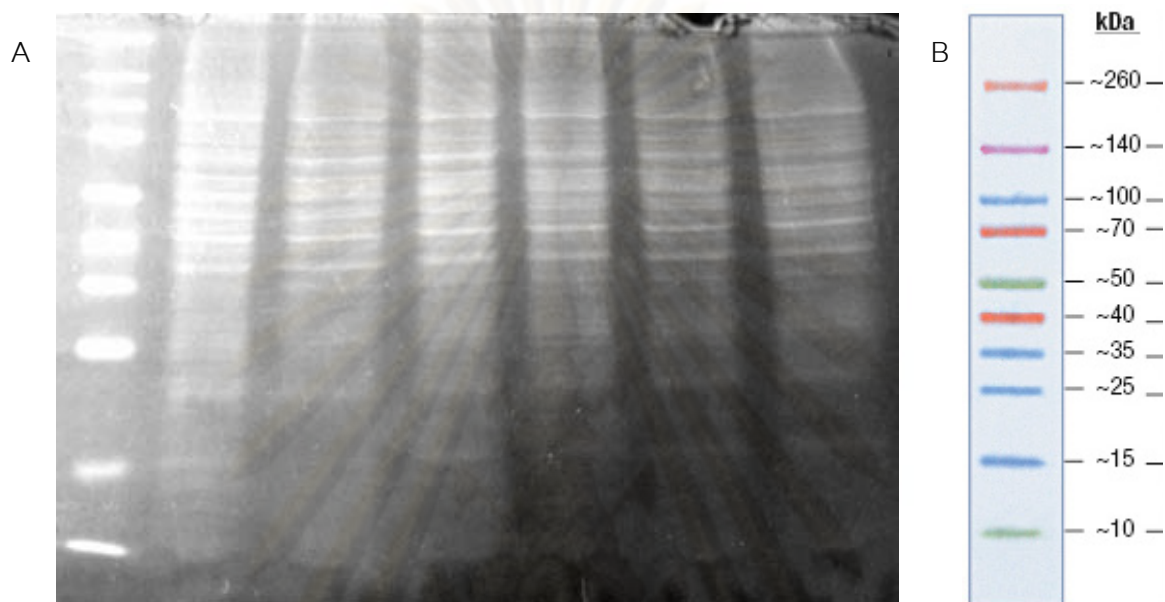
ภาพที่ 4.24 ผลการแสดงออกของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัด ข่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 3 = เซลล์ที่ทดสอบกับ 0.0063% DMSO, 4 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดข่า ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 5 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดข่า ที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀ และ 6 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.25 ผลการแสดงออกของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ , 3 = เซลล์ที่ทดสอบกับ 0.0063% DMSO, 4 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 5 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า ที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀ และ 6 = เซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า ที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.26 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน TGF- α ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับ สารสกัดขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง C (-/-) = เซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ และ TNF- α และ C (+/+) = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ และ TNF- α พบว่า สารสกัดจากข่า ที่ความเข้มข้น IC₅₀ (*) สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน TGF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่า P -value เท่ากับ 0.028



ภาพที่ 4.27 (A) โปรตีนตัวอย่างที่นำมาแยกบน SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue G แสดงให้เห็นว่า ปริมาณโปรตีนที่นำมา load มีปริมาณไม่แตกต่างกัน

(B) Broad Range Protein Molecular Weight Markers

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

แหล่งที่มาของสมุนไพรไทย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คณะผู้วิจัย ได้รวบรวมสมุนไพร 11 ชนิด ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังในงานสาธารณสุข จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง ดังนั้น ผลการศึกษาที่ได้อาจไม่สามารถเป็นตัวแทนของสมุนไพรทั้งประเทศได้ เนื่องจากยังมีอีกหลายปัจจัยที่ส่งผลถึงสารสำคัญ หรือองค์ประกอบภายในสมุนไพร เช่น ปัจจัยของสิ่งแวดล้อม (สภาพดิน น้ำ ฯลฯ) นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับอายุของสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ ซึ่งอายุของสมุนไพรอาจมีผลต่อสารสำคัญ หรือองค์ประกอบภายในสมุนไพรได้เช่นเดียวกัน

วิธีการสกัดสารจากสมุนไพรไทยทั้ง 11 ชนิด

ผู้วิจัยใช้วิธีมาเซอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ชนิดแรกคือ เอทานอล เพื่อให้ได้สารสกัดส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic) สาเหตุที่ผู้วิจัยไม่เลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากมีหลายรายงานที่สกัดสารสำคัญของสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์มากกว่าการใช้น้ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงคาดว่าตัวทำละลายอินทรีย์น่าจะสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพรได้ดีกว่าน้ำ นอกจากนี้เอทานอลยังมีความปลอดภัยมากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เพราะสามารถรับประทานได้ ตัวทำละลายอีกชนิดคือ เฮกเซน เพื่อให้ได้สารสกัดส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) สาเหตุที่ผู้วิจัยเลือกใช้เฮกเซน เนื่องจากเป็นที่นิยมมากกว่าตัวทำละลายอื่น ๆ ที่ไม่มีขั้ว ภายหลังจากการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพร ตัวทำละลายจะถูกทำให้ระเหยออกด้วยวิธี evaporation เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ จากนั้นผู้วิจัยเลือก DMSO เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากสามารถละลายสารต่าง ๆ ได้ทั้งส่วนที่มีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (nonpolar) ถึงแม้ว่าจะมีการรายงานถึงความเป็นพิษของ DMSO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตาม ณ ความเข้มข้นที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นที่ยอมรับกันว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ร่วมด้วย พบว่า DMSO ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (HaCaT cells)

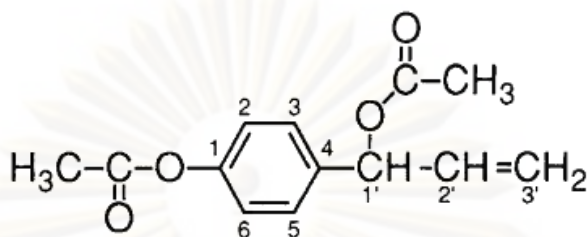
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง ผู้วิจัยเลือกเซลล์ผิวหนัง HaCaT เพื่อใช้ในการศึกษา ลักษณะสำคัญของเซลล์ชนิดนี้คือ เป็นเซลล์ผิวหนังที่มีอัตราการแบ่งตัวที่เร็วกว่าปกติ (high proliferation) คล้ายกับผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ดังนั้นเซลล์ HaCaT จึงเป็นเซลล์ที่นิยมใช้เป็น in vitro model สำหรับการศึกษารักษาโรคนี้ [15, 16] ผู้วิจัยใช้เซลล์ HaCaT เพื่อศึกษา 1. ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดจากสมุนไพรไทย โดยการทดลองประเมินฤทธิ์ด้านการแบ่งเซลล์ผิวหนัง 2. ศึกษาหากลไกการต้านการแบ่งเซลล์ผิวหนังในระดับโมเลกุล โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เพื่อหาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อการแสดงออก TGF- α ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ซึ่งเป็น growth factor ชนิดหนึ่ง ที่อยู่ในกลุ่ม EGF family หลายงานวิจัยได้รายงานถึงความสำคัญของ growth factor ในกลุ่มของ EGF family ว่ามีหน้าที่หลักในการควบคุมการพัฒนา และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนัง growth factor ในกลุ่มนี้ ที่มีสำคัญประกอบด้วย EGF, TGF- α , amphiregulin, heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) และ betacellulin ออกฤทธิ์ผ่านทางารจับกับรีเซพเตอร์จำเพาะในกลุ่มของ tyrosine kinase receptors (RTKs) จัดอยู่ใน ErbB family บริเวณผิวหนังจะพบการแสดงออกของ ErbB-1 (EGF receptor, EGFR) เป็นหลัก [148] บทบาทที่สำคัญของ RTKs คือ ควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ รวมถึงการเพิ่มจำนวน และการพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cell proliferation and differentiation) [149] มีการรายงานถึงการแสดงออกของ TGF- α ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคผิวหนังที่มีลักษณะการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังที่สูงขึ้น รวมถึงโรคสะเก็ดเงินด้วย [150, 151] ผู้วิจัยใช้เวลาในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปกติเซลล์ HaCaT จะมีเวลาในการแบ่งตัว(doubling time) ประมาณ 16 ชั่วโมง [152, 153] ผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะครอบคลุมเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นผลการทดสอบน่าจะแสดงถึงฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ HaCaT ในทุกระยะการแบ่งตัวของเซลล์ที่ประกอบด้วยระยะ G₁, S, G₂ และ M วิธีมาตรฐานสำหรับการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) คือ ³H-Thymidine Incorporation (³H-TdR incorporation assay) มีข้อเสียคือ ³H-Thymidine เป็นสารกัมมันตรังสี อาจก่อให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นการทดลองประเมินฤทธิ์ด้านการแบ่งเซลล์ HaCaT ผู้ทดลองจึงเลือกใช้วิธี MTT assay และวิธี NR assay แทน ซึ่งทั้ง 2 วิธี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้วัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และทดสอบความเป็นพิษของสาร ๆ ต่าง ค่าที่ได้จากวิธี MTT assay มักใช้บ่งชี้สภาวะการเสียหายของเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม และไมโทคอนเดรีย เพราะการเกิดปฏิกิริยาการรีดิวซ์สารประกอบ

MTT ด้วยตัววัดคือ NADH และ NAD(P)H ต้องใช้เอนไซม์ภายในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม และไมโทคอนเดรีย เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่วนค่าที่ได้จากวิธี NR assay มักใช้บ่งชี้ระดับพลังงาน และกิจกรรมของเซลล์ ที่ใช้ในการเก็บกินเม็ดสี Neutral red ดังนั้นค่าที่ได้จากทั้ง 2 วิธี จึงไม่จำเป็นต้องเท่ากัน เนื่องจากกลไกของการเกิดปฏิกิริยา และความไวของการตรวจวัดของ 2 วิธีนี้ แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้ควรสอดคล้องกัน เมื่อทดสอบเซลล์ HaCaT กับสารสกัดสมุนไพรไทยทั้งส่วนสกัดได้จากตัวทำละลายเอทานอล และเฮกเซน ผู้วิจัยพบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay และวิธี NR assay สารสกัดขมิ้น ฆ่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ HaCaT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากนั้นคำนวณค่า IC_{50} ของขมิ้น ฆ่า และน้อยหน่า โดยใช้ Logarithmic graph มีค่าเท่ากับ 6.7, 6.3 และ 6.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการที่สารสกัดจากเปลือกทับทิมแสดงผลการยับยั้งการแบ่งเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay แต่ไม่แสดงผลการยับยั้งการแบ่งเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยวิธี NR assay ผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจากมีสารบางอย่างในสารสกัดมีผลไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาการวัดด้วยสารประกอบ MTT จึงทำให้ผลการทดสอบดูเหมือนเป็นการยับยั้งการแบ่งเซลล์ ส่วนสารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเฮกเซน พบว่า ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ HaCaT นอกจากนี้เซลล์ HaCaT ยังถูกกระตุ้นด้วย $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ ซึ่งเป็นไซโตไคน์ชักนำให้เกิดการอักเสบ และมีระดับที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน [151, 154] ดังนั้นสารสกัดขมิ้น ฆ่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล อาจมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่มีการรายงานถึงสาร curcumin และอนุพันธ์ที่สกัดได้จากขมิ้น [155, 156] สาร 1'-acetoxychavicol acetate, 1'-acetoxyeugenol acetate และ eugenol ที่สกัดได้จากขมิ้น มีฤทธิ์ลดการอักเสบ [157, 158] คณะผู้วิจัยใช้ dithranol เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) เพื่อเปรียบเทียบกับทดสอบเซลล์ HaCaT ด้วยสารสกัดจากสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ (ภาพที่ 4.17) พบว่า ในสภาวะที่เซลล์ HaCaT ไม่ถูกกระตุ้นด้วย $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ สามารถหาค่า IC_{50} ของ dithranol ได้ มีค่าเท่ากับ 0.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สภาวะที่เซลล์ HaCaT ถูกกระตุ้นด้วย $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ พบว่า dithranol มีค่า IC_{50} น้อยกว่า 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงความเป็นพิษของ dithranol ในสภาวะที่เซลล์เกิดการอักเสบ ดังนั้นอาจเป็นหลักฐานหนึ่งที่ช่วยสนับสนุนการห้ามใช้ dithranol ในผื่นโรคสะเก็ดเงินที่แดง และมีน้ำเหลือง เพราะ dithranol มีฤทธิ์ระคายเคืองอาจทำให้โรคกำเริบกลายเป็นโรคสะเก็ดเงินชนิดตุ่มหนองกระจายทั่วตัว [159] แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด คณะผู้วิจัย ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากขมิ้น ฆ่า และน้อยหน่า ในการยับยั้งการแสดงออกของ $TGF-\alpha$ ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ด้วยเทคนิค RT-PCR และ Western blot พบว่า สารสกัดจากขมิ้น

เท่านั้น ที่มีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของ TGF- α ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการยับยั้งที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารสกัดจากชาในระดับ mRNA และโปรตีน เนื่องจากในระหว่างการถอดรหัสจาก mRNA ไปเป็นโปรตีน จะต้องผ่านกลไกต่าง ๆ เพื่อให้เกิดความถูกต้องมากที่สุด รวมถึงกระบวนการ Posttranslational modification ของโปรตีน ดังนั้นสารสกัดจากชาอาจออกฤทธิ์ได้ดีในช่วงกระบวนการใดกระบวนการหนึ่ง จึงทำให้ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TGF- α ในระดับ mRNA และโปรตีน มีความแตกต่าง นอกจากนี้การตรวจวัด TGF- α ในระดับโปรตีน ผู้วิจัยตรวจในรูปของ precursor form เนื่องจากรูป active form โปรตีน TGF- α มีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังนั้นสารสกัดจากชาอาจมีฤทธิ์ลดระดับโปรตีน TGF- α ในรูป active form ได้ดีกว่ารูป precursor form

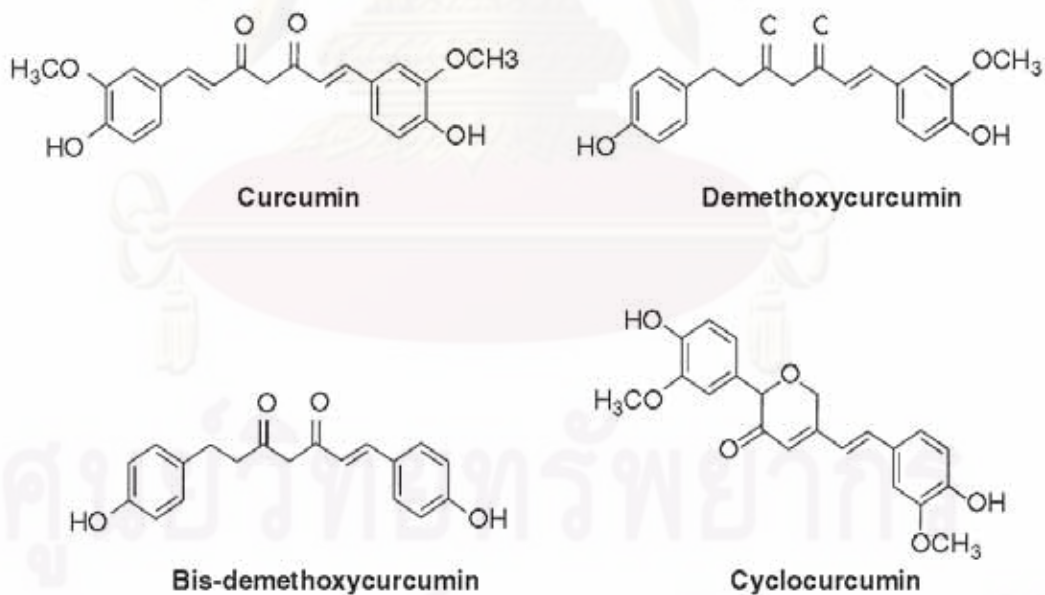
สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของชาคือ 1'-acetoxychavicol acetate (ACE) (ภาพที่ 5.1) มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ดังนี้ 1. ยับยั้งการกระตุ้นการเกิดเนื้องอกจากไวรัส Epstein-Barr ได้ [160] 2. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase [161] ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งที่ทำให้เกิด superoxide ions จากการเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ของสารกลุ่มพิวรีน 3. ในหนูทดลองพบว่า สามารถยับยั้งการกระตุ้นการเกิดเนื้องอกบริเวณผิวหนัง [162] ปาก [163] ลำไส้ใหญ่ [164, 165] และหลอดอาหาร [166] จากสารเคมีต่าง ๆ 4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ transcription factors ต่าง ๆ เช่น NF-kB, STAT1 และ AP-1 [167] จึงเป็นการป้องกันการเกิด nitric oxide ในระหว่างกระบวนการอักเสบ 5. ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด myeloma cells โดยกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ผ่านทางกระตุ้นการทำงานของ caspase 8 และ caspase 9 pathways มีผลทำให้การยับยั้งการทำงานของ NF-kB [168] 6. ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ยับยั้งการสร้าง superoxide (O_2^-) จากเม็ดเลือดขาว [162] ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ornithine decarboxylase และการสร้างโพลีเอมีน (polyamine) [163] กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และ quinone reductase (QR) [164] ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่า นอกจากชาจะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังผ่าน TGF- α แล้ว อาจยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังผ่านทาง 1. กระตุ้นให้เกิดการ apoptosis ผ่านทางการทำงานของ caspase 8 และ caspase 9 pathways ได้เช่นเดียวกับกรณีของ myeloma cells หรือ 2. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ornithine decarboxylase และการสร้างโพลีเอมีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่าง ๆ นอกจากนี้ ชาอาจช่วยให้ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกลับมา มีภาวะสมดุลระหว่าง oxidation และ antioxidation จากการยับยั้งการสร้าง superoxide (O_2^-)

และการเกิด lipid peroxidation รวมถึงการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และ quinone reductase (QR)



ภาพที่ 5.1 โครงสร้างของ 1'-acetoxychavicol acetate (ACE) [169]

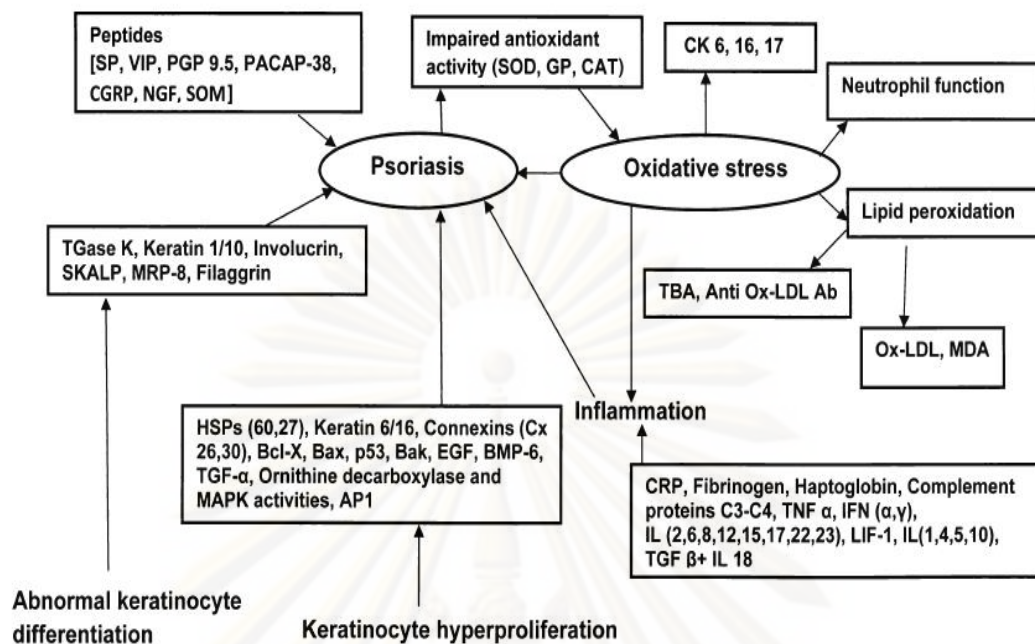
สารสกัดจากขมิ้น (curcuminoids) มีอยู่ 4 ชนิดหลักคือ 1. curcumin 2. cyclocurcumin 3. demethoxycurcumin และ 4. bisdemethoxycurcumin ดังภาพที่ 5.2 มีรายงานว่าสารที่มีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์มากที่สุดคือ curcumin [170, 171]



ภาพที่ 5.2 สารกลุ่ม curcuminoids พบในส่วนเหง้า (rhizome) ของขมิ้น [172]

Curcumin มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ดังนี้ 1. สามารถต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) [173] โดยการป้องกันการเกิด และกำจัด reactive oxygen species (ROS) [174, 175] รวมทั้ง reactive nitrogen species [176, 177] ช่วยกระตุ้นเอนไซม์ glutathione transferase [178], haeme-oxygenase-1 [179] และ catalase [178] ลดการแสดงออกของ lipid peroxidation และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) [180] 2. ยับยั้งการกระตุ้น transcription factors ต่าง ๆ เช่น AP-1, NF- κ B และ STAT ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ รวมถึงการแพร่กระจายของ เซลล์มะเร็ง และการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) [181] 3. กระตุ้นการทำงานของ peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ [182] 4. กระตุ้นการเกิด pro-apoptotic protein ของ Bcl-2 family และลดการเกิด anti-apoptotic protein ในเซลล์มะเร็ง [183-187] กระตุ้น pro-caspases-3, pro-caspases-8 และ pro-caspases-9 [188] ซึ่งเป็นปัจจัยหลักนำไปสู่การ apoptosis แบบ extrinsic pathway ส่งเสริมการเกิด Fas signaling pathway [189] เป็น apoptosis แบบ extrinsic pathway เช่นเดียวกัน 5. ยับยั้งโปรตีนในกลุ่มของ protein kinases ต่าง ๆ เช่น MAPK, protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) และ growth factor receptor protein tyrosine kinases [190] 6. ยับยั้งโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เช่น cyclooxygenase-2 (COX-2) ดังนั้นถึงแม้ว่าไขมันจะไม่สามารถลดระดับการแสดงออกของ TGF- α ได้ แต่ผู้วิจัยคาดว่า ไขมันอาจยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ผ่านกลไกอื่น ๆ เช่น 1. ผ่านทางการยับยั้งโปรตีนในกลุ่มของ protein kinases ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ 2. เพิ่มอัตราการเกิด apoptosis โดย กระตุ้นการทำงานของ pro-apoptotic protein ของ Bcl-2 family, pro-caspases-3, pro-caspases-8 และ pro-caspases-9 รวมทั้งลด anti-apoptotic protein ต่าง ๆ

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของใบน้อยหน่า อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าสารสกัดจากน้อยหน่า จะไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของ TGF- α ผู้วิจัยคาดว่า น่าจะมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากใบน้อยหน่า สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ผ่านกลไกอื่น ๆ ได้ เช่น อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ EGFR ได้เช่นเดียวกับ dithranol ที่คณะผู้วิจัยได้ รายงานไว้ [191]



ภาพที่ 5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน

สารอนุมูลอิสระไขมัน ช้ำ และน้อยหน้า อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ผ่านปัจจัยอื่น นอกเหนือจาก TGF- α หรืออาจช่วยบรรเทาอาการของโรคสะเก็ดเงินผ่านกลไกอื่น ดังรูป

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติรวมถึงสมุนไพรไทย โดยใช้ Folin Ciocalteu Phenol assay ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดความสามารถของสารประกอบฟีนอลในการรีดิวซ์ (reducing property) สารละลาย Folin Ciocalteu Phenol reagent ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็นสารละลายสีฟ้า ความเข้มข้นของสีฟ้าจะแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในสิ่งตัวอย่าง ข้อเสียของวิธีนี้คือ หากมีสารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing agent) ปดอมปนอยู่ในสิ่งตัวอย่าง จะทำให้เกิดผลบวกปลอมขึ้น (false positive) หรือทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่วัดได้มีค่าสูงกว่าความเป็นจริง เมื่อทำการตรวจวัดพบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยทุกชนิด จากตัวทำละลายเอทานอล มีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นสมุนไพรไทยเหล่านี้จะมีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ ผู้วิจัยจึงคาดว่า อาจช่วยลดภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน (ภาพที่ 5.3)

สรุป และข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยได้ศึกษา และรวบรวมสมุนไพร 11 ชนิด ที่ใช้รักษาโรคผิวหนังในงานสาธารณสุข จากสมุนไพรสมเด็จพะเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านการแบ่งเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (HaCaT) ในลักษณะของ in vitro model พบว่า สารสกัดจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า สามารถต้านการแบ่งเซลล์ HaCaT ได้สูงสุด ค่า IC_{50} ของขมิ้น ข่า และน้อยหน่า ได้เท่ากับ 6.7, 6.3 และ 6.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดสมุนไพรจากเฮกเซน ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ HaCaT

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำสารสกัดจากขมิ้น ข่า และน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการแสดงออกของ TGF- α ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน พบว่า สารสกัดจากข่าเท่านั้น ที่มีสามารถยับยั้งการแสดงออกของ TGF- α ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การตรวจวัดสารประกอบฟีนอลในสารสกัดสมุนไพรไทย จากตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยทุกชนิด มีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบ

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ ผู้วิจัยไม่ได้ทำการแยกสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ ของสารสกัดสมุนไพร อีกทั้งยังศึกษาสารบ่งชี้ (marker) เพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงควรทำการแยกสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ โดยอาจใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) และศึกษาสารบ่งชี้ชนิดอื่น ๆ เพิ่มขึ้น เช่น สารบ่งชี้ในกลุ่มของภาวะ oxidative stress กลุ่มสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ หรืออาจประยุกต์นำเทคนิค Two-dimensional gel electrophoresis มาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด ก่อน และหลังการทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่นำมาใช้ประโยชน์ได้มากยิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

- [1] Yip SY. The prevalence of psoriasis in the Mongoloid race. J Am Acad Dermatol 10 (1984): 965-968.
- [2] Sander HM., Morris LF., Phillips CM., Harrison PE., Menter A. The annual cost of psoriasis. J Am Acad Dermatol 28 (1993): 422-425.
- [3] Farber EM., Nall L. Epidemiology: natural history and genetics, Psoriasis. New York: Dekker (1998): 107-157.
- [4] Fry L. Psoriasis. Br J Dermatol 119 (1988): 445-461.
- [5] Johann EG., Elder JT. Psoriasis: epidemiology. Clinics in Dermatology 25 (2007): 535-546.
- [6] Frank ON., Daniel HK., Jonathan B. Psoriasis. N Engl J Med 361 (2009): 496-509.
- [7] Krueger GG., Bergstresser PR., Lowe NJ., Voorhees JJ., Weinstein GD. Psoriasis. J Am Acad Dermatol 11 (1984): 937-947.
- [8] Gladman DD. Natural history of psoriatic arthritis. Baillieres Clin Rheumatol 8 (1994): 379-394.
- [9] กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. สถิติโรคของสถาบันโรคผิวหนัง. [ออนไลน์]. 2551. แหล่งที่มา: http://www.inderm.go.th/nuke_802/modules.php?name=Forums&file=viewtopic&t=286 [2552, สิงหาคม 10]
- [10] Horn EJ., Fox KM., Patel V., Chiou CF., Dann F., Lebwohl M. Association of patient-reported psoriasis severity with income and employment. J Am Acad Dermatol 57 (2007): 963-971.
- [11] Gelfand JM., Feldman SR., Stern RS., Thomas J., Rolstad T., Margolis DJ. Determinants of quality of life in patients with psoriasis: a study the US population. J Am Acad Dermatol 51 (2004): 704-708.
- [12] Nijisten T., Margolis DJ., Feldman SR., Rolstad T., Stern RS. Traditional systemic treatments have not fully met the needs of psoriasis patients: results from a national survey. J Am Acad Dermatol 52 (2005): 434-444.
- [13] Sterry W., Barker J., Boehncke WH. Biological therapies in the systemic management of psoriasis: International Consensus Conference. Br J Dermatol 69 (2004): 3-17.

- [14] วิทย์ เทียงบุญธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สุริยบรรณ, 2539.
- [15] Muller K., Sellmer A., Wiegrebe W. Potential antipsoriatic agents: lapacho compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. J Nat Prod 62 (1999): 1134-1136.
- [16] Tang L., Yu Y., Chen J., Li Q., Yan M., Guo Z. The inhibitory effect of VitD3 on proliferation of keratinocyte cell line HACAT is mediated by down-regulation of CXCR2 expression. Clin Exp Dermatol 28 (2003): 416-419.
- [17] The Global Moderators. SkinCell International Forum for Skin Disorders [Online]. 2003. Available from: <http://www.skincell.org/psoriasis.shtml> [2009, July 22]
- [18] Parapharmaceutical Product. Psoriasis [Online]. 2009. Available from: <http://skinprotector.info/> [2009, July 22]
- [19] Krueger GG., Feldman SR., Camisa C., Duvic M., Elder JT., Gottlieb AB. Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: What defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis? J Am Acad Dermatol 43 (2000): 281-285.
- [20] National Psoriasis Foundation. Types of psoriasis [Online]. 2009. Available from: http://www.psoriasis.org/netcommunity/sublearn01_typesps [2009, July 22]
- [21] Ghoreschi K., Weigert C., Röcken M. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. Clinics in Dermatology 25 (2007): 574-580.
- [22] Mueller W., Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. N Engl J Med (1979): 301:555.
- [23] Sabat R., Sterry W., Philipp S., Wolk K. Three decades of psoriasis research: where has it led us? Clinics in Dermatology 25 (2007): 504-509.
- [24] Homoeopathyworld. Types of psoriasis [Online]. 2009. Available from: http://www.homoeopathyworld.com/psoriasis/types_of_psoriasis.php [2009, July 22]
- [25] Watson W., Cann HM., Farber EM., Nall ML. The genetics of psoriasis. Arch Dermatol 105 (1972): 197-207.

- [26] Farber EM., Nall ML. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. Dermatologica 148 (1974): 1-18.
- [27] Henseler T., Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. J Am Acad Dermatol 13 (1985): 450-456.
- [28] Altmüller J., Palmer LJ., Fischer G., Scherb H., Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. Am J Hum Genet 69 (2001): 936-950.
- [29] Davidson A., Diamond B. Autoimmune diseases. N Engl J Med 345 (2001): 340-350.
- [30] Trembath RC., Clough RL., Rosbotham JL. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. Hum Mol Genet 6 (1997): 813-820.
- [31] Burden AD., Javed S., Bailey M., Hodgins M., Connor M., Tillman D. Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. J Invest Dermatol 110 (1998): 958-960.
- [32] Bowcock AM., Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. Nat Rev Immunol 5 (2005): 699-711.
- [33] Tomfohrde J., Silverman A., Barnes R. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. Science 264 (1994): 1141-1145.
- [34] Matthews D., Fry L., Powles A. Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. Nat Genet 14 (1996): 231-233.
- [35] Capon F., Novelli G., Semprini S. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. J Invest Dermatol 112 (1999): 32-35.
- [36] Enlund F., Samuelsson L., Enerback C. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. Eur J Hum Genet 7 (1999): 783-790.

- [37] Lee YA., Ruschendorf F., Windemuth C. Genomewide scan in German families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. Am J Hum Genet 67 (2000): 1020-1024.
- [38] Veal CD., Clough RL., Barber RC. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. J Med Genet 38 (2001): 7-13.
- [39] Helms C., Cao L., Krueger JG. A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. Nat Genet 35 (2003): 349-356.
- [40] Eyre RW., Krueger GG. Response to injury of skin involved and uninvolved with psoriasis and its relation to disease activity: Koebner and 'reverse' Koebner. Br J Dermatol 106 (1982): 153-159.
- [41] Tsankov N., Angelova I., Kazandjieva J. Drug-induced psoriasis: recognition and management. Am J Clin Dermatol 1 (2000): 159-165.
- [42] Gudmundsdottir AS., Sigmundsdottir H., Sigurgeirsson B., Good MF., Valdimarsson H., Jonsdottir I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? Clin Exp Immunol 117 (1999): 580-586.
- [43] Owen CM., Chalmers RJ., O'Sullivan T., Griffiths CE. Antistreptococcal interventions for guttate and chronic plaque psoriasis. Cochrane Database Syst Rev 2 (2000): CD001976.
- [44] Mallon E. Retroviruses and psoriasis. Curr Opin Infect Dis 13 (2000): 103-107.
- [45] Schön PM., Boehncke WH. Psoriasis. N Engl J Med 352 (2005): 1899-1912.
- [46] Christophers E. Psoriasis - epidemiology and clinical spectrum. Clin Exp Dermatol 26 (2001): 314-320.
- [47] Christophers E. The immunopathology of psoriasis. Int Arch Allergy Immunol 110 (1996): 199-206.
- [48] Detmar M., Brown LF., Claffey KP. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. J Exp Med 180 (1994): 1141-1146.

- [49] Nanney LB., Stoscheck CM., Magid M., Jr King LE. Altered [125I] Epidermal Growth Factor Binding and Receptor Distribution in Psoriasis. Biull Eksp Biol Med 115 (1993): 618-620.
- [50] Dermatology Online Journal. Epidermal Growth Factor Receptor [Online]. 1995. Available from: <http://dermatology.cdlib.org/1503/reviews/egfr/alexandrescu.html> [2009, December 9]
- [51] Sung KJ., Chang SE., Paik EM., Lee MW., Choi JH. Vasoactive Intestinal Polypeptide Stimulates the Proliferation of the HaCaT cell via TGF-alpha. Neuropeptides 33 (1999): 435-446.
- [52] Nickoloff BJ., Karabin GD., Barker JN., Griffiths CE., Sarma V., Mitra RS., Elder JT., Kunkel SL., Dixit VM. Cellular Localization of Interleukin-8 and Its Inducer, Tumor Necrosis Factor-alpha in Psoriasis. American Journal of Pathology 138 (1991): 129-140.
- [53] De Larco JE., Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 75 (1978): 4001- 4005.
- [54] Todaro GJ., Fryling C., De Larco JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 77 (1980): 5258- 5262.
- [55] Tam JP., Sheikh MA., Solomon DS., Ossowski L. Efficient synthesis of human type alpha transforming growth factor: its physical and biological characterization. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 83 (1986): 8082.
- [56] Lee DC., Rose TM., Webb NR., Todaro GJ. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor-alpha. Nature 313 (1985): 489-491.
- [57] Derynck R., Roberts AB., Winkler ME., Chen EY., Goeddel DV. Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in *E. coli*. Cell Biology and toxicology 38 (1984): 287- 297.
- [58] Bringman TS., Lindquist PB., Derynck R. Different transforming growth factor-alpha species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. Cell 48 (1987): 429-440.

- [59] Gentry LE., Twardzik DR., Lim GJ., Ranchalis JE., Lee DC. Expression and characterization of transforming growth factor alpha precursor protein in transfected mammalian cells. Mol Cell Biol 7 (1987): 1585-1591.
- [60] Schlessinger J. Cell signaling by Receptor tyrosine kinases. Cell 103 (2000): 211-225.
- [61] Nature Publishing Group. Transforming Growth Factor-alpha [Online]. 2008. Available from: <http://www.nature.com> [2009, December 9]
- [62] Blessing M., Schirmacher P., Kaiser S. Overexpression of Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) in the Epidermis of Transgenic Mice: Inhibition or Stimulation of Proliferation Depending on the Pattern of Transgene Expression and Formation of Psoriatic Lesions. Journal of Cell Biology 135 (1996): 227-239.
- [63] Kagrananovna AT., Tishchenko LD., Berezov TT. The Ornithine Decarboxylase Activity of the Epidermis in Psoriasis as a Biochemical Index of the Hyperproliferative Process. American Journal of Pathology 138 (1991): 129-140.
- [64] Dimon-Gadal S., Raynaud F., Evain-Brion D., Keryer G. MAP Kinase Abnormalities in Hyperproliferative Cultured Fibroblasts from Psoriatic Skin. Journal of Investigative Dermatology 110 (1998): 872-879.
- [65] Sehgal PB., Grieninger G., Tosato G., Ann NY. Acad Sci 557 (1989): 1-583.
- [66] Fong Y., Moldawer LG., Marano M., Wei H., Tatter SB., Clarick RH., Santhanam U., Sherris D., May LT., Sehgal PB., Lowry SF. J Immunol 142 (1989): 2321-2324.
- [67] Grossman MR., Krueger J., Granelli-piperno A., Murphy PD., May LT., Kuppert TS., Sehgal PB., Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci 86 (1989): 6367-6371.
- [68] Grove T., Mulfinger L. The Pathogenesis of Psoriasis: Biochemical Aspects. Journal of Young Investigators 4 (2001).
- [69] Schroeder WT., Thacher SM., Stewart-Galetka S., Annarella M., Chema D., Siciliano MJ., Davies PJ., Tang HY., Sowa BA., Duvic M. Type I Keratinocyte

- Transglutaminase: Expression in Human Skin and Psoriasis. Journal of Investigative Dermatology 99 (1992): 27-34.
- [70] Molhuizen HO., Akemade HA., Zeeuwen PL., Jongh de GJ., Wieringa B., Schalkwijk J. SKALP/Elafin: an elastase Inhibitor from Cultured Keratinocytes. Purification, cDNA sequence, and evidence for transglutaminase cross-linking. Journal of Biological Chemistry 268 (1993): 12028-12032.
- [71] Schalkwijk J., Vlijmen van IM., Alkemade JA., De Jongh GJ. Immunohistochemical Localization of SKALP/Elafin in Psoriatic Epidermis. Journal of Investigative Dermatology 100 (1993): 390-393.
- [72] Nagpal S., Thacher SM., Patel S., Friant S., Malhotra M., Shafer J., Krasinski G., Asano AT., Teng M., Duvic M., Chandraratna RA. Negative Regulation of Two Hyperproliferative Keratinocyte Differentiation Markers by a Retinoic Acid Receptor-Specific Retinoid: Insight into the Mechanism of Retinoid Action in psoriasis. Cell Growth and Differentiation 7 (1996): 1783-1791.
- [73] Goebeler M., Roth J., Bos C., Ader G., Sorg C. Increase of Calcium Levels in Epithelial Cells Induces Translocation of Calcium-binding Protein Migration Inhibitory Factor-related Protein 8 (MRP8) and MRP14 to Keratin Intermediate Filaments. Biochemistry Journal 309 (1995): 419-424.
- [74] Ishida-Yamamoto A., Iizuka H. Differences in Involucrin Immunolabeling within Cornified Cell Envelopes in Normal and Psoriatic Epidermis. Journal of Investigative Dermatology 104 (1995): 391-395.
- [75] Thewes M., Stadler R., Korge B., Mischke D. Normal Psoriatic Epidermis Expression of Hyperproliferation-associated Keratins. Journal of Investigative Dermatology 90 (1998): 801-805.
- [76] Bernard BA., Asselineau D., Schaffar-Deshayes L., Darmon MY. Abnormal Sequence of Expression of Differentiation Markers in Psoriatic Epidermis: Inversion of Two Steps in the Differentiation Program? Journal of Investigative Dermatology 86 (1986): 260-265.
- [77] Braun-Falco O., Burg G. Inflammatory infiltrate in psoriasis vulgaris: a cytochemical study. Arch Klin Exp Dermatol 236 (1970): 297-314.

- [78] Bos JD., Hulsebosch HJ., Krieg SR. Bakker PM., Cormane RH. Immunocompetent cells in psoriasis: in situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. Arch Dermatol Res 275 (1983): 181-189.
- [79] Nestle FO., Nickoloff BJ. Role of dendritic cells in benign and malignant lymphocytic infiltrates of the skin. Dermatol Clin Exp Dermatol 12 (1994): 271-282.
- [80] Nickoloff BJ. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? J Clin Invest 104 (1999): 1161-1164.
- [81] Funk J., Langeland T., Schrupf E., Hanssen LE. Psoriasis induced by interferon-alpha. Br J Dermatol 125 (1991): 463-465.
- [82] Lande R., Gregorio J., Facchinetti V. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. Nature 449 (2007): 564-569.
- [83] Buchau AS., Gallo RL. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. Clin Dermatol 25 (2007): 616-624.
- [84] Nestle FO., Turka LA., Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis: autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. J Clin Invest 94 (1994): 202-209.
- [85] Conrad C., Boyman O., Tonel G. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. Nat Med 13 (2007): 836-842.
- [86] Uyemura K., Yamamura M., Fivenson DF., Modlin RL., Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. J Invest Dermatol 101 (1993): 701-705.
- [87] Teunissen MB., Koomen CW., De Waal Malefyt R., Wierenga EA., Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. J Invest Dermatol 111 (1998): 645-649.
- [88] Lowes MA., Kikuchi T., Fuentes-Duculan J. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. J Invest Dermatol 128 (2008): 1207-1211.

- [89] Zheng Y., Caro I., Ouyang W. Role of cytokine therapy in the treatment of psoriasis. Drug Discovery Today 4 (2007): 25-31.
- [90] Lowes MA., Kikuchi T., Fuentes-Duculan J. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. J Invest Dermatol (2008).
- [91] Haider AS., Lowes MA., Suarez-Farinas M. Identification of cellular pathways of “type 1”, Th17 T cells, and TNF-and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. J Immunol 180 (2008): 1913-1920.
- [92] Zheng Y., Danilenko DM., Valdez P. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. Nature 445 (2007): 648-651.
- [93] Nickoloff BJ. The cytokine network of psoriasis. Arch Dermatol 127 (1991): 871-884.
- [94] Schön MP., Ruzicka T. Psoriasis: the plot thickens. Nat Immunol 2 (2001): 91.
- [95] Griffiths CEM., Voorhees JJ., Nickoloff BJ. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. J Am Acad Dermatol 20 (1989): 617-629.
- [96] Barker JNWN., Sarma V., Mitra RS., Dixit VM., Nickoloff BJ. Marked synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in regulation of keratinocytederived adhesion molecules and chemotactic factors. J Clin Invest 85 (1990): 605-608.
- [97] Robert C., Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. N Engl J Med 341 (1999): 1817-1828.
- [98] Schön MP., Zollner TM., Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. J Invest Dermatol 121 (2003): 951-962.
- [99] Butcher EC., Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. Science 272 (1996): 60-66.
- [100] Andrian von UH., Mackay CR. T-cell function and migration: two sides of the same coin. N Engl J Med 343 (2000): 1020-1034.
- [101] Ley K. Functions of selectins. Results Probl Cell Differ 33 (2001): 177-200.

- [102] Homey B., Alenius H., Müller A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. Nat Med 8 (2002): 157-165.
- [103] Goebeler M., Toksoy A., Spandau U., Engelhardt E., Bröcker EB., Gillitzer R. The C-X-C chemokine Mig is highly expressed in the papillae of psoriatic lesions. J Pathol 184 (1998): 89-95.
- [104] Campbell JJ., Haraldsen G., Pan J. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. Nature 400 (1999): 776-780.
- [105] Steinhoff M., Stinder S., Seeliger S., Ansel JC., Schmelz M., Luger TA. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Arch Dermatol 139 (2003): 1479-1488.
- [106] Raychaudhuri SP., Raychaudhuri SK. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. Prog Brain Res 146 (2004).
- [107] Schön MP., Drewniak C., Boehncke WH. Targeting selectin functions in the therapy of psoriasis. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3 (2004): 163-168.
- [108] Boehncke WH., Schön MP. Interfering with leukocyte rolling - a promising therapeutic approach in inflammatory skin disorders? Trends Pharmacol Sci 24 (2003): 49-52.
- [109] Rashmi R., Rao KSJ., Basavaraj KH. A comprehensive review of biomarkers in psoriasis. Clinical and Experimental Dermatology 34 (2009): 658-663.
- [110] Mason J., Mason AR., Cork MJ. Topical preparations for the treatment of psoriasis: a systematic review. British Journal of Dermatology 146 (2002): 351-364.
- [111] Hönigsmann H., Phototherapy for psoriasis. Clinical and Experimental Dermatology 26 (2001): 343-350.
- [112] Callen JP., Krueger GG., Lebwohl M., Mcburney EI., Mease P., Menter A., Paller AS., Pariser DM., Weinblatt M., Zimmerman G. AAD consensus statement on psoriasis therapies. Journal of American Academy of Dermatology 49 (2003): 897-899.
- [113] Mendonca CO., Burden AD. Current concepts in psoriasis and its treatment. Pharmacology Therapeutics 99 (2003): 133-147.

- [114] De Kerkhof V. Therapeutic strategies: rotational therapy and combinations. Clinical and Experimental Dermatology 26 (2001): 356-361.
- [115] Answers Corporation. Treatment psoriasis [Online]. 2009. Available from: <http://www.answers.com/topic/psoriasis> [2010, January 15]
- [116] Boehncke WH. Immunomodulatory drugs for psoriasis. BMJ 327 (2003): 634-635.
- [117] Mahé E., Saiag P., Aegerter P., Beauchet A. Shopping for psoriasis medications on the Internet. European Academy of Dermatology and Venereology 23 (2009): 1050-1055.
- [118] Amenta R., Camarda L., Di Stefano V., Lentini F., Venza F. Traditional medicine as a source of new therapeutic agents against psoriasis. Fitoterapia 71 (2000): S13-20.
- [119] Zhang H., Gu J. Progress of Experimental Study on Treatment of Psoriasis by Chinese Medicinal Monomer and Single or Compound Recipe in Chinese Materia Medica. Chin J Integr Med 13 (2007): 312-316.
- [120] Wang YN., Bi XL., Gu J. Study on the mechanism of baicalin in psoriasis treatment. Chin J Dermatovenerol Integr Tradit Med 2 (2003): 209-211.
- [121] Wai-Pui Tse., Chun-Tao Che., Ken Liu., Zhi-Xiu Lin. Evaluation of the anti-proliferative properties of selected psoriasis-treating Chinese medicines on cultured HaCaT cells. Journal of Ethnopharmacology 108 (2006): 133-141.
- [122] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65 (1983): 55-63.
- [123] Wikimedia Foundation. MTT assay [Online]. 2009. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay [2009, May 22]
- [124] Zhang SZ., Lipsky MM. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. Cell Biology and toxicology 6 (1990): 219-234.
- [125] Thermo Scientific. Total RNA extraction [Online]. 2005. Available from: <http://www.abgene.com/productDetails.asp?prodID=60> [2009, May 22]

- [126] Fisker S., Fuglsang J., Kristensen K., Ovesen P., Orskov H., Jorgensen JO BH. Gene expression of the GH receptor in subcutaneous and intraabdominal fat in healthy females: relationship to GH-binding protein. European Journal of Endocrinology 150 (2004): 773-777.
- [127] Daniel MB., Michael DR., Stuart JE. Protein concentration Determination. Protein method (1996).
- [128] Gibthai. Western blot [Online]. 2008. Available from: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=18&page=7 [2009, May 22]
- [129] Singleton VL., Orthofer R. Analysis of total phenols and other substrate and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method in Enzymology 299 (1999): 152-178.
- [130] Shishodia S., Sethi G., Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. Ann N Y Acad Sci 1056 (2005): 206-217.
- [131] Notoya M., Nishimura H., Woo JT., Nagai K., Ishihara Y., Hagiwara H. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts. Eur J Pharmacol 534 (2006): 55-62.
- [132] Han SS., Keum YS., Seo HJ., Surh YJ. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. J Biochem Mol Biol 35 (2002): 337-342.
- [133] Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. Biochem Pharmacol 49 (1995): 1551-1556.
- [134] Sidhu GS., Singh AK., Thaloor D., Banaudha KK., Patnaik GK., Srimal RC., Maheshwari RK. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. Wound Repair Regen 6 (1998): 167-177.
- [135] Thangapazham RL., Sharma A., Maheshwari RK. Beneficial role of curcumin in skin diseases. Adv Exp Med Biol 595 (2007): 343-357.
- [136] Dujic J., Kippenberger S., Hoffmann S., Ramirez-Bosca A., Miquel J., Diaz-Alperi J., Bereiter-Hahn J., Kaufmann R., Bernd A. Low concentrations of curcumin induce growth arrest and apoptosis in skin keratinocytes only in combination with UVA or visible light. J Invest Dermatol 127 (2007): 1992-2000.

- [137] Bright JJ. Curcumin and autoimmune disease. Adv Exp Med Biol 595 (2007): 425-451.
- [138] วิทย์ เทียงบุญธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สุริยบรรณ, 2539.
- [139] Hsu MH., Kuo SC., Chen CJ., Chung JG., Lai YY., Huang LJ. 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dodecenedione (I6) induces G1 arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Leuk Res 29 (2005): 1399-1406.
- [140] Sampson JH., Raman A., Karlsen G., Navsaria H., Leigh IM. In vitro keratinocyte antiproliferant effect of *Centella asiatica* extract and triterpenoid saponins. Phytomedicine 8 (2001): 230-235.
- [141] Lee JS., Kim IS., Kim JH., Kim JS., Kim DH., Yun CY. Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response. J Ethnopharmacol 117 (2008): 34-40.
- [142] Chuakul W. Chemical study of the antiinflammatory agents from the leaves of Phayaa Plong Thong, *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. (1986).
- [143] Satayavivad J., Bunyaphatsara N., Kitisiripornkul S. Analgeric and anti-inflammatory activities of extracts of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Linda. Thai J Phytopharm 3 (1996): 7-17.
- [144] สุภาณี พิมพ์สมาน, วิไลลักษณ์ ชินะจิตฺ, ฉันทนา อารมย์ดี, สาทรร พรตระกูลพัฒน์, จริยา หาญจนวนวงศ์, พัชรวิทย์ ปั่นแห้งเพ็ชร และพิสมัย เหล่าภัทรเกษม. การศึกษาศักยภาพของพญาอเพื่อประโยชน์ทางการเกษตรและคลินิก. การสัมมนาการเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพร 46: 71-82.
- [145] Kanjanapothi D., Kaewpinit D., Rujjanawate C. Potential antidiabetic activity of Thai medicinal plants, The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress Chemicals in the 21st Century. Bangkok Thailand (1999): 164.
- [146] Thamaree S., Rugrungham K., Ruangrungsi N. The inhibitory effects of extracts of some herbal medicines on the production of proinflammatory cytokines by *in vitro* stimulated human blood cells. Thai J Pharm Sci 22 (1998): S4.
- [147] Thamaree S., Rugrungham K., Ruangrungsi N. The inhibitory effects of andrographolide and extracts of some herbal medicines on the production of

- proinflammatory cytokines by LPS-stimulated human blood cells. Chula Med J 45 (2001): 661-670.
- [148] Miettinen PJ., Berger JE., Meneses J., Phung Y., Pedersen RA., Werb Z., Derynck R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. Nature 376 (1995): 337-341.
- [149] Hunter T. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353 (1998): 583-605.
- [150] Coffey RI., Derynck R., Wilcox JN., Bringman TS., Goustin AS., Moses HL., Pittelkow MR. Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes. Nature (Lond.) 328 (1987): 817-820.
- [151] Elder JT., Fisher GJ., Lindquist PB., Bennett GL., Pittelkow MR., Coffey Jr RJ., Ellingsworth L., Derynck R., Voorhees JJ. Overexpression of transforming growth factor- α in psoriatic epidermis. Science 243 (1989): 811-814.
- [152] Oetke C., Auvinen E., Pawlita M., Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. Arch Virol 145 (2000): 2183-2191.
- [153] Tam Yuet Ye B., Finson KW., Philip A. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins Regulate Transforming Growth Factor- β signaling in Human Keratinocytes. The Journal of Biological Chemistry 278 (2003): 49610-49617.
- [154] Barker JNWN., Karabin GD., Stoof TJ., Sarma VJ., Dixit VM., Nickoloff BJ. Detection of interferon-gamma mRNA in psoriatic epidermis by polymerase chain reaction. J Dermatol Sci 2 (1991): 106-111.
- [155] Yegnanarayan R., Saraf AP., Balwani JH. Comparison of antiinflammatory activity of various extracts of *Curcuma longa* (Linn). Indian J Med Res 64 (1976): 601-608.
- [156] Satoskar RR., Shah SSG. Evaluation of antiinflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patient with postoperative inflammation. International J Clin Pharmacol, Ther Toxicol 24 (1986): 651-654.
- [157] Yu J., Fang H., Chen Y., Yao Z. Identification of the chemical components of two *Alpinia* species. Zhongyao Tongbao 13 (1988): 354-356.

- [158] Dewhirst FE. Eugenol, a prototype phenolic prostaglandin synthetase inhibitor, it's anti-inflammatory activity, it's effects on sheep vestibula. Univ Rochester (1979): 191.
- [159] PsoriasisThai. ชนิดของโรคสะเก็ดเงิน [Online]. 2008. Available from: http://www.psoriasis-thai.com/psoriasis_treat_product/ [2009, June 19]
- [160] Kondi A., Ohigashi H., Murakami A., Jiwajinda S., Koshimizu K. A potent inhibitor of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation, 1'-acetoxychavicol acetate from *Languas galanga*, a traditional Thai condiment. Biosci Biotech Biochem 57 (1993): 1344-1345.
- [161] Noro T., Sekiya T., Katoh M., Oda Y., Miyase T., Kuroyanagi M., Ueno A., Fukushima S. Inhibition of xanthine oxidase from *Alpinia galanga*. Chem Pharm Bull 36 (1998): 244-248.
- [162] Murakami A., Ohura Y., Nakamura Y., Koshimizu K., Ohigashi H. 1'-Acetoxychavicol acetate, a superoxide anion generation inhibitor, potently inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in ICR mouse skin. Oncology 53 (1996): 386-391.
- [163] Ohnishi M., Tanaka T., Makita H. Chemopreventive effect of a xanthine oxidase inhibitor, 1'-acetoxychavicol acetate, on rat oral carcinogenesis. Jpn J Cancer Res 87 (1996): 349-356.
- [164] Tanaka T., Kawabata K., Kakumoto M. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by xanthine inhibitor, 1'-acetoxychavicol acetate. Jpn J Cancer Res 88 (1995): 821-830.
- [165] Tanaka T., Makita H., Kawabata K., Mori H., Murakami A., Satoh K., Hara A., Ohigashi H., Koshimizu K. A xanthine oxidase inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis 18 (1997): 1113-1118.
- [166] Kawabata K., Tanaka T., Yamamoto T., Ushida J., Hara A., Murakami A., Koshimizu K., Ohigashi H., Stoner SD., Mori H. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis by dietary feeding of 1'-acetoxychavicol acetate. Jpn J Cancer Res 91 (2000): 148-155.

- [167] Ohata T., Fukuda K., Murakami A., Ohigashi H., Sugimura T. Inhibition by 1'-acetoxychavicol acetate of lipopolysaccharide- and interferon- γ -induced nitric oxide production through suppression of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264 cells. Carcinogenesis 19 (1998): 1007-1012.
- [168] Ito K., Nakazato T., Xian MJ., Yamada T., Hozumi N., Murakami A., Ohigashi H., Ikeda Y., Kizaki M. 1'-Acetoxychavicol Acetate Is a Novel Nuclear Factor KB Inhibitor with Significant Activity against Multiple Myeloma In vitro and In vivo. Cancer Res 65 (2005): 4417-4424.
- [169] Watanabe N., Kataoka T., Tajika T., Uramoto M., Magae J., Nagai K. 1'-Acetoxychavicol Acetate as an Inhibitor of Phagocytosis of Macrophages. Biosci Biotech Biochem 59 (1995): 1566-1567.
- [170] Sreejayan N., Rao MN. Free radical scavenging activity of curcuminoids. Arzneimittelforschung 46 (1996): 169-171.
- [171] Ahsan H., Parveen N., Khan NU., Hadi SM. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivative demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Chem Biol Interact 121 (1998): 161-175.
- [172] Espinoza RY., Muriel P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. Liver International (2009): 1457-1466.
- [173] Miquel J., Bernd A., Sempere JM. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. Arch Gerontol Geriatr 34 (2002): 37-46.
- [174] Das KC., Das CK. Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen ((1)O(2)) quencher. Biochem Biophys Res Commun 295 (2002): 62-66.
- [175] Ak T., Gül in I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chem Biol Interact 174 (2008): 27-37.
- [176] Brouet I., Ohshima H. Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. Biochem Biophys Res Commun 206 (1995): 533-540.
- [177] Kim JE., Kim AR., Chung HY. In vitro peroxynitrite scavenging activity of diarylheptanoids from *Curcuma longa*. Phytother Res 17 (2003): 481-484.

- [178] Iqbal M., Sharma SD., Okazaki Y. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. Pharmacol Toxicol 92 (2003): 33-38.
- [179] Motterlini R., Foresti R., Bassi R., Green CJ. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. Free Rad Biol Med 28 (2000): 1303-1312.
- [180] Shapiro H., Ashkenazi M., Weizman N. Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. J Gastroenterol Hepatol 21 (2006): 358-366.
- [181] Kunnumakkara AB., Anand P., Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Letters 169 (2008): 199-225.
- [182] Aggarwal BB., Surh YH., Shishodia S. The molecular targets and therapeutics of curcumin in health and disease. Advances in Experimental Medicine and Biology 995 (2007).
- [183] Bae JH., Park JW., Kwon TK. Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca^{2+} depletion and cytochrome c release. 303 (2003): 1073-1079.
- [184] Pal S., Choudhuri T., Chattopadhyay S., Bhattacharya A., Datta GK., Das T. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. 288 (2001): 658-665.
- [185] Shankar S., Chen Q., Sarva K., Siddiqui I., Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. 2 (2007): 10.
- [186] Shankar S., Srivastava RK. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferuloylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. 30 (2007): 905-918.
- [187] Woo JH., Kim YH., Choi YJ., Kim DG., Lee KS., Bae JH. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of

reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. 24 (2003): 1199-1208.

- [188] Mukhopadhyay A., Bueso-Ramos C., Chatterjee D., Pantazis P., Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. 20 (2001): 7597-7609.
- [189] Moragoda L., Jaszewski R., Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells. 21 (2001): 873-878.
- [190] Chan WH., Wu H. Anti-apoptotic affects of curcurnin on photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells. J Cell Biochem 92 (2004): 200-212.
- [191] Tencomnao T., Ronpirin C., Prasansuklab A., Poovorawan Y. Decreased EGFR mRNA expression in response to antipsoriatic drug dithranol *in vitro*. African Journal of Biotechnology 8 (2009): 3141-3146.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



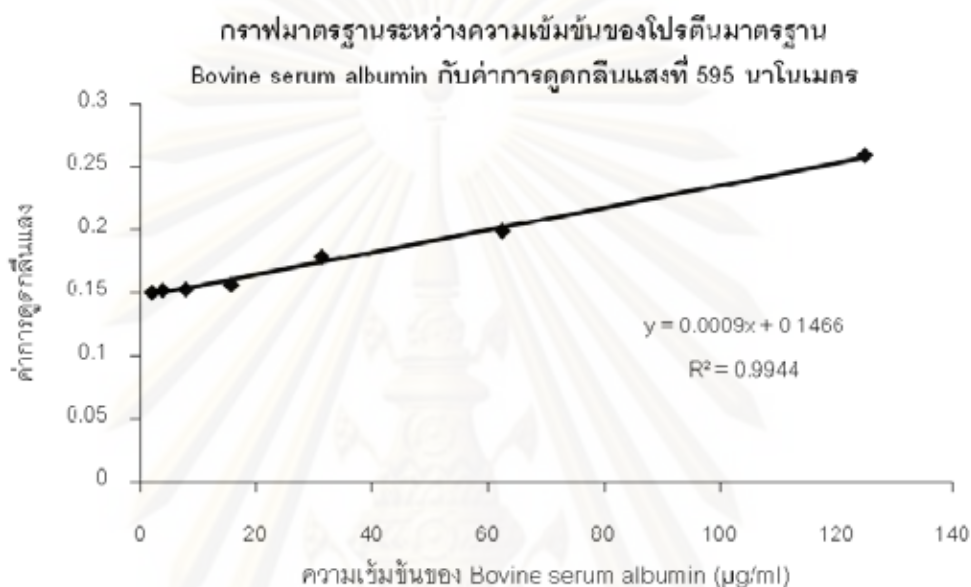
ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

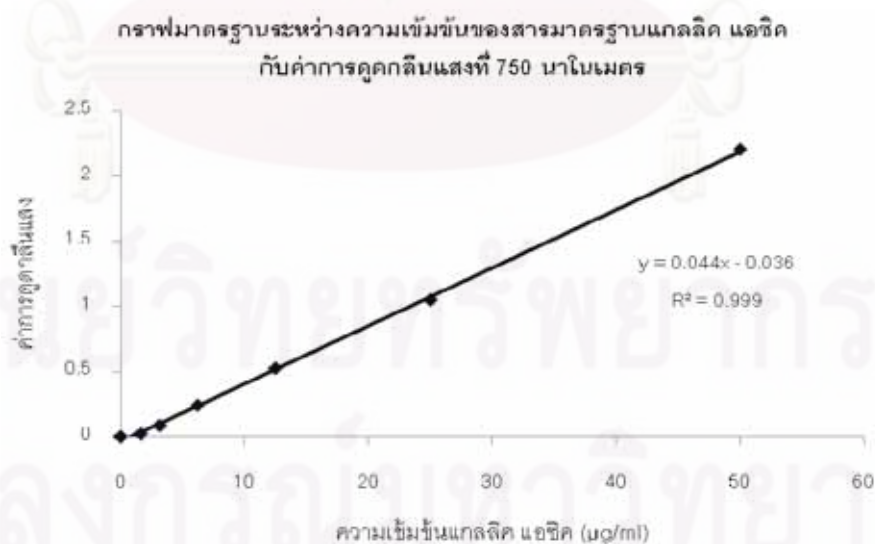
ข้อมูลจากการทดลอง

1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีนทั้งหมดใน cell lysate



ทำการทดสอบสารโปรตีนมาตรฐานทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดปริมาณโปรตีน

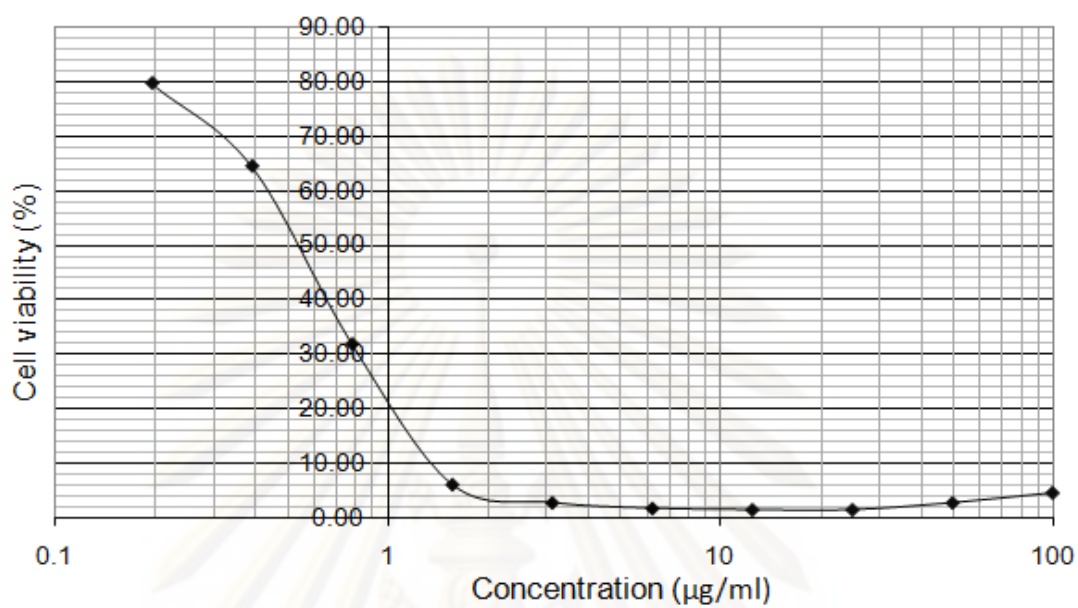
2. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณปริมาณประกอบฟีนอลในสารสกัดสมุนไพรไทย



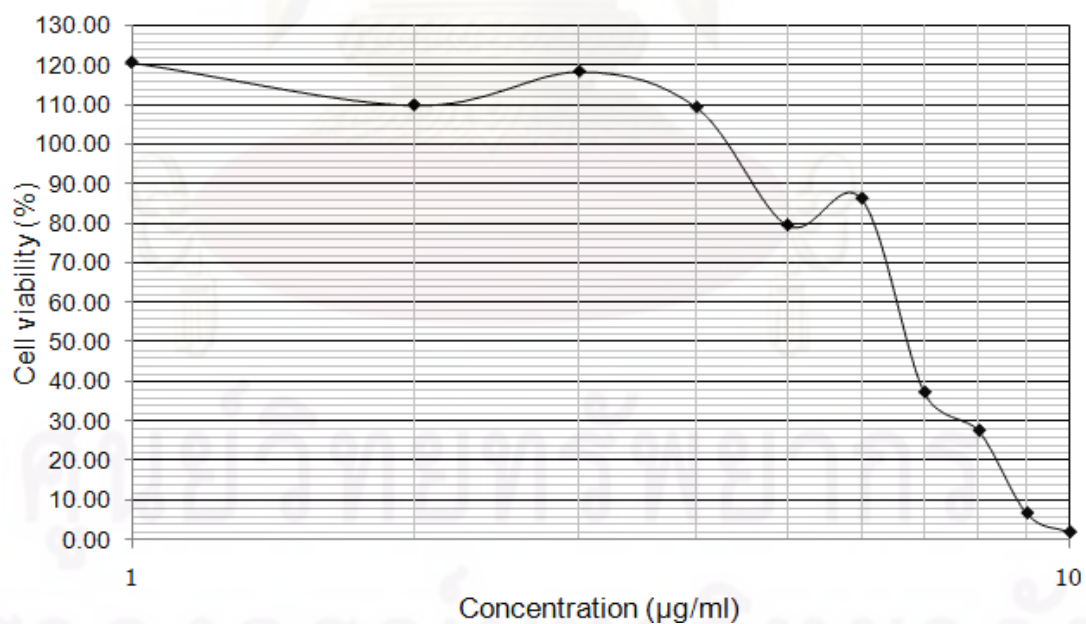
ทำการทดสอบสารมาตรฐานแกลลิก แอซิด

ทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอล

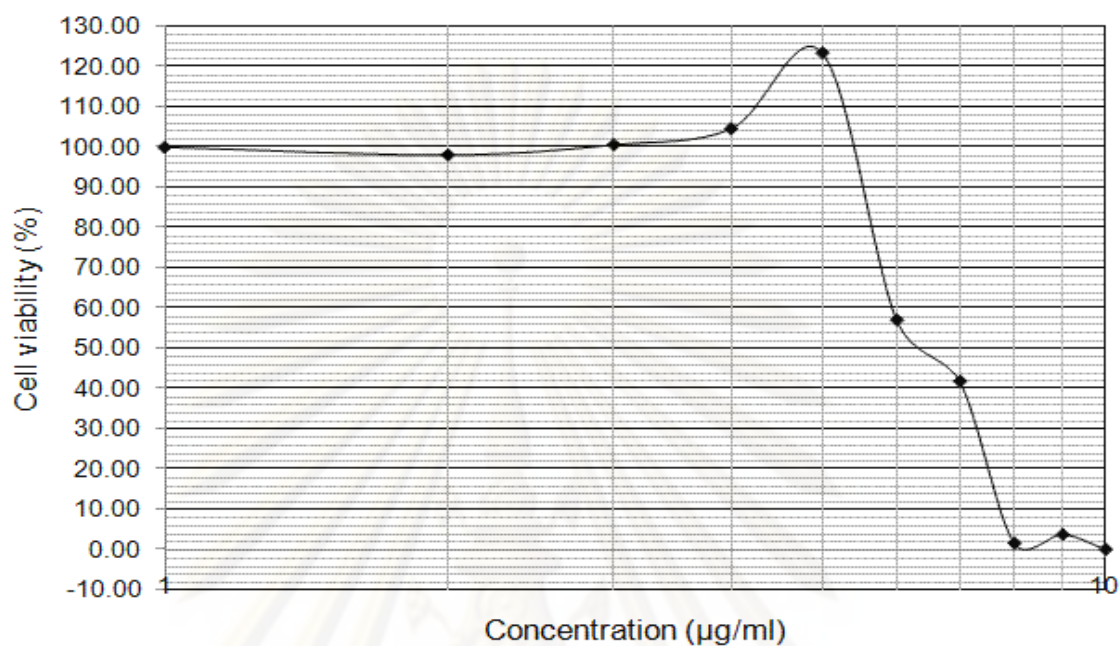
3. กราฟดอกการิทึมสำหรับหาค่า IC_{50} ของ dithranol



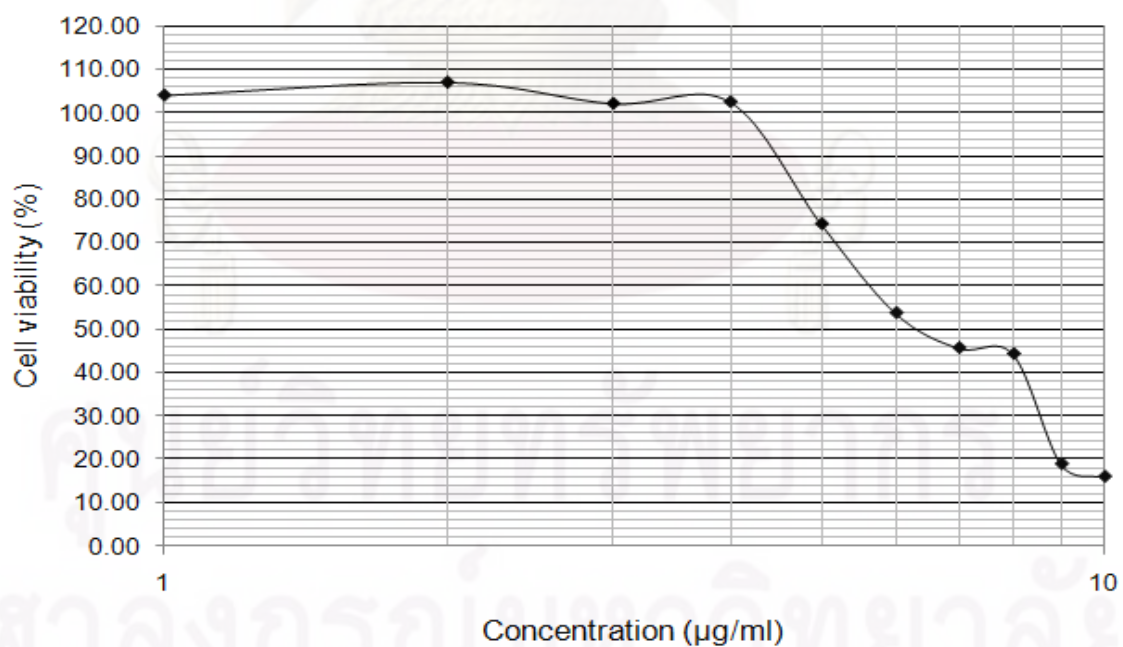
4. กราฟดอกการิทึมสำหรับหาค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรขมิ้น



5. กราฟดอกการิทึมสำหรับหาค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรข้าว



6. กราฟดอกการิทึมสำหรับหาค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรน้อยหน่า



ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพรไทยจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระรัตนราชสุตาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง

Collector Number	Herbarium Number	Scientific Name	Vernacular Name	Common Name	Family
Visa Thongrakard 1	013396 (BCU)	<i>Curcuma longa</i> L.	ขมิ้นชัน ขมิ้น	Turmeric	Zingiberaceae
Visa Thongrakard 2	013397 (BCU)	<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	ข่า		Zingiberaceae
Visa Thongrakard 3	013398 (BCU)	<i>Punica granatum</i> L. var. <i>granatum</i>	ทับทิม		Punicaceae
Visa Thongrakard 4	013399 (BCU)	<i>Annona squamosa</i> L.	น้อยหน่า	Custard apple, Sugar apple, Sweet sop	Annonaceae
Visa Thongrakard 5	013400 (BCU)	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	บัวบก	Asiatic pennywort	Umbelliferae
Visa Thongrakard 6	013401 (BCU)	<i>Sapindus rarak</i> DC.	มะค่าดีควาย	Soap nut tree	Sapindaceae
Visa Thongrakard 7	013402 (BCU)	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	ผักคาวตอง พลุคาว		Saururaceae
Visa Thongrakard 9	013404 (BCU)	<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz	ทองพันชั่ง		Acanthaceae
Visa Thongrakard 10	013405 (BCU)	<i>Clinacanthus nutans</i> (Burm.f.) Lindau	พญาปล้องทอง เสลดพังพอนตัวเมีย		Acanthaceae
Visa Thongrakard 11	013406 (BCU)	<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	ชุมเห็ดเทศ	Candelabra bush, Ringworm bush	Leguminosae- Caesalpinioideae
Visa Thongrakard 12	013407 (BCU)	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	ขิง	Ginger	Zingiberaceae

2. ค่าที่ได้จากการทดสอบสารสกัดสมุนไพรขมิ้น ข่าและน้อยหน่า กับเซลล์ HaCaT ภายหลังจากการถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เพื่อตรวจวัดผลของสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่าง ๆ ตารางที่ 2 ค่าการอยู่รอดของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay

สารสกัดสมุนไพร	ขมิ้น	ข่า	น้อยหน่า
ไม่ได้รับสารสมุนไพร	100	100	100
ตัวทำละลาย DMSO 0.1 เปอร์เซ็นต์	88.92 \pm 16.72 (<i>P</i> = 0.996)	88.92 \pm 16.72 (<i>P</i> = 0.996)	88.92 \pm 16.72 (<i>P</i> = 0.996)
ตัวทำละลาย DMSO 0.01 เปอร์เซ็นต์	114.97 \pm 5.93 (<i>P</i> = 0.860)	114.97 \pm 5.93 (<i>P</i> = 0.860)	114.97 \pm 5.93 (<i>P</i> = 0.860)
ความเข้มข้นที่ 0.1953125 μ g/ml	120.86 \pm 11.35 (<i>P</i> = 0.733)	99.90 \pm 10.07 (<i>P</i> = 1.000)	104.19 \pm 10.39 (<i>P</i> = 1.000)
ความเข้มข้นที่ 0.390625 μ g/ml	110.03 \pm 10.66 (<i>P</i> = 0.988)	97.98 \pm 12.98 (<i>P</i> = 1.000)	107.19 \pm 7.27 (<i>P</i> = 0.998)
ความเข้มข้นที่ 0.78125 μ g/ml	118.56 \pm 5.93 (<i>P</i> = 0.728)	100.50 \pm 11.92 (<i>P</i> = 1.000)	102.30 \pm 6.89 (<i>P</i> = 1.000)
ความเข้มข้นที่ 1.5625 μ g/ml	109.51 \pm 14.92 (<i>P</i> = 0.998)	104.49 \pm 5.93 (<i>P</i> = 1.000)	102.69 \pm 10.72 (<i>P</i> = 1.000)
ความเข้มข้นที่ 3.125 μ g/ml	79.64 \pm 10.41 (<i>P</i> = 0.728)	123.35 \pm 8.13 (<i>P</i> = 0.544)	74.48 \pm 12.28 (<i>P</i> = 0.538)
ความเข้มข้นที่ 6.25 μ g/ml	86.41 \pm 9.42 (<i>P</i> = 0.907)	56.99 \pm 6.94 (<i>P</i> = 0.168)	53.89 \pm 7.45 (<i>P</i> = 0.140)
ความเข้มข้นที่ 12.5 μ g/ml	37.33 \pm 4.41 (<i>P</i> = 0.082)	41.77 \pm 12.30 (<i>P</i> = 0.065)	45.81 \pm 3.24 (<i>P</i> = 0.120)
ความเข้มข้นที่ 25 μ g/ml	27.64 \pm 1.70 (<i>P</i> = 0.073)	1.55 \pm 0.97* (<i>P</i> = 0.042)	44.41 \pm 1.41 (<i>P</i> = 0.123)
ความเข้มข้นที่ 50 μ g/ml	6.74 \pm 0.86* (<i>P</i> = 0.046)	3.69 \pm 2.79* (<i>P</i> = 0.041)	18.96 \pm 2.40 (<i>P</i> = 0.056)
ความเข้มข้นที่ 100 μ g/ml	1.95 \pm 1.15* (<i>P</i> = 0.042)	0.00 \pm 1.27* (<i>P</i> = 0.039)	16.05 \pm 8.95* (<i>P</i> = 0.029)

ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง

* % Viability ลดระดับลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *P* < 0.05

ตารางที่ 3 ค่าการอยู่รอดของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยตรวจสอบด้วยวิธี NR assay

สารสกัดสมุนไพร	ขมิ้น	ข่า	น้อยหน่า
ไม่ได้รับสารสมุนไพร	100	100	100
ตัวทำละลาย DMSO 0.1 เปอร์เซ็นต์	87.47 ± 9.73 (P = 0.163)	87.47 ± 9.73 (P = 0.798)	87.47 ± 9.73 (P = 0.214)
ตัวทำละลาย DMSO 0.01 เปอร์เซ็นต์	94.27 ± 7.64 (P = 0.169)	94.27 ± 7.64 (P = 0.990)	94.27 ± 7.64 (P = 0.135)
ความเข้มข้นที่ 0.1953125 µg/ml	77.82 ± 4.77 (P = 0.300)	67.09 ± 3.89 (P = 0.165)	54.22 ± 6.71 (P = 0.131)
ความเข้มข้นที่ 0.390625 µg/ml	80.07 ± 10.96 (P = 0.506)	80.68 ± 7.35 (P = 0.371)	50.80 ± 4.44 (P = 0.155)
ความเข้มข้นที่ 0.78125 µg/ml	92.87 ± 3.67 (P = 0.891)	89.17 ± 0.00 (P = 0.638)	44.98 ± 6.93 (P = 0.091)
ความเข้มข้นที่ 1.5625 µg/ml	55.77 ± 3.82 (P = 0.108)	75.80 ± 15.31 (P = 0.714)	43.17 ± 5.60 (P = 0.106)
ความเข้มข้นที่ 3.125 µg/ml	21.01 ± 7.34 (P = 0.045)	87.90 ± 9.01 (P = 0.851)	53.41 ± 5.26 (P = 0.151)
ความเข้มข้นที่ 6.25 µg/ml	85.80 ± 5.00 (P = 0.505)	70.70 ± 13.51 (P = 0.548)	58.84 ± 3.83 (P = 0.209)
ความเข้มข้นที่ 12.5 µg/ml	67.06 ± 3.12 (P = 0.174)	26.75 ± 5.40 (P = 0.036)	58.03 ± 7.14 (P = 0.148)
ความเข้มข้นที่ 25 µg/ml	59.87 ± 6.51 (P = 0.090)	1.27 ± 1.27 (P = 0.073)	47.39 ± 8.18 (P = 0.087)
ความเข้มข้นที่ 50 µg/ml	9.79 ± 6.24 (P = 0.016)	1.27 ± 0.00 (P = 0.081)	34.14 ± 8.22 (P = 0.053)
ความเข้มข้นที่ 100 µg/ml	6.87 ± 9.72 (P = 0.065)	0.42 ± 1.47 (P = 0.070)	0.80 ± 6.38 (P = 0.034)

ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง

* % Viability ลดระดับลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

ภาคผนวก ข

น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. MTT assay

1. MTT stock solution reagents 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

MTT dye 5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm เพื่อให้ปราศจากเชื้อ และแยกตะกอนเล็ก ๆ ที่ยังละลายไม่ได้ออก เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. สารละลายสำหรับละลายตะกอน formazan

100 % DMSO

2. Neutral red accumulation assay

1. Neutral red reagents 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Neutral red dye 4 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm เก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส

เมื่อจะใช้ให้เจือจาง Neutral red reagents (อัตราส่วน 1:40) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM/High glucose) ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นที่ 1500 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เพื่อตกตะกอนคริสตัลที่ไม่ละลาย เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

2. Washing solution สำหรับ NR

37% Formaldehyde	6.5	มิลลิลิตร
10% CaCl ₂	50	มิลลิลิตร
H ₂ O	445	มิลลิลิตร

3. Lysis solution สำหรับ NR

Garcial Acetic acid	4.75	มิลลิลิตร
95% Ethanol	250	มิลลิลิตร
H ₂ O	245	มิลลิลิตร

3. RT-PCR

1. RNase free water

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ลงในขวด duran ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Diethylpyrocarbonate (DEPC) ลงไป 100 ไมโครลิตร (0.01%) ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง autoclave เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4. Bradford assay

1. Bradford stock solution (5X) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

95% Ethanol	100	มิลลิลิตร
85% Phosphoric acid	200	มิลลิลิตร
Serva Blue G	350	มิลลิกรัม

เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2. Bradford working buffer (1X) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Distilled water	425	มิลลิลิตร
95% Ethanol	15	มิลลิลิตร
85% Phosphoric acid	30	มิลลิลิตร
Bradford stock solution	30	มิลลิลิตร

กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5. Nonodet-P40 (NP-40) lysis buffer

NP-40 buffer	Final concentration	Volume (100 ml)
4 M NaCl	150 mM	3.75 ml
1M Tris, pH 8.0	50 mM	5 ml
100% NP-40	1%	1 ml
Milli Q water		90.25 ml
** 100 mM DTT (M.W 154.25)	100 mM	1 ml
*** 100 mM PMSF (M.W 174.19)	100 mM	1 ml

** ละลายใน Milli Q water เดิมก่อนใช้ สามารถเตรียม และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

*** ละลายใน Isopropanol เดิมก่อนใช้ และเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น (คงตัวที่ 30 นาที)

6. การเตรียม polyacrylamide gel

6.1 เตรียม 15% separating gel ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (สำหรับ 1 เจล) ตามสูตรดังนี้

Milli Q water	1.1	มิลลิลิตร
30% acrylamide mix 37.5:1 (Bio-Rad)	2.5	มิลลิลิตร
1.5 M Tris, pH 8.8	1.3	มิลลิลิตร
10% SDS	0.05	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate (APS) *	0.05	มิลลิลิตร
TEMED *	0.002	มิลลิลิตร

* เตรียมเมื่อพร้อมประกอบเจลเท่านั้น เนื่องจากเป็นสารที่ทำให้เจลแข็งตัว

6.2 เตรียม 5% stacking gel ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (สำหรับ 1 เจล) ตามสูตรดังนี้

Milli Q water	2.1	มิลลิลิตร
30% acrylamide mix 37.5:1 (Bio-Rad)	0.5	มิลลิลิตร
1.0 M Tris, pH 6.8	0.38	มิลลิลิตร
10% SDS	0.03	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate (APS) *	0.03	มิลลิลิตร
TEMED *	0.003	มิลลิลิตร

* เตรียมเมื่อพร้อมประกอบเจลเท่านั้น เนื่องจากเป็นสารที่ทำให้เจลแข็งตัว

7. การเตรียม 1X Running buffer (pH 8.75) ปริมาตร 1 ลิตร เก็บที่ 25 องศาเซลเซียส

25 mM Tris	3.03	กรัม
192 mM Glycine	14.42	กรัม
0.1% SDS	1	กรัม
Milli Q water ให้ครบ 1 ลิตร		

8. การเตรียม 1X Transfer buffer (pH 8.75) ปริมาตร 1 ลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

25 mM Tris	3.03	กรัม
192 mM Glycine	14.42	กรัม
20% Methanol	200	มิลลิลิตร
Milli Q water ให้ครบ 1 ลิตร		

9. การเตรียม 1X TBS-Tween 20 หรือ TBS-T ปริมาตร 1 ลิตร เก็บที่ 25 องศาเซลเซียส

20 mM Tris – HCl, pH 7.5	2.42	กรัม
150 mM NaCl	8.76	กรัม
1% Tween-20 *	1	มิลลิลิตร
Milli Q water ให้ครบ 1 ลิตร		

* เติมห่อนใช้

10. การเตรียม blocking buffer (5% non-fat dry milk) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมห่อนใช้

non-fat dry milk	5	กรัม
TBS-T ให้ครบ 100 มิลลิลิตร		

11. การเตรียมสีย้อมเจด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (สำหรับ 1 เจล) เก็บที่ 25 องศาเซลเซียส

สี Coomassie brilliant blue G	0.1	กรัม
100% Methanol	50	มิลลิลิตร
Milli Q water	40	มิลลิลิตร
Acetic acid (เติมหลังน้ำเสมอ)	10	มิลลิลิตร

12. Destain solution ปริมาตร 1 ลิตร เก็บที่ 25 องศาเซลเซียส

100% Methanol	120	มิลลิลิตร
Milli Q water	810	มิลลิลิตร
Acetic acid (เติมหลังน้ำเสมอ)	70	มิลลิลิตร

13. Folin Ciocalteu's Phenol assay

1. Folin Ciocalteu's Phenol Reagent

10% Reagent

1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 9 ส่วน

2. Sodium carbonate (Na_2CO_3)1 M Na_2CO_3 5.2995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
กรองตะกอนออกก่อนใช้

3. Gallic acid standard stock solution

0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
แบ่งใส่หลอด เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์ คำย่อ และคำอธิบาย

คำย่อ	คำอธิบาย
°C	องศาเซลเซียส
OD	การดูดกลืนแสง (optical density)
%	เปอร์เซ็นต์
/	per
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	micro (10^{-6})
μ l	microlitre
Abs	Absorbance
AP-1	Activation protein-1
bp	Base pairs
BMP	Bone morphogenetic protein
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gram

GSH	Glutathione
HaCaT	Human keratinocyte cell line (HaCaT)
IC50	Inhibitory Concentration at 50%
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFNs	Interferon
ILs	Interleukin
LDL	Low-density lipoprotein
LIF	Leukaemia inhibitory factor
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Milligram
ml	Millilitre
MAPK	Mitrogen-activated protein kinase
MRP	Migration inhibitory factor-related protein
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole)
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
NF-kB	Nuclear factor kappa B
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
PACAP	Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PGP	Protein gene product
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>P</i>	<i>P</i> -value
PBS	Phosphate Buffered Saline

pH	Negative logarithm of the hydrogen ion concentration
ROS	Reactive oxygen species
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
S.E.M	Standard Error of Mean
SKALP	Skin-derived antileucoproteinase
SP	Substance P
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGase K	Transglutaminase type 1
TNF	Tumor Necrosis Factor
TGF	Tumor growth factor
U	Unit
VIP	Vasoactive intestinal
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
v / v	Volume by volume
w / v	Weight by volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิสาข์ ทองระกาศ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2550 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย