

ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะกดเงินต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ
การเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์



นางสาวฐิติพร จารีกเสวีสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of Thai herbal extracts containing anti-psoriatic activity on expression of proteins
involved in cellular proliferation, differentiation and apoptosis



Miss Thitiporn Charueksereesakul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
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

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ด้านโรคสะกดเงินต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์

โดย

นางสาวสุติพร จารึกเสรีสกุล

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

.....
(อาจารย์ ดร.ศิริพร ช้อชวาลกุล)

.....
(ดร.ณัฐริกา แสงกฤษ)

ฐิติพร จารึกเสรีสกุล : ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์. (Effects of Thai herbal extracts containing anti-psoriatic activity on expression of proteins involved in cellular proliferation, differentiation and apoptosis) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทวิณ เทนคำเนา 122 หน้า.

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังอักเสบชนิดหนึ่งที่หนังกำพร้าแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว และยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด จึงทำให้ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ อีกทั้งการรักษานั้นทำให้เกิดผลข้างเคียงเป็นอย่างมาก สมุนไพรไทยจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาโรคนี้ ดังนั้น จึงศึกษาผลของสมุนไพรไทยที่พบมีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินก่อนหน้านี ได้แก่ ข่า, ขมิ้น และน้อยหน่า ซึ่งสกัดด้วยเอทานอล ต่อการแสดงออกของโปรตีน EGFR, Id1, G1P3, Caspase 9 และ E2A ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ใน Human keratinocyte cells (HaCaT) ซึ่งนับเป็น *In vitro* model ของโรคสะเก็ดเงินด้วยวิธี Western blot จากนั้นศึกษาการแสดงออกโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญด้วยเทคนิค Immunocytochemistry และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์ พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 3.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 6.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และลดการแสดงออกของโปรตีน EGFR และ Id1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 1.575 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 3.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 6.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากใบน้อยหน่ามีฤทธิ์ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน เพื่อลดการแบ่งเซลล์ผิวหนัง เพิ่มการแปรรูปของเซลล์ และเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ซึ่งน่าจะเป็นกลไกต้านโรคสะเก็ดเงิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....เคมีคลินิก..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2553.....

5277204037 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : Psoriasis / Thai herbal extracts / Proteins / HaCaT

THITIPORN CHARUEKSEREESAKUL: EFFECTS OF THAI HERBAL
EXTRACTS CONTAINING ANTI-PSORIATIC ACTIVITY ON EXPRESSION OF
PROTEINS INVOLVED IN CELLULAR PROLIFERATION, DIFFERENTIATION
AND APOPTOSIS. ADVISOR : ASST.PROF. TEWIN TENCOMNAO, Ph.D.,
122 pp.

Psoriasis is a chronic inflammatory disease characterize by hyperproliferative keratinocytes. The causes of this disease are unclear, and many side effects are evident as a result of certain treatments of psoriasis. In this work, we aimed at studying the effect of each of these following Thai herbal extracts, *Alpinia galangal* L.(Rhizome), *Curcuma longa* L.(Rhizome) and *Annona squamosa* L.(Leaf), previously proven to contain anti-psoriatic activity, on the expression of protein in cellular proliferation, differentiation and apoptosis including EGFR, Id1, G1P3, Caspase 9 and E2A. The HaCaT keratinocyte cell line was chosen as an *in vitro* model. Western blot was performed to assess protein levels, and immunocytochemistry with confocal microscopy was used in order to evaluate the protein levels if significant difference was found using western blot. We found ethanolic extracts from *Annona squamosa* significantly increased the expression of active form of caspase 9 at concentrations of 3.15 µg/ml and 6.3 µg/ml ($P < 0.05$) and significant decreased the expression of EGFR and Id1 proteins at concentrations of 1.575 µg/ml, 3.15 µg/ml and 6.3 µg/ml ($P < 0.05$). This suggests that the *Annona squamosa* leaf ethanolic extracts mediate alterations in protein levels to reduce proliferation, promote differentiation and increase apoptosis, which might be a mechanism of anti-psoriasis.

Department : ...Clinical Chemistry..... Student's Signature

Field of Study : Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Advisor's Signature

Molecular Medicine

Academic Year : 2010.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาว์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยชี้แนะ และให้คำปรึกษา ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงาน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ศิริพร ชี้อชวาตกุล และ ดร.ณัฐฐิภา แสงกฤษ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ รวมทั้ง หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิก และอนุทางการแพทย์ ซึ่งให้ทุนการศึกษา และทุนอุดหนุนผู้ช่วยสอนในตลอดระยะเวลาในการศึกษาที่นี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2554 ระดับปริญญาโท ด้านการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ซึ่งให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี รวมทั้ง โครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจัย ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้ใช้เครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ นางสาววิสาข์ ทองระกาศ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สแกนภาพที่ใช้ในการศึกษา รวมทั้งพี่ๆเพื่อนๆ และน้องๆที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
โรคสะเก็ดเงิน.....	4
สาเหตุของการเกิดโรคสะเก็ดเงิน.....	8
การรักษาโรคสะเก็ดเงิน.....	11
สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน.....	14
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตาย	
แบบอะพอพโทสิสของเซลล์.....	20
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย.....	29
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	30
การเตรียม Cell culture เพื่อใช้ในการศึกษา.....	35
การนำเซลล์ HaCaT มาทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรไทย.....	35

บทที่	หน้า
การสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยการใช้ Nonidet-P40 (NP-40) lysis buffer.....	36
การวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธี Bradford Protein Assay.....	36
การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE).....	37
การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Immunoblotting).....	38
การป้องกันการเกิดการจับของโปรตีนที่ไม่จำเพาะบนแผ่นเมมเบรน (Blocking).....	39
การติดตามผล (Detection).....	40
การวิเคราะห์ผล (Analysis).....	41
การเตรียม Cell culture เพื่อใช้ในการศึกษาวิธี Immunocytochemistry.....	41
การนำเซลล์ HaCaT มาทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรไทย เพื่อใช้ในการศึกษาวิธี Immunocytochemistry.....	42
การวิเคราะห์ระดับโปรตีนด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.....	42
การวิเคราะห์ผล.....	45
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะกดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ EGFR ด้วยวิธี Western blot.....	46
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะกดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ E2A ด้วยวิธี Western blot.....	53
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะกดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ Id1 ด้วยวิธี Western blot.....	59
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะกดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ G1P3 ด้วยวิธี Western blot.....	65
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะกดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ Caspase 9 ด้วยวิธี Western blot.....	71
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะกดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ EGFR ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.....	79

บทที่	หน้า
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ Id1 ด้วยวิธีImmunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.....	82
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ Caspase 9 ด้วยวิธีImmunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.....	85
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	88
รายการอ้างอิง.....	95
ภาคผนวก.....	111
ภาคผนวก ก.....	112
ภาคผนวก ข.....	113
ภาคผนวก ค.....	117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	122

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การเปรียบเทียบระหว่างผิวหนังปกติ และผิวหนังที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน.....	4
2.2	ลักษณะของ Plaque psoriasis.....	5
2.3	ลักษณะของ Guttate psoriasis.....	6
2.4	ลักษณะของ Flexural psoriasis.....	6
2.5	ลักษณะของ Pustular psoriasis.....	7
2.6	ลักษณะของ Erythrodermic psoriasis.....	7
2.7	สารสำคัญในขา.....	15
2.8	สารสำคัญในขมื่น.....	17
2.9	สารสำคัญในน้อยหน้า.....	19
2.10	โครงสร้างของ Epidermal growth factor receptor (EGFR).....	20
2.11	EGFR signaling pathway.....	21
2.12	EGFR signaling pathway โดยผ่านทาง Jun pathway.....	23
2.13	การเกิด Apoptosis โดยผ่านทาง Death-receptor pathway และ Mitochondrial pathway.....	24
2.14	กลไกการทำงานของ Id-1 ใน Cell proliferation signaling pathways.....	26
2.15	กลไกการทำงานของ Id-1 ในกระบวนการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์.....	27
2.16	กลไกการทำงานของ E2A.....	28
3.1	เซลล์ผิวหนัง HaCaT (Human keratinocyte cell line).....	29
3.2	Microplate Reader.....	37
3.3	การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล (SDS-PAGE).....	38
3.4	การถ่ายโอนโปรตีนจากแผ่นเจลสู่แผ่นเมมเบรน.....	39
3.5	การติดตามผลด้วยวิธี Two steps detection.....	40
3.6	Chemiluminescent detection.....	41
3.7	Immunocytochemistry.....	43
3.8	หลักการของกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยเลเซอร์.....	44

ภาพที่	หน้า
4.29 ผลการแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อ กับสารสกัดฆ่าจากตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี Western blot.....	76
4.30 กราฟผลการแสดงผลการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบ กับสารสกัดไขมันจากตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี Western blot.....	77
4.31 โปรตีนตัวอย่างที่นำมาแยกบน SDS-PAGE แล้วนำไปย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue G.....	78
4.32 ผลการแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT เมื่อ ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.	80
4.33 ผลการแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบ กับสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.	83
4.34 ผลการแสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อ ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์.	86
5.1 กลไกการทำงานของ EGFR เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดน้อยหน้า.....	89
5.2 กลไกการทำงานของ Id1 เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดน้อยหน้า.....	90
5.3 กลไกการทำงานของ Caspase 9 เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดน้อยหน้า.....	91
5.4 กลไกการทำงานของ EGFR เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดฆ่าหรือไขมัน.....	92
5.5 กลไกการทำงานของ Caspase 9 เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดน้อยหน้า.....	93

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่ง ซึ่งมักพบผื่นของโรคมีลักษณะเป็นตุ่มหรือปื้นสีแดงขุยสีขาวคล้ายเงิน โดยโรคนี้พบร้อยละ 1-3 ของประชากรโลก ซึ่งสามารถพบได้ในทุกเพศทุกวัย แต่จะพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงอายุ 25-45 ปี (1) สาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้เกิดโรคนี้ยังไม่แน่ชัด แต่มีหลายปัจจัยที่สามารถเป็นสาเหตุของโรคได้ อาทิ เช่น พันธุกรรม, ระบบภูมิคุ้มกัน และสิ่งแวดล้อม (2) และเป็นโรคที่ไม่สามารถทำการรักษาโรคให้หายขาดได้ ทำให้ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ, การทำงาน และสุขภาพชีวิต ซึ่งส่งผลใกล้เคียงกับโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคซึมเศร้า, โรคความดันโลหิตสูง, โรคหัวใจ และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (3) โดยขึ้นกับความรุนแรง และบริเวณที่เกิดโรคซึ่งจะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ในประเทศไทยสถิติของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินของสถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เฉพาะผู้ป่วยนอกพบว่าโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยเป็นลำดับที่ 6 ในปี 2552 มีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจำนวน 2,196 ราย และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นในอนาคต (4) ซึ่งพบว่าร้อยละ 40 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินสามารถพัฒนาไปเป็นโรคไขข้ออักเสบจากโรคสะเก็ดเงิน (Psoriatic arthritis) และร้อยละ 5 นั้นจะเป็นโรคไขข้ออักเสบชนิดรุนแรง จนนำไปสู่ความพิการได้ในที่สุด (5) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตสังคม และเศรษฐกิจที่ตามมาได้ ในด้านการรักษานั้นต้องวางแผนระยะยาว และรักษาอย่างต่อเนื่องเพื่อป้องกันการกำเริบของโรค แต่ยาที่ใช้มีผลข้างเคียงค่อนข้างมาก (6) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญในเรื่องนี้จึงประสงค์ที่จะนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านโรคสะเก็ดเงินในระดับโปรตีน ด้วยการใส่เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Human keratinocyte cells (HaCaT) ซึ่งนับเป็น *In vitro* model ของโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งสารสกัดสมุนไพรนั้นประกอบไปด้วยสารสกัดข่า (ส่วนของเหง้า และแห้ง), สารสกัดขมิ้นชัน (ส่วนของเหง้า) และสารสกัดน้อยหน่า (ส่วนของใบ) หากผู้วิจัยประสบความสำเร็จในโครงการวิจัยนี้ สมุนไพรไทยอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินที่ปลอดภัย มีประสิทธิภาพ และราคาถูกรักษาด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรไทยของข่า, น้อยหน่า และขมิ้นชันที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในการต้านโรคสะเก็ดเงินในการแสดงออกของโปรตีนของโปรตีน EGFR, Caspase 9, G1P3, Id1 และ E2A ด้วยวิธี Western blot
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรไทยของข่า, น้อยหน่า และขมิ้นชันที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในการต้านโรคสะเก็ดเงินในการแสดงออกของโปรตีนที่มีการเพิ่มขึ้น หรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (Human keratinocyte cell line [HaCaT]) โดยเป็นการศึกษาแบบ *In vitro* model ซึ่งจะทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของข่า, ขมิ้น และน้อยหน่า ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง และสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลในการต้านโรคสะเก็ดเงิน โดยได้รับมาจากการศึกษามาก่อนหน้านี้ของคุณวิสาข์ ทองระภาค โดยทำการประเมินผลจากฤทธิ์การต้านทานในการแสดงออกทางโปรตีนของ E2A, Id-1, EGFR, G1P3 และ Caspase 9 ในเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนังมนุษย์ (Human keratinocyte cell line [HaCaT]) ซึ่งเป็นการศึกษาในลักษณะของ *in vitro* model

ข้อจำกัดของการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการทดสอบสมุนไพรต่อการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้เป็นสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extracts) อีกทั้งยังเป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์เท่านั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจกลไกของการเกิดโรคสะกดเงินได้อย่างแท้จริง
2. สามารถนำสารสกัดสมุนไพรไปสกัดเป็นยา หรือใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคสะกดเงินได้ เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาโรค และไม่เกิดผลข้างเคียงหรือเกิดผลข้างเคียงน้อยที่สุดในการใช้รักษาโรค
3. ตีพิมพ์ผลงานโครงการวิจัยครั้งนี้ ในวารสารระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้องได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ หรือระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับชาติ หรือ ระดับนานาชาติ



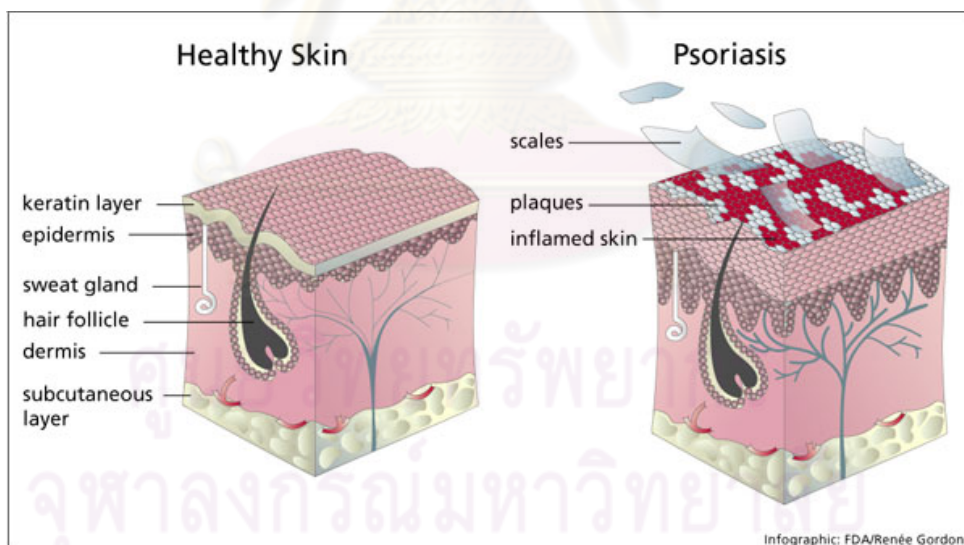
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคสะเก็ดเงินหรือโรคเรื้อนขาว เป็นโรคผิวหนังเรื้อรังที่เซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยไม่ทราบสาเหตุ จนทำให้บริเวณนั้นมีผิวหนังหนาตัวขึ้น (7) ลักษณะรอยโรคที่พบโดยทั่วไปนั้นจะมีผื่นสีแดงหนา และนูนขึ้นมีขอบเขตชัดเจน และมีขุยสีเทาเงินเกิดขึ้น แต่ในบางรายก็ไม่เกิดอาการที่ผิวหนัง โดยสะเก็ดที่เกิดขึ้นนั้นเรียกว่า psoriatic plaque บริเวณที่พบบ่อยคือ ผิวหนังของข้อศอก และหัวเข่า แต่ก็สามารถพบได้ที่ศีรษะ, ฝ่ามือ, ฝ่าเท้า และอวัยวะสืบพันธุ์อีกด้วย บางครั้งอาจพบการอักเสบของข้อที่เรียกว่า psoriatic arthritis (8, 9) ซึ่งพบร้อยละ 30 ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และร้อยละ 5 สามารถพัฒนาไปเป็นโรคไขข้ออักเสบชนิดรุนแรง จนนำไปสู่ความพิการได้ในที่สุด (10)



ภาพที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างผิวหนังปกติ และผิวหนังที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน

ที่มา: <http://www.nature-remedy.com/articles/natural-remedies/psoriasis>.

การแบ่งชนิดของโรคสะเก็ดเงิน (9)

เป็นการแบ่งโดยขึ้นอยู่กับอาการของโรคที่เกิดขึ้น

1. Plaque psoriasis (psoriasis vulgaris) เป็นโรคสะเก็ดเงินที่พบบ่อยที่สุด ซึ่งพบ 80-90 % ของผู้ป่วย โดยอาการนั้นจะมีอัตราการตกสะเก็ดของผิวหนังจากการอักเสบสูง และเกิดขุยสีขาวเงินในบริเวณรอยโรคของผิวหนัง ซึ่งจะเรียกบริเวณนั้นว่า Plaque มักพบในบริเวณที่มีการเสียดสี เช่น ศีรษะ ไหล่ หลัง สะโพก ข้อศอก หัวเข่า หน้าแข้ง ข้อเท้า ฝ่ามือและฝ่าเท้า



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของ Plaque psoriasis

ที่มา: <http://psoriasispictures.net>

2. Guttate psoriasis พบได้บ่อยในวัยเด็กหรือวัยรุ่น ลักษณะที่พบบนนั้นจะเป็นผื่นขนาดเล็ก ประมาณ 1 เซนติเมตร สีชมพู หรือสีแดง ลักษณะคล้ายหยดน้ำจำนวนมากตามร่างกาย โดยลักษณะผื่นไม่หนาตัวเหมือนกับประเภท plaque กระจายอยู่ทั่วตัว พบบ่อยตามหลังการเกิดการติดเชื้อสเตรปโตค็อกคัสบริเวณคอ (streptococcal throat infections) ต่อมน้ำลายอักเสบ (tonsillitis) ความเครียด การได้รับบาดเจ็บที่บริเวณผิวหนังและการได้รับการรักษาด้วยยาบางชนิด เช่นยาต้านมาลาเรีย



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะของ Guttate psoriasis

ที่มา: <http://www.pam.org.mt/psoriasispictures.htm>.

3. Flexural psoriasis (inverse psoriasis) เป็นประเภทที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่มีน้ำหนักตัวมาก ลักษณะที่พบคือ ผื่นสีแดงอ่อน ราบเรียบ และวาวแสง บริเวณที่พบบ่อยคือ อวัยวะสืบพันธุ์ รักแร้, ข้อพับต่างๆ, หน้าท้อง และหน้าอก ซึ่งจะทำให้เกิดการระคายเคืองจากการเสียดสี และเหงื่ออาจนำไปสู่การติดเชื้อราได้



ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะของ Flexural psoriasis

ที่มา: <http://www.pam.org.mt/psoriasispictures.htm>.

4. Pustular psoriasis เป็นประเภทที่พบได้ในวัยผู้ใหญ่ โดยจะพบเป็นตุ่มหนองเล็กๆที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ ซึ่งผิวหนังภายใต้หนองนั้นมีสีแดง และอ่อนนุ่ม มักพบเฉพาะที่ เช่น ฝ่ามือ ฝ่าเท้า ปลายนิ้วมือ ปลายนิ้วเท้า หรือกระจายทั่วทั้งตัว โดยอาจมีสาเหตุมาจากยาบางชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดงา การก่อความระคายเคือง การสัมผัสสังกะสีเป็นเวลานาน ภาวะ

ตั้งครรภ์ การใช้ยาประเภทสเตียรอยด์ การติดเชื้อ ความเครียด หรือการหยุดใช้ยารักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างกะทันหัน ผู้ป่วยบางรายถึงแม้ว่าตุ่มหนองพุพองจะแห้งแล้ว แต่ก็สามารถกลับมาเป็นตุ่มหนองพุพองใหม่ได้อีก เรียกผู้ป่วยประเภทนี้ว่า Zumbusch pustular psoriasis



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะของ Pustular psoriasis

ที่มา: <http://www.medindia.net/patients/patientinfo/Psoriasis-Symptoms-and-signs.htm>.

5. Erythrodermic psoriasis เป็นประเภทที่พบบได้น้อยที่สุด ซึ่งเป็นการเกิดการอักเสบเป็นรอยกว้าง และผิวหนังเป็นเกล็ดที่หลุดลอกออกมา ทำให้เกิดการคันอย่างรุนแรง เกิดการบวม และปวด อัตรการเต้นของหัวใจสูงขึ้นและอุณหภูมิของร่างกายขึ้น ๆ ลง ๆ โดยชนิดนี้สามารถเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ พบว่ามีสิ่งกระตุ้นหลายประเภทที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินประเภทนี้ เช่น การหยุดใช้ยารักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างกะทันหัน การแพ้ยา การแพ้แสงแดดอย่างรุนแรง การติดเชื้อ รวมทั้งการได้รับยาบางชนิด เช่น ลิเทียม ยารักษาโรคมาลาเรียและยารักษาโรคสะเก็ดเงินประเภทโคลทาร์ (coal tar)



ภาพที่ 2.6 แสดงลักษณะของ Erythrodermic psoriasis

ที่มา: <http://www.medindia.net/patients/patientinfo/Psoriasis-Symptoms-and-signs.htm>.

2.2 สาเหตุของการเกิดโรคสะเก็ดเงิน

สาเหตุของการเกิดโรคสะเก็ดเงินนั้นยังเข้าใจได้ไม่แน่ชัดนัก แต่มี 2 สมมติฐานเกี่ยวกับการพัฒนาของโรค สมมติฐานแรกคือ ส่วนใหญ่เกิดจากการเติบโตของเซลล์ผิวหนังที่มาก โดยพบที่ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า และ Keratinocytes สมมติฐานที่ 2 คือ เกิดจากความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน T cell ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ ไปยังชั้นหนังแท้ และเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งของ cytokine (Tumor necrosis factor-alpha) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบ และการผลิตเซลล์ผิวหนังที่รวดเร็ว อย่างไรก็ตามโรคสะเก็ดเงินอาจมีปัจจัยต่าง ๆ กระตุ้นการเกิดโรคดังนี้

1. ปัจจัยทางพันธุกรรม (Genetic factor)

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่มีส่วนที่ถ่ายทอดมาจากกรรมพันธุ์ โดยมีหลายยีนเข้ามาเกี่ยวข้อง แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงการทำงาน ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับระบบทางภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ major histocompatibility complex (MHC) และ T cell (11) จาก Classic genomewide linkage analysis มีการพิสูจน์ 9 บริเวณบนโครโมโซมที่แตกต่างกัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน โดยโรคนี้ยอมรับตั้งแต่ 1 ถึง 9 (PSORS1-PSORS9) ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องมากมาย โดยส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกับกระบวนการที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ไปก็อาจทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงินขึ้นมาได้ (11) ซึ่งตำแหน่งที่ 1(PSORS1) พบว่า 35-50% นั้นสามารถถ่ายทอดได้ โดยยีนจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน หรือเกี่ยวกับโปรตีนที่พบบนผิวหนังในโรคสะเก็ดเงิน ซึ่ง PSORS 1 เป็นตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 9 บน MHC ซึ่งควบคุมกระบวนการสำคัญของการทำงานในระบบภูมิคุ้มกัน (12,13) ซึ่ง 3 ยีนที่สำคัญใน PSORS 1 นั้นเกี่ยวข้องกับ psoriasis vulgaris

คือ HLA-C variant HLA-CW6 ซึ่งจะ encode โปรตีน MHC class 1 CCHCR 1 variant WWC จะ encode โปรตีนซึ่งจะแสดงออกมากใน psoriatic epidermis และ CDSM variant allele 5 ซึ่งจะแสดงออกชั้นหนังกำพร้า และควบคุมการเพิ่มขึ้นของโรคสะเก็ดเงิน (11) โดยมี 2 ยีนหลักที่อยู่ภายใต้การสำรวจคือ IL12B บนโครโมโซม 5q ซึ่งจะแสดงออกของ IL12B และ IL23R บนโครโมโซม 1q ที่จะแสดงออก IL23 receptor และเกี่ยวข้องกับ T cell differentiation ซึ่ง T cell เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งเป็นกระบวนการที่นำไปสู่การเกิดโรคสะเก็ดเงินอีกด้วย (12)

2. ปัจจัยทางระบบภูมิคุ้มกัน (Immunological factors)

ในโรคสะเก็ดเงินนั้น เซลล์ทางภูมิคุ้มกันเคลื่อนย้ายจากชั้นหนังแท้ไปยังชั้นหนังกำพร้า โดยไปกระตุ้นเซลล์ผิวหนัง Keratinocytes ให้เกิดการแบ่งตัว ซึ่งโรคนี้ไม่เหมือนกับ autoimmune disease โดยตรงในโรค autoimmune นั้น ระบบภูมิคุ้มกันคิดว่า แอนติเจนของร่างกายเป็นสิ่งแปลกปลอม จึงเกิดการจับแล้วทำลาย แต่ในโรคสะเก็ดเงินนั้น การเกิดการอักเสบไม่ได้เกิดจากแอนติเจน โดยไม่มีการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกัน นักวิจัยพบว่า เซลล์ภูมิคุ้มกันมากมาย และสัญญาณจากสารเคมี เป็นสาเหตุที่เกิดการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของโรคสะเก็ดเงิน (14) การเปลี่ยนแปลงทางระบบภูมิคุ้มกันของโรคสะเก็ดเงิน ได้แก่

2.1 Antigen presenting cell และ T cell interaction

ในปัจจุบันเชื่อว่า T cell เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน โดยจะพบ T cell ในชั้นหนังแท้ก่อนผู้ป่วยจะเริ่มเกิดผื่น จากการศึกษาค้นคว้า T cell จากผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน พบว่า ส่วนใหญ่จะมีการแสดงออกของ activated molecule HLA-DR, CD25 (IL-2R) และ CD27 แต่กลไกในการเกิดโรค โดยเริ่มต้นจากแอนติเจนยังไม่เป็นที่แน่ชัด อาจเกิดจากสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกในร่างกาย หรือสารจากภายในร่างกาย เมื่อเกิด antigen presenting cell ซึ่งเสนอแอนติเจนต่อ T cell แล้ว จะเกิดการรับรู้ผ่านทางสัญญาณ 2 อย่างคือ สัญญาณที่ 1 เกิดจาก keratinocyte หรือ antigen presenting cell ที่แสดง MHC-I หรือ MHC-II นำเสนอแอนติเจนต่อ T cell receptor ที่ผิว T cell และสัญญาณที่ 2 เกิดจากการใช้ co-stimulatory molecules เช่น ICAM-1, VCAM-1 และ B7 บน antigen presenting cell หรือ keratinocyte โดยการนำเสนอแอนติเจนต้องเกิดสัญญาณที่ 1 และสัญญาณที่ 2 ร่วมกัน จึงจะเกิดสัญญาณกระตุ้น T cell อย่างสมบูรณ์ เมื่อการนำเสนอแอนติเจนสมบูรณ์แล้ว T cell receptor จะส่งสัญญาณต่อผ่านเข้าไปใน

นิวเคลียสของ T cell เกิด DNA transcription และผลอื่นๆตามมา เช่น หลังไซโตไคน์ และการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ T cell (8, 15,16)

2.2 ไซโตไคน์

Th1 cell ที่ถูกกระตุ้น และเพิ่มจำนวน จะหลั่ง type 1 cytokine เช่น IFN- γ , TNF- α , IL2, IL12, IL20 และหลั่ง pro-inflammatory cytokine และคีโมไคน์อื่นๆด้วย เช่น IL1 β , TGF- α , IL6, IL8 และ GM-CSF โดยที่ IL8 นั้น จะดึงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ TNF- α และ IFN- γ จะทำให้เซลล์หลอดเลือดหลั่ง adhesion molecules ต่างๆ เพื่อช่วยดึง T cell มาเพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดการอักเสบ และการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดบริเวณผิวหนังที่เกิดโรค และในขณะเดียวกันไซโตไคน์บางชนิด ก็ยังกระตุ้นเซลล์ผิวหนังให้แบ่งตัวเพิ่มขึ้น เกิดการหนาตัวของผิวหนังบริเวณเกิดโรค (17,18)

2.3 Keratinocyte

จากการศึกษาเซลล์ผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน พบว่า Epidermal cell cycle จะลดลงจาก 311 ชั่วโมง เหลือเพียง 36 ชั่วโมง และมี involucrin และ transglutaminase activity เกิดเร็วกว่าปกติ ซึ่งแสดงถึงความผิดปกติในกระบวนการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังอีกด้วย (17, 19)

2.4 Endothelial cell

ในโรคสะเก็ดเงินพบว่า เซลล์บุผนังหลอดเลือด มีการหลั่ง Adhesion molecules ต่างๆ เช่น ICAM-1, VCAM-1 และ E-selectin ซึ่งจะช่วยดึง T cell และนิวโทรฟิลล์ออกนอกหลอดเลือดเข้ามาในผิวหนังเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการอักเสบ และยังพบว่า TNF- α และ IFN- γ เป็นไซโตไคน์ที่เพิ่มขึ้นในผื่นของโรคสะเก็ดเงิน จะสามารถเพิ่มการแสดงออกของ adhesion molecules บน endothelial cell และ TGF- α กระตุ้น keratinocyte ให้หลั่ง VEGF ทำให้เกิด Vascular hyperpermeability และ angiogenesis ตามมาอีกด้วย (20-22)

2.5 เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (Neutrophils)(23-25)

ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะพบนิวโทรฟิลล์รวมอยู่เป็นกลุ่มในชั้น Stratum corneum โดยเชื่อว่าเป็นผลมาจากการหลั่งไซโตไคน์จาก activated T cell โดย TNF- α และ IFN- γ ทำให้มีการหลั่ง adhesion molecules มากขึ้น มีผลให้นิวโทรฟิลล์เคลื่อนออกนอกหลอดเลือดได้ง่ายขึ้น

3. ยา (Drug)

กลไกการออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ยับยั้ง Beta-adrenergic อาจส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า และลด cyclic AMP บริเวณชั้นหนังกำพร้า (26) นอกจากนี้การใช้ลิเทียมอาจชักนำให้เกิดการหลั่งไฮโดรโคโรนที่ชักนำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวถูกกระตุ้นและเคลื่อนตัวมาสะสมอยู่บริเวณผิวหนัง (18)

4. การติดเชื้อ (Infection)

ในปี 2000 Owen และคณะรายงานว่า การติดเชื้อสเตรปโตค็อกคัสบริเวณทางเดินหายใจส่วนบนเป็นเวลานานอาจชักนำให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อเอชไอวีอาจกระตุ้นให้เกิดโรคสะเก็ดเงินหรือส่งผลให้ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีอาการที่รุนแรงขึ้น (27)

2.3 การรักษาโรคสะเก็ดเงิน

ในปี 2008 FDA (Food and drug Administration) ได้แนะนำ 3 ขั้นตอนในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน เนื่องจากผื่นสะเก็ดเงินมีหลายรูปแบบ ดังนั้นการรักษาจึงแตกต่างกันไป จำแนกตามชนิด และความรุนแรงของผื่น โดยการรักษาเริ่มจากขั้นตอนที่ 1 เมื่อไม่ได้ผลก็หันไปรักษาด้วยขั้นตอนที่ 2 ละขั้นตอนที่ 3 ตามมา (28-30)

1. การใช้ยาทาเฉพาะที่ (28-30) เป็นยาที่ใช้รักษาผื่นโรคสะเก็ดเงินที่ใช้บ่อยที่สุด

1.1 ยาทาสเตียรอยด์ เหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่เป็นน้อยจนถึงปานกลาง จะช่วยลดการอักเสบของผิวหนัง (31, 32)

1.2 Coal Tar มีกลไกการออกฤทธิ์ คือ ช่วยลดการสร้างดีเอ็นเอในชั้นหนังกำพร้า ลดอาการอักเสบ และลดการคัน โดยนิยมใช้รักษาขุยของโรคสะเก็ดเงิน แต่ไม่นิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจาก มีกลิ่นเหม็น และดูสกปรกเวลาใช้ อีกทั้งอาจทำให้เกิดการระคายเคืองได้ เมื่อนำไปใช้ทาบริเวณใบหน้า ข้อพับ และอวัยวะเพศ ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้คือ รูขุมขนอักเสบ ผื่นหนังระคายเคือง และทำให้โรคผิวหนังอักเสบรุนแรงมากขึ้น (33-36)

1.3 Calcipotriene มีกลไกการออกฤทธิ์คือ ช่วยยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง ลดการอักเสบของผิวหนัง และทำให้การแปรรูปของเซลล์กลับสู่ภาวะปกติ โดยไม่แนะนำให้ใช้ที่ใบหน้า เนื่องจากอาจเกิดการระคายเคืองได้ แต่ยังเป็นยาที่นิยมใช้ในปัจจุบันเนื่องจาก

ให้ผลการรักษาดีพอกับยาสเตียรอยด์ แต่ไม่มีผลเสียเหมือนกับสเตียรอยด์ แต่มีราคาแพง และมีผลข้างเคียงได้ เช่น ผิวหนังระคายเคือง และทำให้เกิด hypercalcemia ได้ (37)

1.4 Anthralin (Dithranol) กลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อกันว่าการสร้างดีเอ็นเอ และการแบ่งตัวของเซลล์ โดยเป็นยาที่นิยมใช้มากที่สุดชนิดหนึ่งด้วย เนื่องจากยาใช้แล้วได้ผลดี และโรคกลับเป็นซ้ำได้น้อย เมื่อหยุดการรักษา แต่มีผลข้างเคียงของยา คือ มีการระคายเคืองผิวหนัง และเปราะบางเป็นสะเก็ดผ้าได้ อีกทั้งทำให้เกิดรอยโรค และผิวหนังมีสีคล้ำขึ้น จึงไม่ควรใช้ทาบริเวณใบหน้า ข้อพับ และอวัยวะเพศ (38-40)

2. The xtrac velocity excimer laser system เป็นการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ปล่อยออกมา โดยมีความเข้มข้นสูงมาใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินในชั้นปานกลางถึงรุนแรงได้

2.1 Ultraviolet light A (PUVA) เป็นการรักษา โดยวิธีการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเอ ร่วมกับการใช้ยา psoralen เพื่อช่วยให้ผิวหนังไวต่อแสง โดยจะได้ผลประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ แต่มีผลข้างเคียงคือ ทำให้ผิวหนังแก่เร็ว และมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง อีกทั้งยังมีอาการคลื่นไส้ คัน แดง และอาการไหม้ของผิวหนัง เมื่อทำการรักษา โดยผู้ป่วยจะต้องได้รับการรักษาสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ประมาณ 20-30 ครั้ง

2.2 Ultraviolet light B (UVB) เป็นการรักษาโดยวิธีการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตบี จะได้ผลประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ผลข้างเคียงคือ อาการคัน แดง หรือไหม้ของผิวหนัง แต่ก็มีข้อจำกัดในการรักษา คือ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินต้องมารักษาที่โรงพยาบาลประมาณ 3-5 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 2-3 เดือนติดต่อกัน หลังจากนั้นรักษา 1-2 ครั้งต่อสัปดาห์ เพื่อให้โรคสงบ (29, 35)

3. การให้ยารับประทาน

3.1 Methotrexate มีกลไกการออกฤทธิ์คือ ช่วยยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง โดยยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอ ลดการอักเสบ และปรับภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยยานี้เป็นยาที่นิยมใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินที่เป็นรุนแรง โดยเฉพาะชนิด Erythrodermic และ Pustular ซึ่งเป็นยาที่ได้ผลดี ราคาไม่แพง แต่มีผลข้างเคียงคือ ปวดศีรษะ เป็นไข้หนาวสั่น คันตามผิวหนัง ลมพิษ ผื่น ร่วง มีแผลในปาก คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ทำให้เกิดตับอักเสบ และตับแข็งได้ เกิดความผิดปกติทางไต ปัสสาวะเป็นเลือด กระเพาะปัสสาวะอักเสบ การสร้างไขกระดูกผิดปกติ ประจำเดือน

ผิดปกติ และไวต่อแสงแดด จึงห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ และให้หมบนบุตร ผู้ป่วยโรคตับแข็ง โรคไต โรคกระเพาะ โรคเบาหวาน โรคเลือด โรควัณโรค โรคตับอักเสบ ผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน และผู้ที่มีประวัติดื่มเหล้าจัด (41, 42)

3.2 Retinoids มักใช้ได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับยาทาสเตียรอยด์ โดยใช้รักษาโรคสะเก็ดเงินที่หนังศีรษะ และเล็บ โดยช่วยยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง ลดการอักเสบ และทำให้การแปรรูปของเซลล์ผิวหนังกลับสู่ภาวะปกติ แต่มีผลข้างเคียงคือ เยื่อบุจุกแห้ง ตาแห้ง ผม่วง ผิวแห้ง เล็บเปราะ ตับอักเสบ ไชมันในเลือดสูง ปวดกล้ามเนื้อ และทำให้ทารกพิการผิดปกติ จึงห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ และให้หมบนบุตร ผู้ที่มีไขมันในเลือดสูง ผู้ที่เป็นโรคตับ และโรคไต (43, 44)

3.3 Cyclosporine ใช้ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินที่เป็นรุนแรง และไม่ตอบสนองต่อการรักษาอื่น โดยจะช่วยยับยั้งภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งยานี้ใช้ได้ผลดีมาก แต่เนื่องจากมีการเกิดซ้ำได้สูง หลังจากหยุดยา และมีผลข้างเคียงคือ มีผลต่อไต เพิ่มการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะที่ผิวหนัง การไ้ชยาเป็นระยะเวลานาน ทำให้มีโอกาสติดเชื้อ Human papilloma virus มากขึ้น ระบบทางเดินอาหารผิดปกติ ขนยาวผิดปกติ เหงือกบวม ปวดศีรษะ และเวียนศีรษะ จึงห้ามใช้ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง และผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (45-48)

จากสมมติฐานที่ได้กล่าวมานั้น ยังขาดกลไกที่ชัดเจนในการเกิดโรคสะเก็ดเงิน ทำให้ไม่สามารถรักษาให้หายขาดจากโรคได้ อีกทั้งการรักษาในระยะยาวยังพบกับปัญหาเรื่องของการดื้อยา และอาการข้างเคียงต่างๆที่ตามมาหลังได้รับการรักษา (49) จึงได้มีการพัฒนาการรักษา โดยการใช้สมุนไพรในการออกฤทธิ์เพื่อช่วยรักษาโรคสะเก็ดเงิน เช่น *Radix Peucedani*, *Ramulus Visci*, *Folium Ginkgo*, *Radix Astragali*, *Radix Phytolaccae* และ *Folium Notoginseng* และเมื่อไม่นานมานี้มีการนำสารสกัดสมุนไพรไทยในกลุ่มที่ใช้รักษาโรคผิวหนังในงานสาธารณสุข จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง 11 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (HaCaT) ซึ่งนิยมใช้เป็น *In vitro* model (40, 50) สำหรับการศึกษาโรคสะเก็ดเงิน พบว่าสารสกัดของขมิ้น, ข่าและน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งเซลล์ผิวหนัง ซึ่งอาจนำไปใช้ในการรักษาโรคผิวหนังได้ (51) โดยมีการแสดงออกของยีน Transforming growth factor-alpha (TGF- α) ที่ลดลง ซึ่ง TGF- α มีความสำคัญเกี่ยวกับการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง และพบมากที่บริเวณรอยโรคสะเก็ดเงิน แต่อย่างไรก็ตาม

ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิดอาจมีกลไกอื่นในการต้านโรคสะเก็ดเงิน เช่น การยับยั้ง การเกิด Proliferation, การกระตุ้น pro-apoptotic protein, pro-caspases ต่างๆ และการเกิด differentiation ของเซลล์ ซึ่งจากสมมติฐานของสาเหตุการเกิดโรคนั้นทำให้เกิดความสนใจในการศึกษาในการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคสะเก็ดเงินประกอบไปด้วยสารสกัดจากข่า ขมิ้น และน้อยหน่า

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

ข่า (Galangal) (52)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Alpinia galanga* Linn

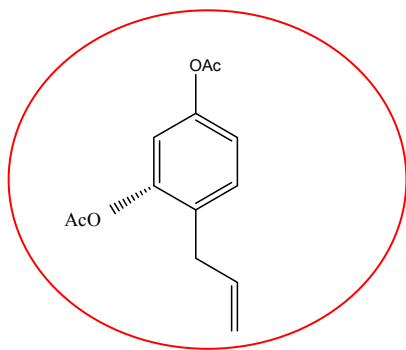
วงศ์ : ZINGIBERACEAE

ชื่ออื่นๆ : ข่าหยวก ข่าหลวง (ภาคเหนือ), กุฎกโรหิณี (ภาคกลาง)

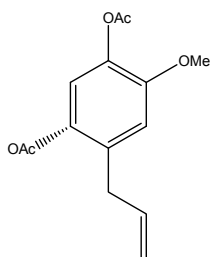
ถิ่นกำเนิด : อินเดีย พม่า ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ บอร์เนียว อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์

ข่า เป็นพืชที่มีลำต้นอยู่ใต้ดินเรียกว่า "เหง้า" อยู่ในตระกูลขิง เป็นไม้ล้มลุก เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการประกอบอาหารในประเทศไทยและอินโดนีเซีย และเป็นไม้ล้มลุกที่มีอายุยืนนานหลายปี ลำต้นลงหัวอยู่ใต้ดิน ลักษณะภายนอกของลำต้นมีข้อ และปล้องเห็นได้ชัดเจน อยู่ใต้ดินส่วนที่เหนือดิน จะเป็นก้านและใบ สูงประมาณ 1-2 เมตร พืชชนิดนี้จะเป็นที่รู้จักกัน เป็นอย่างดี เพราะได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ ในการปรุงอาหารรับประทาน

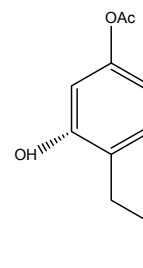
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



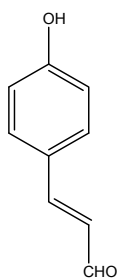
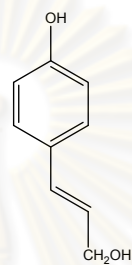
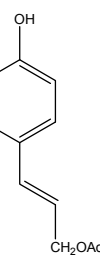
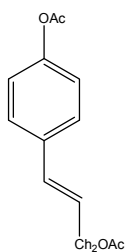
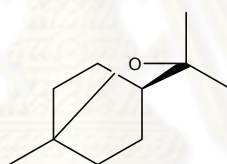
1'S'-1'-acetoxychavicol acetate



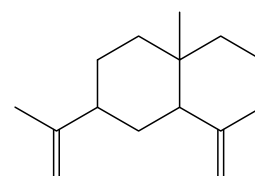
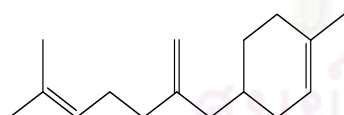
1'S'-1'-acetoxyeugenol acetate



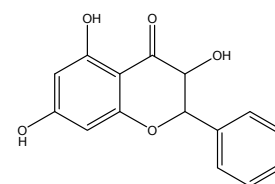
1'S'-1'-hydrotoxychavicol acetate

Trans-*p*-hydroxycinnamaldehydeTrans-*p*-coumanyl alcoholTrans-*p*-hydroxycinnamyl acetateTrans-*p*-coumanyl acetate

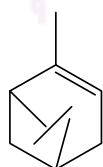
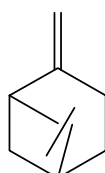
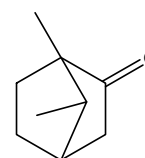
1,8- Cineole

 β -Selinene β -Bisabolone

Kaempferol



Galangin

 α -Pinene β -Pinene

Camphor

ภาพที่ 2.7 สารสำคัญในข่า

ในสารสกัดจากชาพบว่ามีสารสำคัญ ประกอบไปด้วย 1'S'-1'-acetoxychavicol acetate, 1's'-1'-acetoxyeugenol acetate, 1's'-1'-hydrotoxychavicol acetate, Trans-*p*-hydroxycinnamaldehyde, Trans-*p*-coumaryl alcohol, Trans-*p*-hydroxycinnamyl acetate, Trans-*p*-coumaryl diacetate, 1,8-Cineole, β -Selinene, β -Bisabolone, Kaemperol, Galangin, α -Pinene, β -Pinene, Camphor ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์สำคัญในส่วนของเหง้าคือ 1'S'-1'-acetoxychavicol acetate (ACA) (53) ซึ่งมีรายงานการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ที่สำคัญดังนี้ 1) ฤทธิ์ลดการอักเสบ โดยช่วยลดไซโตไคน์ที่ถูกสร้างมาจาก T helper cells (54, 55) อีกทั้งยังมีรายงานว่ามีการนำไปรักษาผู้ป่วยที่เป็น Inflammatory immune disorder (53) และในตำรับที่มีข่าเป็นส่วนประกอบจะสามารถช่วยลดการอักเสบได้ (56, 57) 2) ฤทธิ์ช่วยยับยั้งแผลในกระเพาะอาหาร (58, 59) 3) ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราโดยเฉพาะ *Microsporum gypsum*, (60-64) *Trichophyton rubrum* (62-64) และ *Trichophyton mentagrophyte* (60-64) ที่เป็นสาเหตุของโรคกลากเกลื้อน 4) ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัส คือ Epstein-Barr virus (EBV), Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) และ Human cytomegalovirus type 2 (CMV-2) (65) 5) ฤทธิ์การลดน้ำตาลในเลือด (53) 6) ฤทธิ์ลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ และหลอดเลือด โดยช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์ และฟอสโฟลิพิด (53) และช่วยเพิ่มระดับของ High density lipoprotein (HDL) (66) 7) ฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (67) และกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มฟอสเฟตของ Rb protein (Retinoblastoma protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ (67)

ขมิ้นชัน (Curcuma) (52)

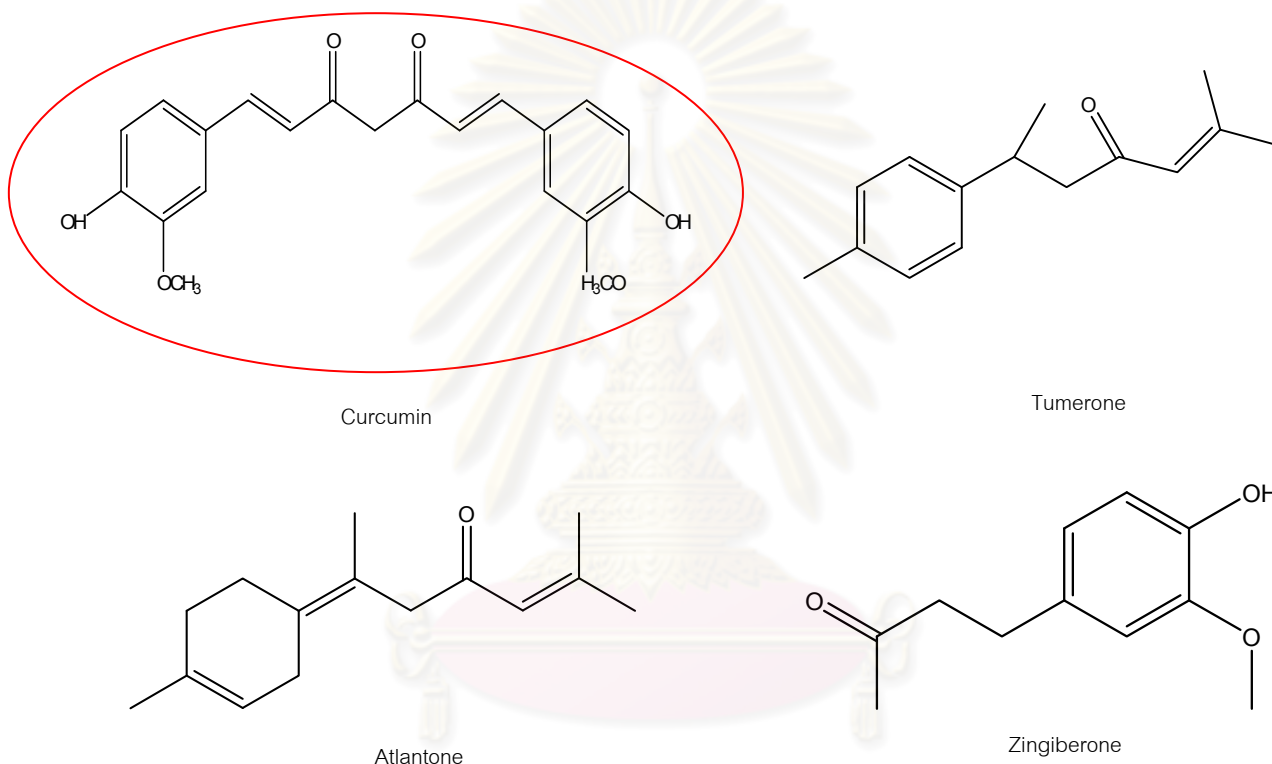
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma longa* Linn

วงศ์ : Zingiberaceae

ชื่ออื่นๆ : ขมิ้น (ทั่วไป) หมิ้น (ภาคใต้)

ขมิ้นเป็นไม้ล้มลุก อายุหลายปี สูง 30-90 เซนติเมตร เหง้าใต้ดินรูปไข่มีแขนงรูปทรงกระบอกแตกออกด้านข้าง 2 ด้าน ตรงกันข้ามเนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นเฉพาะ ใบเดี่ยวแทงออกมาเหง้าเรียงเป็นวงซ้อนทับกันรูปใบหอก กว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 30-40 เซนติเมตร

ดอกช่อแทงออกจากเหง้า แทรกขึ้นมาระหว่างก้านใบ รูปทรงกระบอก กลีบดอกสีเหลืองอ่อน ใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีนวล บานครั้งละ 3-4 ดอก ผล รูปกลมมี 3 พู เหง้าของขมิ้นมีรสฝาด กลิ่นหอม สามารถเก็บมาใช้เมื่อมีช่วงอายุ 9-10 เดือน มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ แบคทีเรีย เชื้อรา ลดการอักเสบ และมีฤทธิ์ในการขับน้ำดี น้ำมันหอมระเหย ในขมิ้นชันมีสรรพคุณบรรเทา อาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุดเสียด แก้โรคผิวหนัง ขับลม แก้ผื่นคัน แก้ท้องร่วง อาจช่วยรักษาโรค รูมาตอยด์ได้ แต่ยังไม่ยืนยันแน่ชัด



ภาพที่ 2.8 สารสำคัญในขมิ้น

ในสารสกัดจากขมิ้นพบว่ามีสารสำคัญ ประกอบไปด้วย Curcumin, Tumerone, Atlantone และ Zingiberone ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์สำคัญในส่วนของเหง้าคือ Curcumin (68) ซึ่งมียางงานการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ที่สำคัญดังนี้ 1) ฤทธิ์บรรเทาโรค multiple myeloma, มะเร็งตับอ่อน, myelodysplastic syndromes, มะเร็งลำไส้ และมาลาเรีย (69) 2) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (70) 3) ฤทธิ์ป้องกันมะเร็งปากมดลูก (71) 4) ฤทธิ์ยับยั้งการจำลองตัวเอง (Replication) ของ Herpes simplex virus-1 (HSV-1) (72) โดยการยับยั้งการ Transcription ของไวรัส 5) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยไปยับยั้ง lipid peroxidation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ

ไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์เกิดเป็น lipid peroxide ซึ่งจะเคลื่อนย้ายตัวเองออกมาจากชั้นในของเยื่อหุ้มเซลล์มาอยู่บริเวณของผิวเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้น และช่วยยับยั้งการทำลายดีเอ็นเอจากสารอนุมูลอิสระ (73) 6) ฤทธิ์ช่วยรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (74) โดยไปทำลาย β -amyloid ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ 7) ฤทธิ์เพิ่มความสามารถในการเรียน การจดจำ และช่วยลดความเครียด โดยไปมีผลต่อการสร้างเซลล์สมองใน hippocampus และ brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (75-77) 8) ฤทธิ์ลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในโรคมะเร็ง โดยไปมีผลต่อกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยเฉพาะ cyclin D1 เป็นโปรตีนที่สำคัญใน cell cycle โดยการทำงานจะมีปฏิกริยาใน Rb pathway (78) 9) ฤทธิ์การเพิ่มการตายแบบอะพอพโทสิสในเซลล์มะเร็ง โดยมีผลต่อ Bcl-2, Bcl-xL, cFlip, XIAP, c-IAP1, Caspase activation pathway (Caspase 3,8,9), tumor suppressor pathway (p53, p21) และ mitochondrial pathway (78)

น้อยหน่า (Custard apple) (52)

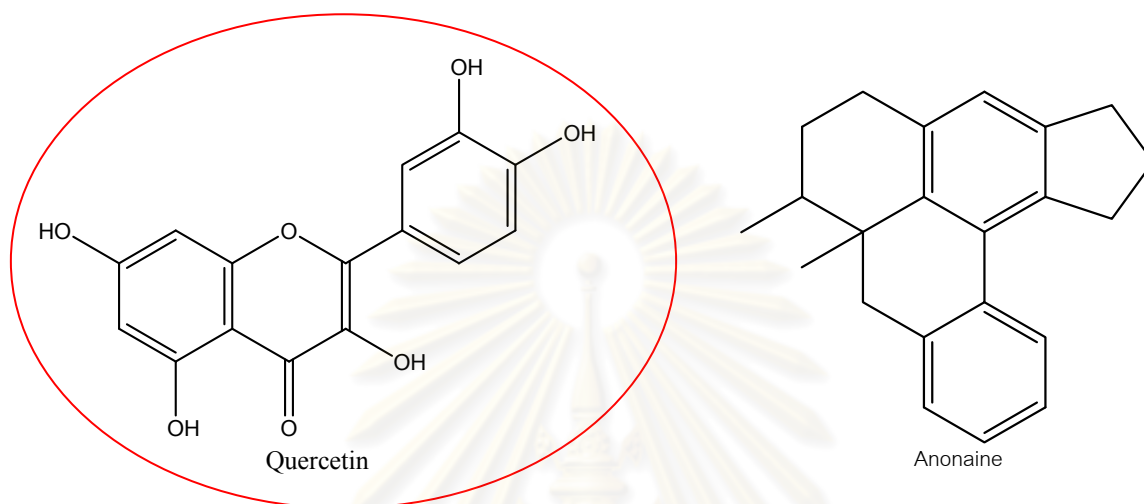
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Annona squamosa* Linn.

วงศ์ : Anonaceae

ชื่ออื่นๆ : หมักเขียบ (ตะวันออกเฉียงเหนือ), ลาหนัง (ปัตตานี), มะนอแน่, มะแน่ (เหนือ), หน่อเกล็ดแซ (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน), มะอ้อจ๋า, มะโอจ๋า (เงี้ยว-เหนือ), เตียบ (เขมร)

น้อยหน่า เป็นพืชยืนต้น ผลมีเนื้อสีขาว เมล็ดดำ รสหวาน ถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบอเมริกา กลาง และใต้ แต่จะพบอยู่ทั่วไปในเขตร้อน ในประเทศไทยปลูกมากทางภาคกลาง และใต้ แต่จะพบอยู่ทั่วไปในเขตร้อน ในประเทศไทยปลูกมากทางภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นไม้ยืนต้น สูง 3-5 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับรูปใบหอกแกมขอบขนาน กว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 7-13 เซนติเมตร ดอกเดี่ยว ออกที่ซอกใบ ห้อยลง กลีบดอกสีเหลืองแกมเขียว 6 กลีบ เรียง 2 ชั้น ๆ ละ 3 กลีบ หนาอบน้ำ มีเกสรตัวผู้และรังไข่จำนวนมาก ผลเป็นผลกลุ่ม ค่อนข้างกลม พบอยู่ทั่วไปในเขตร้อน ในประเทศไทยปลูกมากทางภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นไม้ยืนต้น สูง 3-5 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับรูปใบหอกแกมขอบขนาน กว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 7-13 เซนติเมตร ดอกเดี่ยว ออกที่ซอกใบ ห้อยลง กลีบดอกสีเหลืองแกมเขียว 6 กลีบ เรียง 2 ชั้น ๆ ละ 3 กลีบ หนาอบน้ำ มีเกสรตัวผู้และรังไข่จำนวนมาก ผลเป็นผลกลุ่ม ค่อนข้างกลม ใบสดและเมล็ดน้อยหน่า

สามารถใช้ฆ่าเหา และ โรคกลากเกลื้อน รากสามารถใช้เป็นยาระบาย ทำให้อาเจียน และแก้พิษงู ถอนพิษ เปลือกต้น จะเป็นยาแก้พิษงู แก้ฝีในลำคอ ฆ่าพยาธิ และผลแห้งสามารถแก้งูสวัด เริม และฝีในหูได้

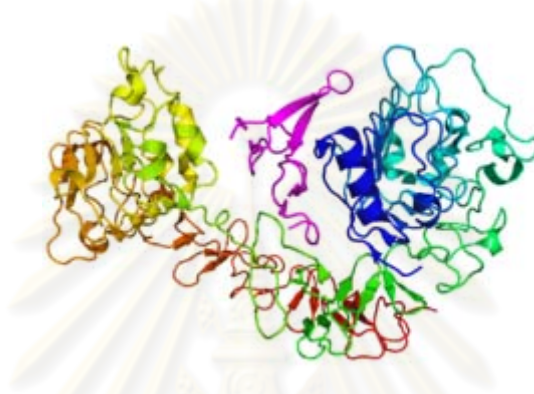


ภาพที่ 2.9 สารสำคัญในน้อยหน่า

ในสารสกัดจากน้อยหน่าพบว่ามีสารสำคัญ ประกอบไปด้วย Quercetin และ Anonaine ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์สำคัญในส่วนของใบคือ Quercetin เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระสูงมาก (79, 80) มีฤทธิ์ที่สำคัญคือ 1) ฤทธิ์ในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในเซลล์มะเร็ง (81, 82) 2) ฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง โดยลดปริมาณ p53 ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการเจริญ และการตายของเซลล์กระตุ้นการทำงานของ pro apoptosis (Bax และ Bad) ลดการทำงานของ anti apoptosis (Bcl-2 family, Bcl-xL และ Bcl-2) กระตุ้นการทำงานของ Caspase 3 โดยผ่านทาง intrinsic pathway (81, 82) 3) ฤทธิ์ป้องกันการอักเสบ และการแพ้ (83, 84) 4) ฤทธิ์ป้องกันเชื้อไวรัส (85) และแบคทีเรีย (86) 5) ฤทธิ์ป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด (87) 6) ฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันในหลอดเลือด (88) 7) ป้องกันหลอดเลือดเลี้ยงสมองอุดตัน โดยช่วยลด Low density lipoprotein (LDL) (81, 89) โดยทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ในการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ เมื่อทำการรักษาด้วยสมุนไพรไทยทั้ง 3 ชนิด โดยโปรตีนที่สนใจทำการศึกษาประกอบไปด้วย EGFR (Epidermal growth factor receptor) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Proliferation, differentiation และ

Apoptosis, Caspase-9 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Apoptosis, Interferon inducible gene 6-16 (G1P3) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Apoptosis, Id1 (Inhibitor of differentiation or DNA binding-1) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Proliferation, differentiation และ Apoptosis และ E2A protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Proliferation และ Differentiation

Epidermal growth factor receptor (EGFR; Erb-1; HER-1 ในมนุษย์)

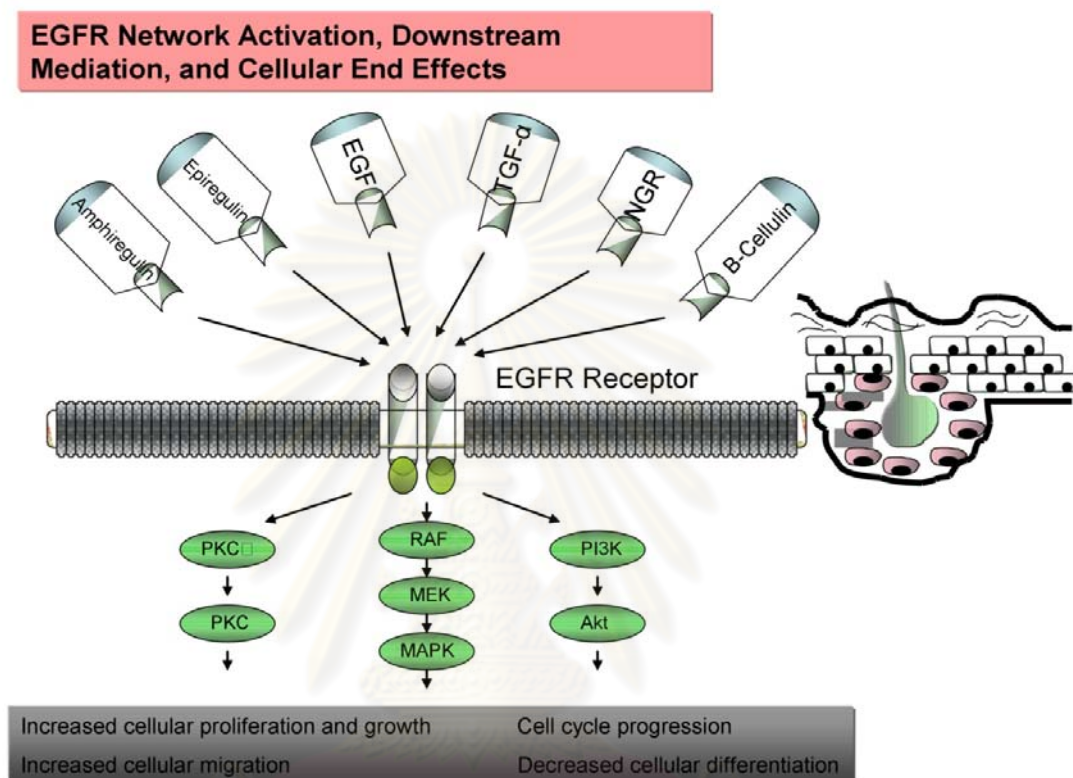


ภาพที่ 2.10 แสดงโครงสร้างของ Epidermal growth factor receptor (EGFR)

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor_receptor.

EGFR เป็นตัวรับบนผิวเซลล์ สำหรับกลุ่มของ Epidermal growth factor (EGF-family) ซึ่งเป็น ligand ของโปรตีนนอกเซลล์ โดย EGFR นั้นเป็นสมาชิกของกลุ่ม ErbB family ซึ่งประกอบไปด้วย EGFR (ErbB-1), HER-2/c-neu (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3) และ HER-4 (ErbB-4) (90) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ Receptor tyrosine kinase ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นตัวรับของ Growth factors และไซโตไคน์ (91, 92) มีโครงสร้างเป็น Single transmembrane glycoprotein ปลายด้าน Amino terminal อยู่ภายนอกเซลล์ทำหน้าที่จับกับ ligand ส่วนปลายด้าน Carboxy terminal ซึ่งอยู่ภายในเซลล์จะมี Tyrosine kinase domain และตำแหน่งที่มี tyrosine residues หลายตัวเรียงต่อกันเป็นตำแหน่งที่ถูกเติมฟอสเฟต และทำให้เกิดการส่งสัญญาณต่อไป (93) ซึ่งการทำงานของ EGFR นั้น จะทำงานก็ต่อเมื่อไปจับกับ ligand ที่จำเพาะ ซึ่งประกอบไปด้วย Epidermal growth factor (EGF) และ Transforming growth factor-alpha (TGF- α) (94) โดย EGFR dimer จะกระตุ้นการทำงานของ Protein tyrosine kinase ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการเติมฟอสเฟตของ tyrosine ในตำแหน่ง C-terminal ของ EGFR และทำให้เกิดการส่งสัญญาณเป็นทอดๆ กันไป (95) ซึ่งจะผ่านทางกระบวนการ MAPK pathway, Akt pathway และ JNK pathway ซึ่งจะทำให้เกิด

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และการเกิด cell proliferation โดยโปรตีนที่เกิดขึ้นนั้นก็จะควบคุมการเกิด cell migration, adhesion และ proliferation ซึ่งการกระตุ้นของตัวรับนั้นมีความสำคัญในเรื่องของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเซลล์ผิวหนังอีกด้วย (94, 96, 97)



ภาพที่ 2.11 แสดง EGFR signaling pathway (98)

Ras/Raf/MAPK Pathway เป็นกระบวนการหลักของ ErbB/HER family (91, 92) ผ่านทางการกระตุ้นของ EGFR และเกิด Tyrosine kinase phosphorylation เป็นลำดับขั้นตามมา โดยเกิดการจับกันของ GRB2 และ Sos (99, 100) ทำให้เกิดการ ทำงานของ Ras โดยเกิดการเติมฟอสเฟต ทำให้ Ras-GDP กลายเป็น Ras-GTP ซึ่งไปกระตุ้น Raf-1 และ MAPK-1 และ MAPK-2 (101, 102) โดยการเติมฟอสเฟตของ MAPK จะควบคุม Transcription factor ภายในนิวเคลียส ทำให้เกิด cell migration และ proliferation (103)

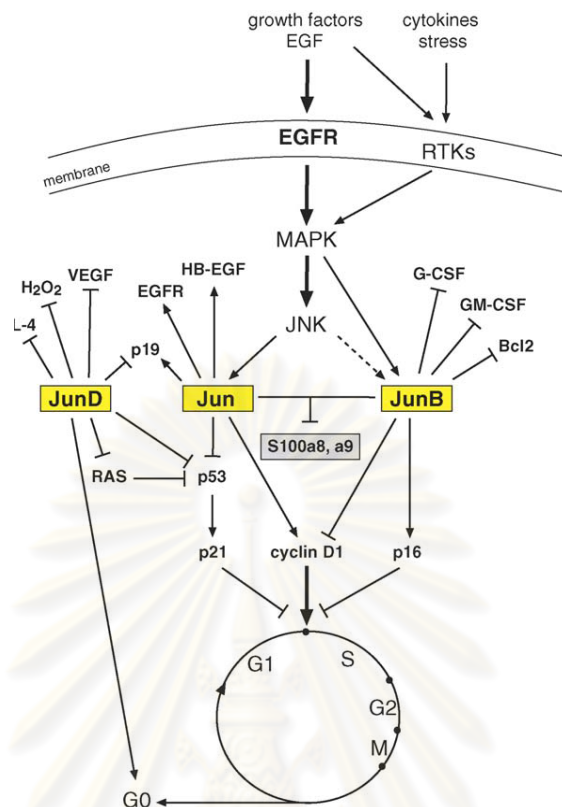
PI3K/Akt Pathway จะควบคุมการเกิด cell growth, Apoptosis resistance เมื่อทำการรักษาด้วย Chemotherapy, การเกิด Tumor invasion และ migration (104) โดยการกระตุ้น PI3K ผ่านทางการเกิด dimer ระหว่าง EGFR และ ERBB-3 โดย PI3K เป็นเอนไซม์ที่ประกอบไปด้วย p85 และ p110 subunit โดย p85 จะจับกับ erbB และ p110 กระตุ้นการเติมฟอสเฟตของ

Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate ซึ่งไปกระตุ้นโปรตีน serine/threonine kinase (105) ซึ่ง Akt ไปเหนี่ยวนำให้เกิดการเติมฟอสเฟตที่ Pro-caspase 9 ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของ protease (106) และ Akt สามารถเติมฟอสเฟตที่ Bad ซึ่งเป็น Pro-apoptotic ในกลุ่มของ Bcl-2 และ Forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) (107) ซึ่งเป็น Pro-apoptotic ของ Transcription factor ซึ่งแสดงว่า Akt Pathway เป็นกระบวนการหลักในการควบคุมกระบวนการมีชีวิตอยู่ของเซลล์โดยผ่านทาง EGFR (108)

STAT Pathway โดย EGFR สามารถควบคุม STAT Pathway โดยผ่านทาง Janus kinase (JAK) (109, 110) ซึ่งโปรตีน STAT เป็นกลุ่มของโปรตีนของ Cytoplasmic transcription factor ตัวที่สำคัญก็คือ STAT3 และ STAT5 (111) ซึ่งเกี่ยวข้องในโรคมะเร็ง โดยการทำงานนั้น จะเกิดการจับกันระหว่าง Receptor tyrosine kinase กับ EGFR, ERBB2 และ Platelet-derived growth factor receptor ทำให้กระตุ้นการทำงานของ STAT3 ซึ่งทำให้เกิดมะเร็งได้ (76)

Src Kinase Pathway SRC kinase มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนา และการดำเนินของ โรคมะเร็ง (112) แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด โดย SRC เป็นสมาชิกในกลุ่ม ten-gene family (FYN, YES, BLK, FRK, FGR, HCK, LCK, LYN และ SRMS) โดยมีหน้าที่ควบคุมกระบวนการเกิด cell proliferation, migration, Adhesion และ Tumor angiogenesis (113, 114) โดยการส่งสัญญาณของ Src จะเกิดการ cross-connect กัน ระหว่างกระบวนการหลักๆ เช่น PI3K และ STAT Pathway (115)

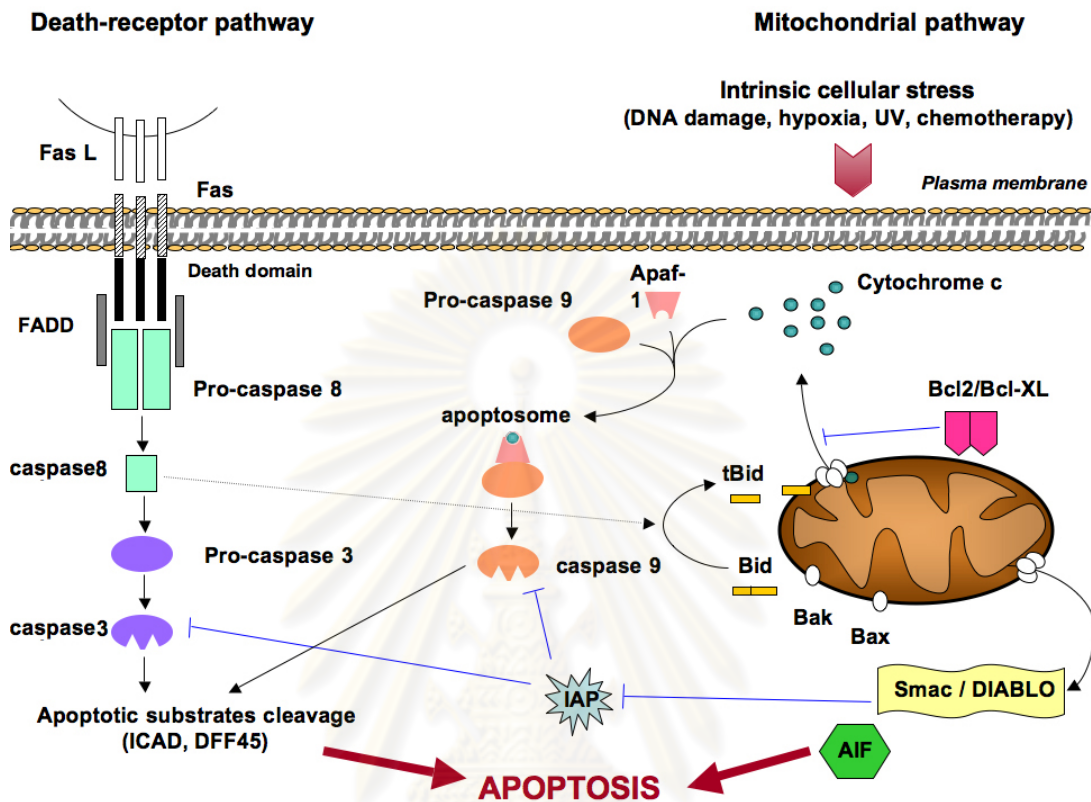
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.12 แสดง EGFR signaling pathway โดยผ่านทาง Jun pathway (116)

Jun Pathway Activator protein-1 (AP-1) เป็น Transcription factor ซึ่งประกอบไปด้วย Jun, Fos, Activating transcription factor (ATF) และ Musculoaponeurotic fibrosacroma (Maf) protein (117) ซึ่ง AP-1 จะถูกเหนี่ยวนำโดยสารจาก Growth factors, Neurotransmitters, polypeptide hormone และการติดเชื้อไวรัส โดยกระตุ้นผ่านทาง MAPK cascades (118, 119) ทำให้ไปกระตุ้นการทำงานของ AP-1 ซึ่งการทำงานของ AP-1 นั้นเกิดในผิวหนังชั้นหนังกำพวด ซึ่งจะมีผลต่อการตอบสนองต่อแสงแดด, รังสียูวี, การเกิดมะเร็ง, Aging และ Wound repair (119, 120) โดย Jun protein นั้นจะมีความสำคัญในการควบคุมการเกิด Keratinocyte proliferation และการหลั่งไฮโดรโคโรน ซึ่งมีผลต่อการอักเสบ และในโรคสะเก็ดเงินด้วย อีกทั้ง Jun-amino-terminal kinases (JNKs) จะกระตุ้น Jun protein ทำให้เกิดการควบคุม cell cycle progression เช่น ยับยั้ง p53 ทำให้ไม่เกิด Cell cycle arrest หรือ Apoptosis ด้วย (121)

Caspase-9 (Cystine-aspartic proteases 9 หรือ Cystine-dependent aspartate-directed proteases 9)



ภาพที่ 2.13 แสดงการเกิด Apoptosis โดยผ่านทาง Death-receptor pathway และ Mitochondrial pathway (122)

Apoptosis เป็นรูปแบบการตายของเซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาของ embryo และในการควบคุมสมดุลของเนื้อเยื่อ (123) กระบวนการ Apoptosis ถูกควบคุมโดยการเกิดการส่งสัญญาณของเซลล์ ซึ่งมี 2 กระบวนการที่สำคัญ คือ Intrinsic pathway (Mitochondrial pathway) ซึ่งเกิดภายในเซลล์ และ Extrinsic pathway (Death-receptor pathway) ซึ่งเกิดภายนอกเซลล์ โดยมีตัวกระตุ้น คือ Death receptor จับกับ Ligand ที่จำเพาะ แต่ถ้าเป็นภายในเซลล์ จะเป็นการตอบสนองของเซลล์ต่อสภาวะที่กดดัน (Stress) ต่างๆ เช่น Toxin, ฮอร์โมน, Growth factor, Nitric oxide หรือไซโตไคน์ (124) โดยมีตัวควบคุมการเกิด Apoptosis ภายในเซลล์ ซึ่งก็คือ ไมโทคอนเดรีย เป็นออร์แกเนลล์ที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis จะมีผลต่อไมโทคอนเดรีย โดยทำให้ไมโทคอนเดรียบวม หรือเจาะรูบนผิวเนื้อเยื่อ หรือเพิ่ม permeability ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ทำให้สารที่ควบคุมกระบวนการเกิด Apoptosis รั่ว

ออกมา และโปรตีน SMACs (Second mitochondria-derived activator of caspase) จะถูกปล่อยออกมายังสารน้ำในเซลล์ ซึ่ง SMACs จะจับ และลดการทำงานของโปรตีนด้านการเกิด Apoptosis (IAPs-Inhibitor of apoptosis protein) (125) โดยปกติแล้ว IAPs จะทำหน้าที่กีดการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ Cysteine protease คือ Caspase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ Cytochrome C ก็เป็นอีกตัวหนึ่งที่ถูกปล่อยออกมาจากเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย และทำหน้าที่เป็นโปรตีนควบคุมการเกิด Apoptosis (126) โดยจับกับโปรตีน Apaf-1 และ ATP และจับกับ Procaspase-9 กลายเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า Apoptosome ซึ่งจะย่อย Procaspase-9 ให้เป็น Caspase-9 ซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของ Caspase-3 ทำให้เกิด Apoptosis (127)

Interferon inducible gene 6-16 (G1P3)

Interferon inducible gene 6-16 หรือ G1P3 เป็นหนึ่งในยีนหลายยีน ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดย Interferon α และ β ซึ่งจะผลิต mRNA 3 ชนิดด้วยกัน (128) โดย mRNA ที่พบมากที่สุด จะเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนขนาด 14 kDa ซึ่งก็คือโปรตีน G1P3 (129) โดยกระบวนการทำงานยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (130) แต่เชื่อว่าผ่านทาง p53 pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด Apoptosis (131) โดยมีกระบวนการไปยับยั้งการเกิด Apoptosis ได้ 4 วิธี

1. The Death receptor pathway เช่น Fas, Tumor necrosis factor (TNF) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) โดยมี RIP (Receptor-interacting protein), c-FLIP (Cellular-Flice-like inhibitory protein) และ FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1) ไปยับยั้ง Death signal จาก Death receptor ซึ่งอยู่ที่ plasma membrane (107, 132)

2. The mitochondrial pathway โดยมีโปรตีน Bcl-2 family ซึ่งเป็น anti-apoptotic ไปมีผลต่อผิวไมโทคอนเดรีย โดยป้องกันไม่ให้เกิด Permeability ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ และไม่เกิดการหลั่งของ Cytochrome C (133)

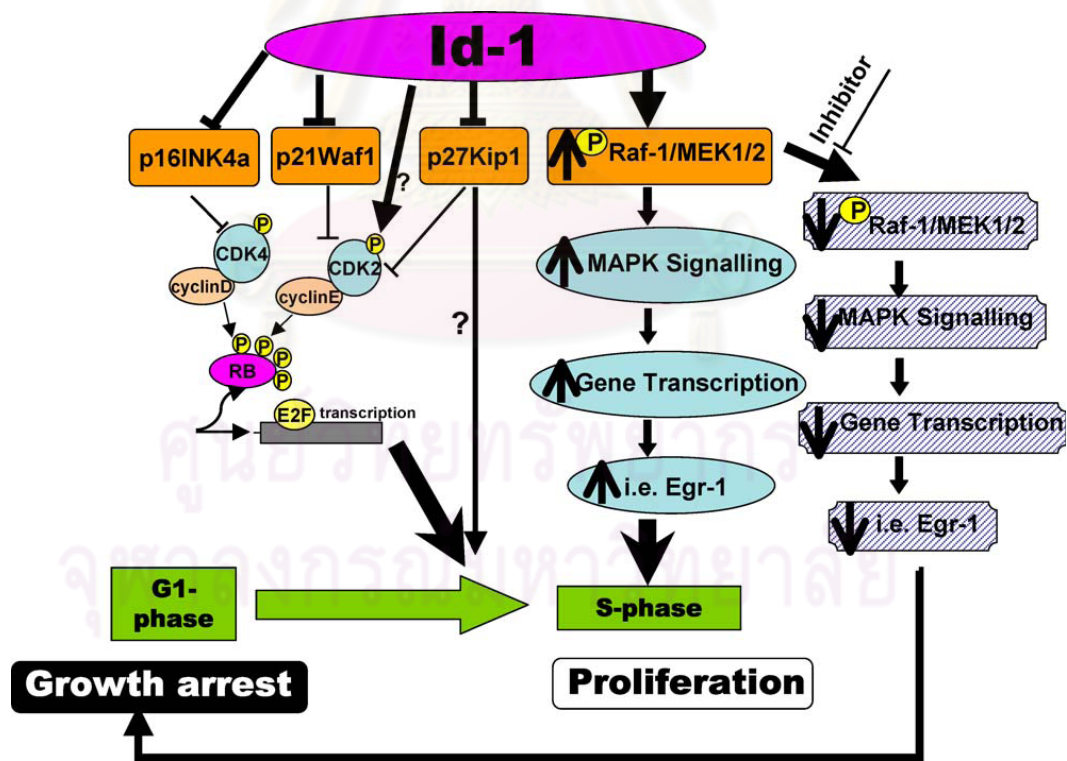
3. Inhibition of apoptosis proteins (IAPs) ซึ่งประกอบไปด้วย X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), Cellular inhibitor of apoptosis protein1 (cIAP-1) และ Cellular inhibitor of apoptosis protein2 (cIAP-2) จะไปยับยั้งการทำงาน และประสิทธิภาพของ

Caspase ต่างๆ และมี Heat shock protein ก็ไปมีผลยับยั้งการทำงานของ Caspase ด้วย โดยไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนต่างๆ (134, 135)

4. Degradation of chromosomal DNA ระหว่างการเกิด Apoptosis โดย Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) ไปยับยั้งการทำงานของ Caspase-activated DNase (CAD) และพบว่า G1P3 ไปยับยั้ง Mitochondria-mediated apoptosis โดยทำงานคล้ายกับ anti-apoptotic Bcl-2 family protein ซึ่ง G1P3 นั้นจะหลั่งมากขึ้น เมื่อเป็นโรคสะกดเงิน หรือ โรคมะเร็ง ทำให้เกิดการต้านการ Apoptosis เซลล์จึงไม่หยุดการเจริญเติบโต (136, 137)

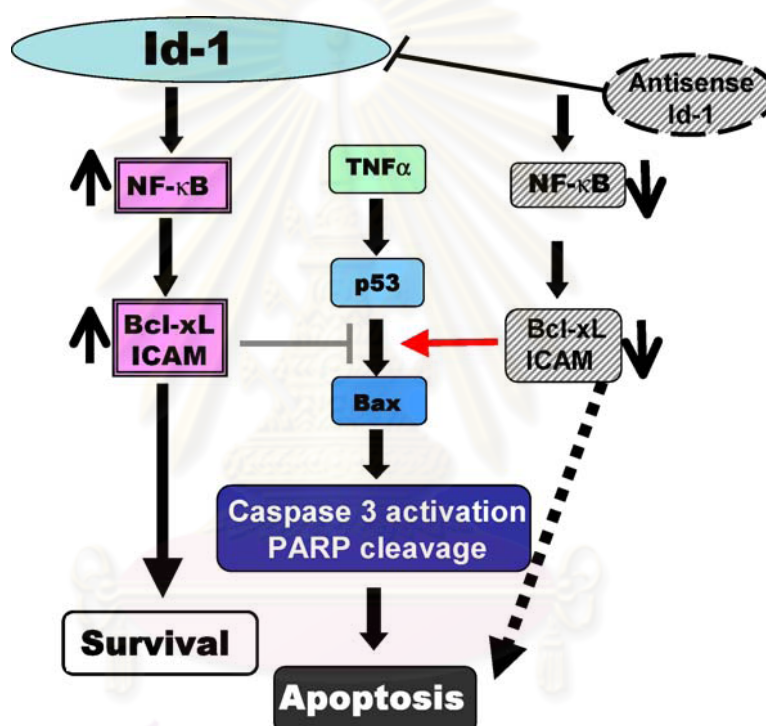
Id1 (Inhibitor of differentiation or DNA binding-1)

Id-1 เป็นโปรตีนชนิด helix-loop-helix ซึ่งมีกระบวนการสำคัญในการควบคุม Cell proliferation และการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง และการ progresstionของเซลล์มะเร็งอีกด้วย (138)



ภาพที่ 2.14 แสดงกลไกการทำงานของ Id-1 ใน Cell proliferation signaling pathways (139)

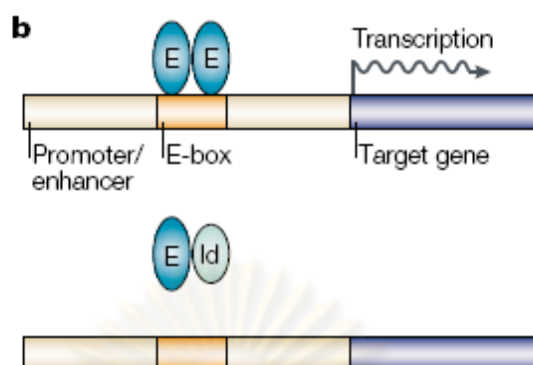
Id-1 จะทำปฏิกิริยากับ RB (Regulation of cell cycle by Retinoblastoma protein) pathway และ MAPK pathway โดยไปยับยั้งการแสดงออกของ p16INK4a ผ่านทางการเพิ่มการเติมฟอสเฟตของโปรตีนRB (140) และกระตุ้นให้เซลล์เกิด Cell cycle progression และใน MAPK pathway นั้นจะเกิดการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตอบสนองผ่านการกระตุ้นของ mitogen โดยการเติมฟอสเฟตที่ Raf และ MEK1/2 ของ Id-1 ทำให้เซลล์เกิดการ Proliferation (141)



ภาพที่ 2.15 แสดงกลไกการทำงานของ Id-1 ในกระบวนการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ (139)

การทำงานของ Id-1 นั้นจะไปกระตุ้น NF-κB pathway ทำให้ ICAM และ Bcl-xL ซึ่งเป็น anti-apoptotic เพิ่มมากขึ้น ทำให้เซลล์ไม่เกิดการตายแบบ Apoptosis จึงมีชีวิตอยู่รอดได้ ดังนั้น การควบคุมสมดุลระหว่างการเกิด Apoptosis และการเกิด Proliferation ของเซลล์ เป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำงานของ Id-1 (142-144)

E2A protein



ภาพที่ 2.16 แสดงกลไกการทำงานของ E2A

ที่มา: <http://www.nature.com/reviews/immunol>.

E2A เป็นโปรตีนในกลุ่มของ helix-loop-helix (145) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนประกอบไปด้วย E2A, HEB และ E2-2 ซึ่ง E2A จะสามารถสร้างโปรตีนที่สำคัญได้ 2 ชนิด คือ E12 และ E47 (146) แต่การทำงานยังไม่ทราบชัดเจน โดยพบว่า E2A เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญของ เซลล์ และการแปรรูปของเซลล์หรือพัฒนาการของเซลล์ (Differentiation) เนื่องจากพบว่าบริเวณที่มีการเกิดการพัฒนาการหรือการแปรรูปของเซลล์จะมีโปรตีน E2A สูง (147) โดยการทำงานของ E2A นั้นจะไม่สามารถทำงานเพียงตัวเดียวได้ จะต้องจับกันเองระหว่าง E2A กับ E2A ซึ่งเป็นแบบ homodimer จะสามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการพัฒนาเกิดขึ้นได้ และลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (148) โดยไปจับตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน ณ ตำแหน่งจำเพาะบนโปรโมเตอร์ (149) แต่ถ้าหาก E2A ไปจับกับ Id1 ซึ่งเป็นแบบ heterodimer นั้น (148) จะทำให้จับตรงตำแหน่งของโปรโมเตอร์ของยีนไม่ได้ ทำให้ไปยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงมีแต่การเพิ่มจำนวนเท่านั้น (149)

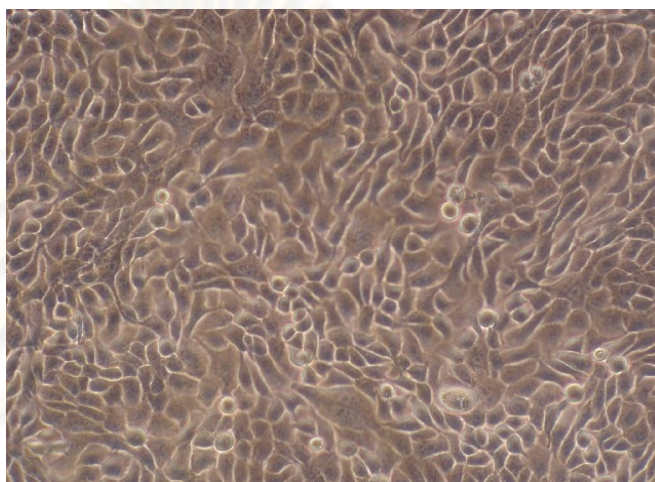
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในการวิจัยมีดังนี้

1.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

1.1.1 เซลล์ผิวหนัง HaCaT (Human keratinocyte cell line) ทำการซื้อมาจาก CLS cell line ประเทศเยอรมนี



ภาพที่ 3.1 แสดงเซลล์ผิวหนัง HaCaT (Human keratinocyte cell line)

ที่มา: <http://www.medchem.upol.ct/en/services.htm>

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้นั้น จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM: with 4 mM Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate) ที่มี Fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และมียาปฏิชีวนะ คือ Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/ml แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

1.2 ตัวอย่างของสมุนไพรไทย

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษานั้น ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง ซึ่งผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล จากงานวิจัยของคุณวิสาข์ ทองระภาค รหัส 5177105037 นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในหัวข้อเรื่อง “การทดสอบหาฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทย” ซึ่งผ่านการพิสูจน์

ชนิดของสมุนไพรไทยโดย ศ.ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีด้วยกันทั้งหมด 3 ชนิดดังนี้

- | | | | |
|-------|----------|-----------------------------|---------------------------------------|
| 1.2.1 | ขมิ้นชัน | Herbarium number คือ 013396 | ส่วนที่ใช้ในการวิจัยคือ เหง้า |
| 1.2.2 | ข่า | Herbarium number คือ 013397 | ส่วนที่ใช้ในการวิจัยคือ เหง้าและแห้งง |
| 1.2.3 | น้อยหน่า | Herbarium number คือ 013399 | ส่วนที่ใช้ในการวิจัยคือ ใบ |

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

BioRad Mini Protean 3	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Western transblot system	BIO-RAD, 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
6 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
Vortex Mixer	FINEPCR, เกาหลีใต้
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
Analytical Balances	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Autopipette	GILSON, ฝรั่งเศส
Microcentrifuge tube (0.6 ml)	Axgen scientific, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml)	Biologix Research

	company, สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (10,200, 1000 µl)	Sorenson™ BioScience, Inc., สหรัฐอเมริกา
Block heater	Wealtec Corp., สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Sheldn Manufacturing, สหรัฐอเมริกา
Glassware	Pyrax, สหรัฐอเมริกา
Haemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
Incubator	Memmert, เยอรมนี
Water Bath	Memmert, เยอรมนี
-20 °C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
4 °C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
Liquid Nitrogen Tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Glass Microscope Slides	Sail Brand, จีน
Coverslip	German cover glasses, เยอรมนี
LSM 700 Laser Scanning Microscope	Carl Zeiss, เยอรมนี
Microplate Reader	Biotek, สหรัฐอเมริกา
Multi-Rotator Multi Bio RS-24	Biosan, สหรัฐอเมริกา

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ และการเตรียมเซลล์ให้เป็น Model

ของโรค

Dulbecco's Modified Eagle Medium/	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
-----------------------------------	-----------------------

High glucose (DMEM: with 4 mM Glutamine, 4500 mg/L Glucose without Sodium Pyruvate)	
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	PeptoTech, สหรัฐอเมริกา
Recombinant Human IFN- γ	PeptoTech, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
Trypan Blue Stain 0.4%	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออกของ

โปรตีน

Tris, Ultra Pure	Research organc, สหรัฐอเมริกา
Sodium chloride	Merck, เยอรมนี
Serva Blue G Dye	Applichem
Nonidet P 40	Biobasic, แคนาดา
Bovine serum albumin	PAA, ออสเตรเลีย
85% Phosphoric acid	Merck, เยอรมนี
Methanol	Merck, เยอรมนี
Triton X-100	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Phosphate Buffered Saline	Hyclone, สหรัฐอเมริกา

(PBS: without calcium without magnesium	
Hoechst 33258	Sigma, สหรัฐอเมริกา
Dithiothreitol (DTT)	Biobasic, แคนาดา
Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF)	USB, สวิตเซอร์แลนด์
30% Acrylamide and Bis-Acrylamide solutions	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Ammonium persulfate	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Sodium Lauryl Sulfate (Sodium Dodecyl Sulphate) SDS	Ajax Finechem, ออสเตรเลีย
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich,
Glycine, USP grade	Research organic, สหรัฐอเมริกา
Polyxyethylene-20 sorbitan monolaurate (Tween 20)	Biobasic, แคนาดา
2-mercaptoethanol	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Glycerol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas, แคนาดา
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell signaling, แคนาดา
Anti-goat IgG, HRP-linked Antibody	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Rabbit polyclonal antibody (Id1)	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Rabbit polyclonal antibody (E2A)	Santa Cruz Biotechnology,

	สหรัฐอเมริกา
Rabbit polyclonal antibody (GAPDH)	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Rabbit polyclonal antibody (EGFR)	Cell signaling, แคนาดา
Rabbit polyclonal antibody (Caspase 9)	Cell signaling, แคนาดา
Goat polyclonal antibody (G1P3)	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Anti-rabbit IgG, Alexa Fluor [®] 555 Conjugate	Cell signaling, แคนาดา
SuperSignal West Femto	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Maximum Sensitivity Substrate	
SuperSignal West Pico	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา
Chemiluminescent Substrate	
Kodak BioMaK light film	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Kodak processing chemicals	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ EGFR, Id1, Caspase 9, E2A และ G1P3 ด้วยเทคนิค Western blot

3.1.1 การเตรียม Cell culture เพื่อใช้ในการศึกษา

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM/High glucose) ที่ผสมกับ fetal bovine serum 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/ml โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการ Seed cell จำนวน 3×10^6 เซลล์ต่อจานเพาะเลี้ยงขนาด 15x60 มิลลิเมตร โดยมีปริมาตรรวมเท่ากับ 4 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มากระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/ml และ IFN- γ 10 ng/ml เพื่อให้เซลล์เป็น *In vitro* model ของโรคสะเก็ดเงิน แล้วนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.2 การนำเซลล์ HaCaT มาทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรไทย

นำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย ดังนี้ ชุดที่ 1 อาหารเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ชุดที่ 2 สารสกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิดจากตัวทำละลายเอทานอล ประกอบด้วย 1) ข่าที่ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.575 µg/ml), $0.5IC_{50}$ (3.15 µg/ml) และ IC_{50} (6.3 µg/ml) 2) ขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.675 µg/ml), $0.5IC_{50}$ (3.35 µg/ml) และ IC_{50} (6.7 µg/ml) 3) น้อยหน่าที่ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.575 µg/ml), $0.5IC_{50}$ (3.15 µg/ml) และ IC_{50} (6.3 µg/ml) ชุดที่ 3 DMSO 0.0063 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับข่า และน้อยหน่า 0.0067 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับขมิ้น ซึ่งมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 4 มิลลิลิตร โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

หลังจากครบเวลาที่กำหนดแล้วทำการสกัดโปรตีนด้วยการใช้ Nonidet-P40 (NP-40) lysis buffer โดยการนำจานเพาะเลี้ยงออกมจากตู้บเพาะเลี้ยง ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์และสารสกัดผสมไนพรออกให้หมด แล้วทำการล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็นบนน้ำแข็งจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม Nonidet-P40 (NP-40) lysis buffer ที่เย็น 200 ไมโครลิตร ชูด(Scrape)เซลล์บนน้ำแข็งออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ให้หมดโดยใช้ที่ชูดเซลล์(Scraper) จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดจากจานเพาะเลี้ยงใส่หลอดทดลองที่เย็นขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Orbital shaker ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสทั้งหมดที่ได้ใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยงไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford Protein Assay หรือนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส

3.1.4 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธี Bradford Protein Assay

วิธี Bradford Protein Assay เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยการเตรียมสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของการวัดความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้ผง Bovine serum albumin (BSA) ผสมกับน้ำที่ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำเป็น Serial dilution ทั้งหมด 10 ความเข้มข้นด้วยกัน สำหรับการวัดความเข้มข้นของโปรตีนนั้นจะทำการดูดโปรตีน 2 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ Milli-Q 98 ไมโครลิตร เติมน้ำยา Bradford Working Buffer ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วทำการผสมให้เข้ากัน แล้วดูค่า 150 ไมโครลิตร ใส่จาน 96 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (ภาพที่ 3.2) คำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนจาก Standard curve และคูณด้วย Dilution factor กับความเข้มข้นของโปรตีนที่คำนวณได้



ภาพที่ 3.2 Microplate Reader

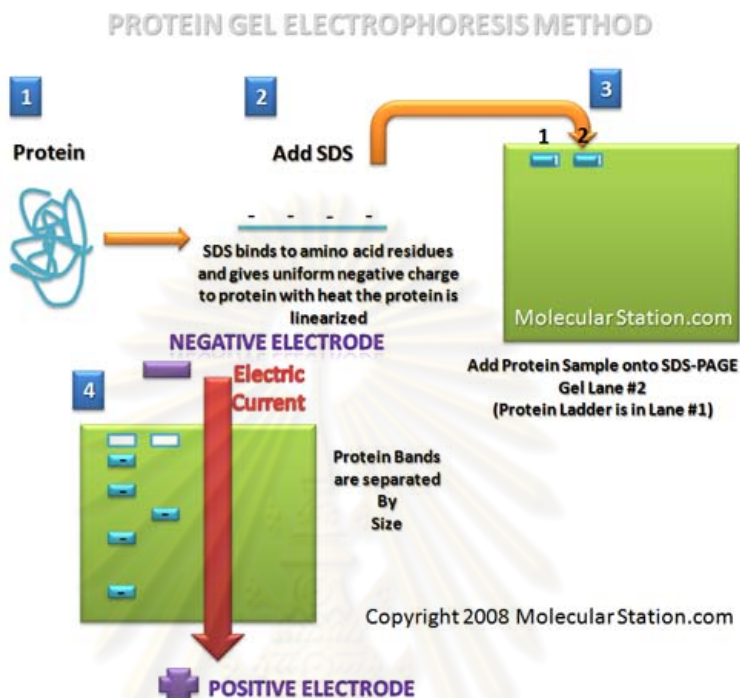
ที่มา: <http://www.genengnews.com/more/keyword/assay-development/8/25/>

3.1.5 การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE)

เป็นวิธีการแยกโปรตีน โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโปรตีน (Molecular weight) โดยมีหลักการคือ โปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพ จากการไปทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน จากสาร 2-mercaptoethanol เมื่อนำโปรตีนไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีนั้น และโปรตีนทั้งหมดจะถูก Sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่มีคุณสมบัติเป็น detergent และมีประจุลบจับอย่างหนาแน่น ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ โดยโปรตีนจะเสียสภาพจากรูปร่างทรงกลมไปอยู่ในสภาพเหยียดตรง จากนั้นโปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุบวก โดยการเคลื่อนที่ของโปรตีนนั้นจะอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3.3)

โดยการเตรียม 5 เปอร์เซ็นต์เจล สำหรับ Stacking gel, 10 เปอร์เซ็นต์เจล สำหรับ Separating gel ของโปรตีน Caspase 9, E2A, EGFR และ GAPDH และ 18 เปอร์เซ็นต์เจล สำหรับ Separating gel ของโปรตีน Id1 และ G1P3 แล้วทำการเตรียม Sample เพื่อใส่ลงในเครื่องสำหรับ Run SDS-PAGE โดยทำการผสม Sample กับ Laemmli sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไป incubate ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยอดโปรตีนปริมาณ 20 µg บนเจลที่เตรียมไว้เพื่อแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล โดยใช้กระแสไฟฟ้าด้วยความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และ ความต่างศักย์ 120 โวลต์เป็นเวลา 120 นาที สำหรับโปรตีน

Caspase 9, E2A, EGFR และ GAPDH ที่ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และ ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 120 นาที สำหรับโปรตีน Id1 และ G1P3

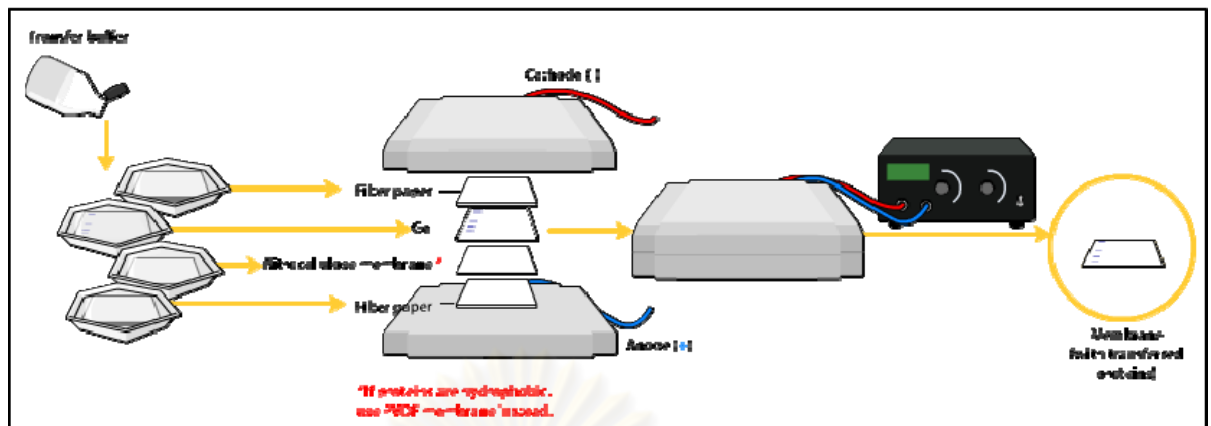


ภาพที่ 3.3 การแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล (SDS-PAGE)

ที่มา: <http://www.molecularstation.com/sds-page-gel-electrophoresis/>.

3.1.6 การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Immunoblotting)

เป็นการถ่ายโอนโปรตีนจากแผ่นเจลที่ผ่านการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ลงสู่แผ่นเมมเบรนที่มีประจุบวก คือ Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane หรือ Nitrocellulose membrane โดยใช้วิธี Wet tank ซึ่งเป็นการย้ายโปรตีนโดยอาศัยบัฟเฟอร์เป็นตัวช่วย (ภาพที่ 3.4)



ภาพที่ 3.4 การถ่ายโอนโปรตีนจากแผ่นเจลสู่แผ่นเมมเบรน

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot.

ทำการตัดแผ่น PVDF membrane ให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ จากนั้นทำการ Activate membrane โดยการแช่ใน Absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ใน Transfer buffer ที่เย็นที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการลอกแผ่นเจลออกมาจากกระจก แล้วแช่ด้วย Transfer buffer ที่เย็นเช่นกัน ทำการประกบเจล และ membrane ด้วยตลับประกบ โดยวางวัสดุจากซ้ายลบบ(ดำ) ไปขวาก(แดง) ตามลำดับ ดังนี้ ฟองน้ำ, กระดาษกรอง, แผ่นเจล, แผ่น PVDF membrane, กระดาษกรอง และฟองน้ำ จากนั้นเติม Transfer buffer ให้ท่วมตลับประกบ แล้วทำการปิดฝาแท็งก์ วางไว้ในภาชนะที่หล่อด้วยน้ำแข็งโดยรอบ แล้วทำการถ่ายโอน โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่คงที่ที่ 150 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับโปรตีน Caspase 9, E2A, G1P3 Id1 และ GAPDH เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับโปรตีน EGFR เมื่อครบเวลาแล้วนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ด้วย TBS-T เป็นเวลา 5 นาที ส่วนแผ่นเจลที่ถ่ายโอนโปรตีนเสร็จแล้วสามารถนำมาตรวจสอบว่ามีถ่ายโอนโปรตีนไปจนหมดแล้ว ด้วยการนำมาย้อมสี Coomassie blue

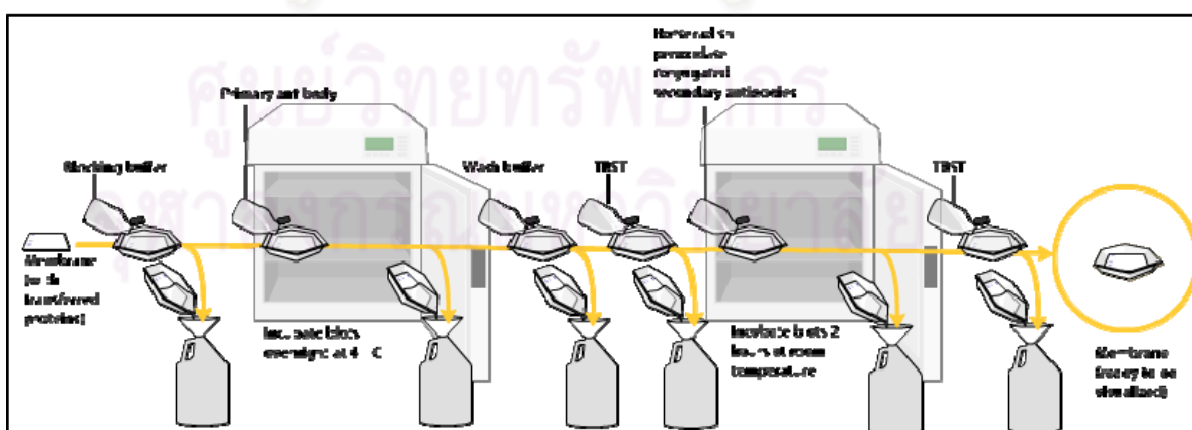
3.1.7 การป้องกันการเกิดการจับของโปรตีนที่ไม่จำเพาะบนแผ่นเมมเบรน (Blocking)

การ Blocking เป็นการป้องกันการเกิดการจับของโปรตีนที่ไม่จำเพาะบนแผ่นเมมเบรน ด้วยการใส่ blocking buffer คือ 5 เปอร์เซ็นต์ non-fat dry milk ละลายใน TBS-T โดยโปรตีนนี้จะไปจับอยู่บนพื้นที่ว่างของเมมเบรน ยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนที่จำเพาะจับอยู่ โดยการนำแผ่นเมมเบรนไปแช่อยู่ใน blocking buffer แล้วนำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า (Rotator) เป็นเวลา 1

ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย TBS-T ด้วยการแช่เมมเบรนใน TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

3.1.8 การติดตามผล (Detection)

ในขั้นตอนการติดตามผลนั้น เราจะใช้วิธี Two steps detection (ภาพที่ 3.5) โดยใช้ Primary antibody เข้าไปจับกับโปรตีนที่จำเพาะ ซึ่งเป็นโปรตีนที่สนใจ โดยแต่ละโปรตีนอาจใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน ดังนี้ สำหรับ anti-GAPDH, anti-Caspase 9, anti-EGFR ใช้อัตราส่วน 1:10000 สำหรับ anti-E2A ใช้อัตราส่วน 1: 4000 และสำหรับ anti-I δ 1, anti-G1P3 ใช้อัตราส่วน 1: 2000 ซึ่งจะละลายอยู่ใน Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBS-T) โดยจะนำแผ่นเมมเบรนมาแช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับ anti-GAPDH, anti-I δ 1, anti-G1P3 และ anti-E2A และแช่เป็นเวลาข้ามคืนสำหรับ anti-Caspase 9 และ anti-EGFR เมื่อครบเวลาแล้วทำการล้างแผ่นเมมเบรนเพื่อนำเอาแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15-30 นาที จากนั้นขั้นตอนต่อไปจะใช้ Secondary antibody เข้ามาจับ Primary antibody คือ anti-rabbit และ anti-goat ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) โดยใช้อัตราส่วน 1:10000 สำหรับจับกับ anti-GAPDH, anti-Caspase 9 และ anti-EGFR อัตราส่วน 1:8000 สำหรับจับกับ anti-E2A และอัตราส่วน 1:3000 สำหรับจับกับ anti-I δ 1 และ anti-G1P3 ซึ่งจะละลายอยู่ใน TBS-T โดยจะนำแผ่นเมมเบรนมาแช่เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทำการล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย TBS-T จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15-30 นาที

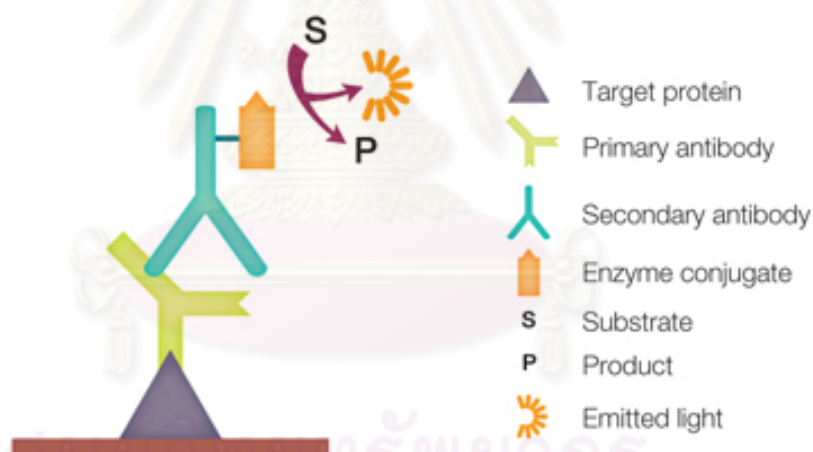


ภาพที่ 3.5 การติดตามผลด้วยวิธี Two steps detection

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot.

3.1.9 การวิเคราะห์ผล (Analysis)

การวิเคราะห์ผลนั้น เราจะใช้วิธี Chemiluminescent detection (ภาพที่ 3.6) ซึ่งเป็นวิธีการติดตามการเรืองแสง โดยการใช้ Substrate ซึ่งจะถูกล่อยด้วยเอนไซม์ที่ติดฉลากอยู่บน Secondary antibody ซึ่ง Substrate ที่ใช้ คือ SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate โดยใส่ substrate แล้วทิ้งไว้ประมาณ 1-5 นาที จากนั้นติดตามการเรืองแสงโดยการนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation) หรือนำแผ่นเมมเบรนไปประกบฟิล์ม จากนั้นทำการล้างฟิล์มด้วยการแช่ลงในน้ำยา Develop ที่เจือจางแล้วด้วยน้ำประมาณ 2 นาที จากนั้นล้างฟิล์มในน้ำประมาณ 1 นาที แล้วแช่ฟิล์มลงในน้ำยา Fixer ที่เจือจางแล้วด้วยน้ำประมาณ 3 นาที แล้วล้างฟิล์มในน้ำประมาณ 1 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทำการตากฟิล์มให้แห้ง ซึ่งทุกขั้นตอนนั้นต้องทำในที่มืด ห้ามมีแสงเด็ดขาด เนื่องจากแสงอาจทำปฏิกิริยากับฟิล์มได้



ภาพที่ 3.6 Chemiluminescent detection

ที่มา: <http://www.biorad.com>

3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของด้วยเทคนิค Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

3.2.1 การเตรียม Cell culture เพื่อใช้ในการศึกษา

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose (DMEM/High glucose) ที่ผสมกับ fetal bovine serum 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ Penicillin

100 U และ Streptomycin 100 µg/ml โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการ Seed cell ใส่ใน 6 well cell culture plate ซึ่งใส่ Coverslip ไว้เรียบร้อยแล้ว จำนวน 3×10^6 เซลล์ต่อหลุม โดยมีปริมาตรรวมเท่ากับ 2 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มากระตุ้นด้วย TNF- α 10 ng/ml และ IFN- γ 10 ng/ml เพื่อให้เซลล์เป็น *in vitro* model ของโรคสะเก็ดเงิน แล้วนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 การนำเซลล์ HaCaT มาทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรไทย

นำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย ดังนี้ ชุดที่ 1 อาหารเลี้ยงเซลล์ (Negative control) ชุดที่ 2 สารสกัดจากน้อยหน่าจากตัวทำลายเอทานอลที่ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.575 µg/ml), $0.5IC_{50}$ (3.15 µg/ml) และ IC_{50} (6.3 µg/ml) ซึ่งมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิลิตร โดยนำเซลล์มาบ่มในตู้อบเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.3 การวิเคราะห์ระดับโปรตีนด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

Immunocytochemistry (ภาพที่ 3.7) เป็นวิธีการนำความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีกับโปรตีนที่ต้องการกับกล้องจุลทรรศน์มารวมกัน เพื่อศึกษาตำแหน่งของโปรตีน หรือเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนที่ต้องการ โดยทำการติดฉลากแอนติบอดีด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ต้องการ

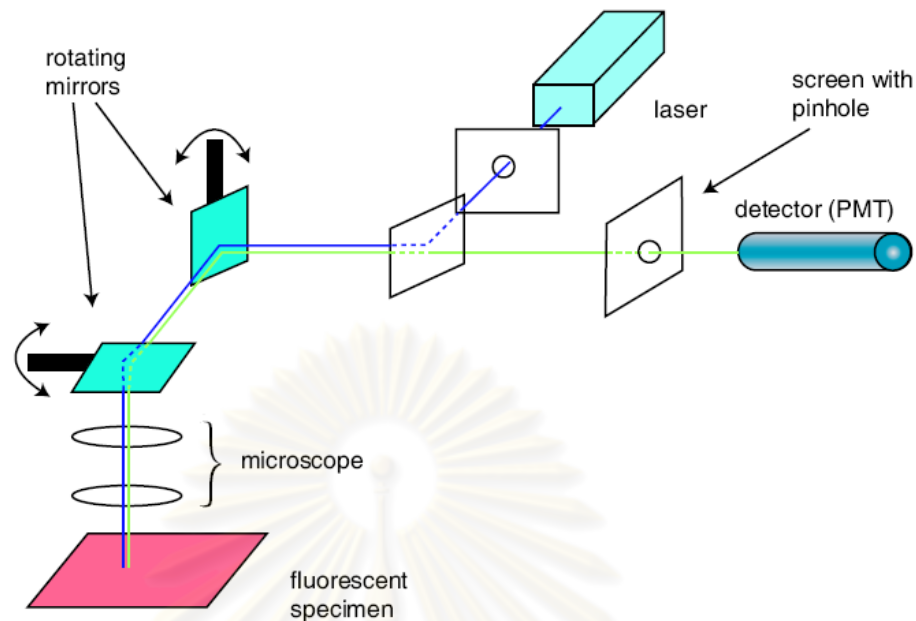
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3.7 หลักการของเทคนิค Immunocytochemistry

ที่มา: <http://www.wellesley.edu/Biology/Concepts/Html/antibodystaining.html>.

ในการวิเคราะห์หัตถ์นั้น เราจะทำการวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยเลเซอร์ (Confocal Laser scanning microscopy) ซึ่งจะใช้ลำแสงในการส่องไปที่วัตถุที่ต้องการจะศึกษา และอาศัยการสะท้อนกลับของลำแสง โดยใช้ตัวรับสัญญาณรับภาพที่เกิดจากการสะท้อน โดยก่อนที่แสงจะกระทบกับวัตถุที่ต้องการศึกษา จะต้องผ่านเลนส์ที่ทำให้ลำแสงมีช่วงโฟกัสที่แคบลง และมีความสามารถในการทะลุทะลวง จึงสามารถเห็นภาพได้ในแนวลึก โดยหลักการของกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยเลเซอร์นั้น (ภาพที่ 3.8) คือ การใช้ Point illumination และ Pinhole ในการรวมแสงที่ด้านหน้าของตัว Detector เพื่อกำจัดสัญญาณที่อยู่นอกโฟกัส ลำแสงเป็นแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่อยู่ใกล้ๆ กับ Focal plane ทำให้สามารถจับภาพได้อย่างคมชัดโดยเฉพาะตัวอย่างที่อยู่ในที่ลึกลงไป แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ออกจากตัวอย่างจะมีปริมาณมากซึ่งจะถูกสกัดโดย Pinhole เพื่อเพิ่มความละเอียดเป็นเหตุให้ลด Signal intensity ดังนั้น ในบางครั้งอาจมีปัญหภาพไม่ชัดเนื่องจากการรบกวนโดยแสงที่สะท้อนจากตัวอย่าง จึงต้องทิ้งเวลาส่องบริเวณนั้นเป็นเวลานานขึ้น



ภาพที่ 3.8 หลักการของกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยเลเซอร์

ที่มา: http://www.ifr.ac.uk/materials/fractures/Confocal_microscopy.html.

เมื่อปมเซลล์จนครบเวลาแล้ว ทำการดูสารสกัดจากน้อยหน่า และอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS เย็นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึง Fix เซลล์ด้วย Absolute methanol ที่แช่ใน -20 องศาเซลเซียสก่อนการทดลอง โดยใส่ Absolute methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลอด เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วล้างเมทานอลออกด้วย PBS เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลอด จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นใส่ 5%BSA และ 0.5% Triton X-100 ซึ่งละลายใน PBS เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลอด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลอด จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใส่ Primary antibody ในอัตราส่วน 1:500 สำหรับ anti-Id1 และอัตราส่วน 1: 2000 สำหรับ anti-Caspase 9 และ anti-EGFR ที่ละลายใน 1% BSA ใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย PBS เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ใส่ Secondary antibody ลงไป ซึ่งเป็น Anti-rabbit ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ Alexa Fluor® 555 ซึ่งจะทำให้การดูคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร และปลดปล่อยพลังงานออกมาที่มีความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร โดยทำการใส่ Secondary antibody

ในอัตราส่วน 1: 1000 สำหรับจับกับ anti-I δ 1 และอัตราส่วน 1: 4000 สำหรับจับกับ anti-Caspase 9 และ anti-EGFR ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เป็นเวลา 45 นาทีในที่มืด จากนั้นทำการล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย PBS เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีในที่มืด

เมื่อครบเวลาแล้วทำการย้อมสีด้วย Hoechst 33258 ซึ่งสีนี้จะเข้าไปจับดีเอ็นเอ โดยดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร และทำการปลดปล่อยพลังงานออกมาที่ความยาวคลื่น 461 นาโนเมตร จึงทำให้เห็นการเรืองแสงที่ดีเอ็นเอ โดยใส่ Hoechst 33258 ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใน PBS เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด จากนั้นล้างสีที่เป็นส่วนเกินออกด้วย PBS เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีในที่มืด เมื่อครบเวลาแล้วทำการคีบ Coverslip ออกมาวางไว้บนแผ่นสไลด์ แล้วทำบริเวณรอบๆ Coverslip ด้วยน้ำยาทาเล็บ จากนั้นนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

4. วิเคราะห์ผล

การทดสอบทั้งหมด จะยอมรับว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า P-value น้อยกว่า 0.05 (ความมั่นใจ 95 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้ student's *t*-test และใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel เวอร์ชัน 2007 ในการแสดงผลเป็นรูปตาราง และกราฟ (Microsoft, สหรัฐอเมริกา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

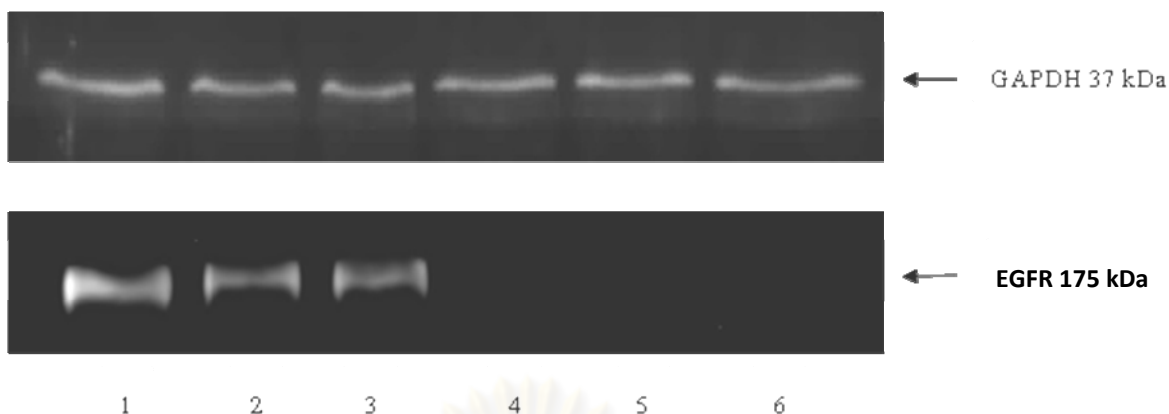
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) ด้วยวิธี Western blot

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ EGFR เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ฟ้า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน EGFR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.1 และภาพที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.1 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.575 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.15 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.3 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

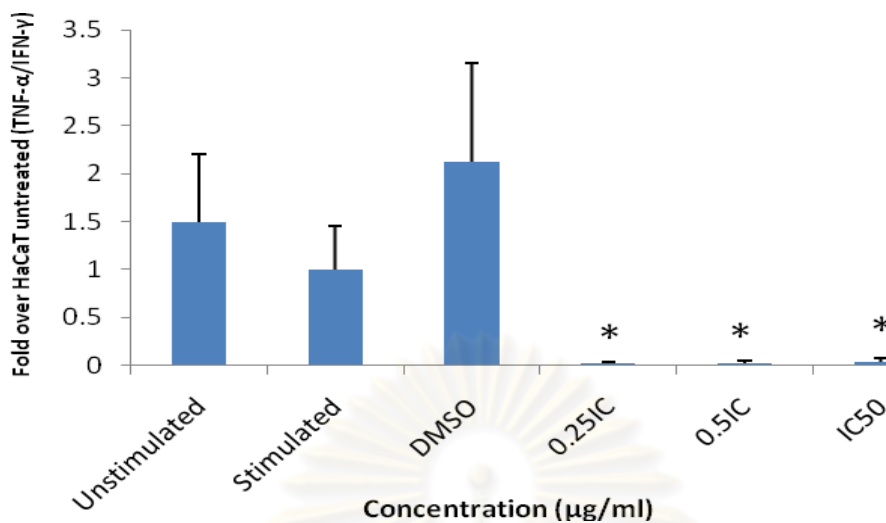
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.2 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับ สารสกัดน้อยหน้าจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 μg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 μg/ml) และ IC₅₀ (6.3 μg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

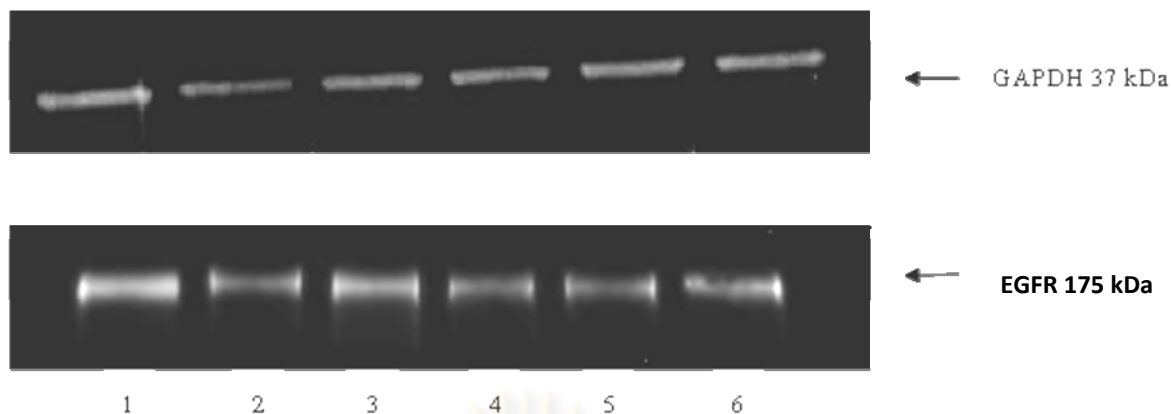
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดชา จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.575 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.15 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.3 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

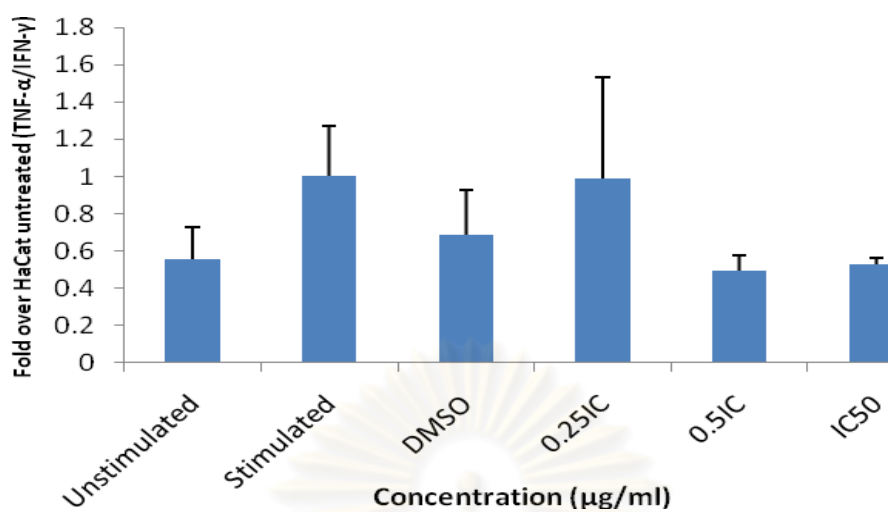
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.4 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับ สารสกัดฆ่าจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับฆ่าที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับฆ่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับฆ่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.5 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT

เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.675 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.35 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.7 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

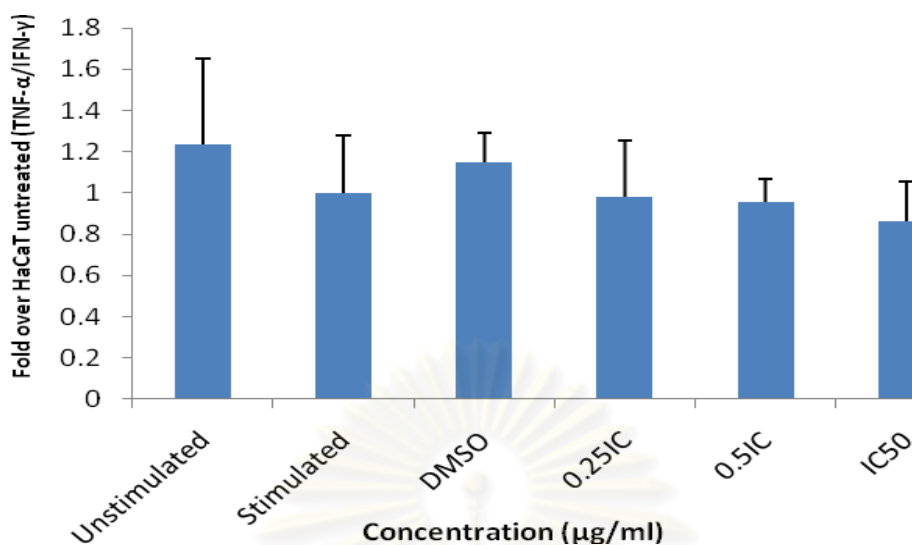
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.6 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับ สารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.675 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.35 µg/ml) และ IC₅₀ (6.7 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO

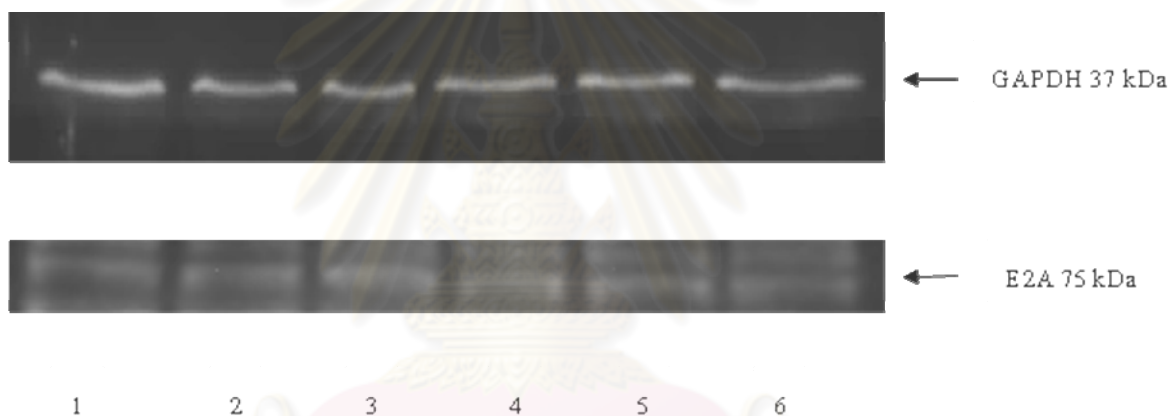
0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC₅₀

4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ E2A ด้วยวิธี Western blot

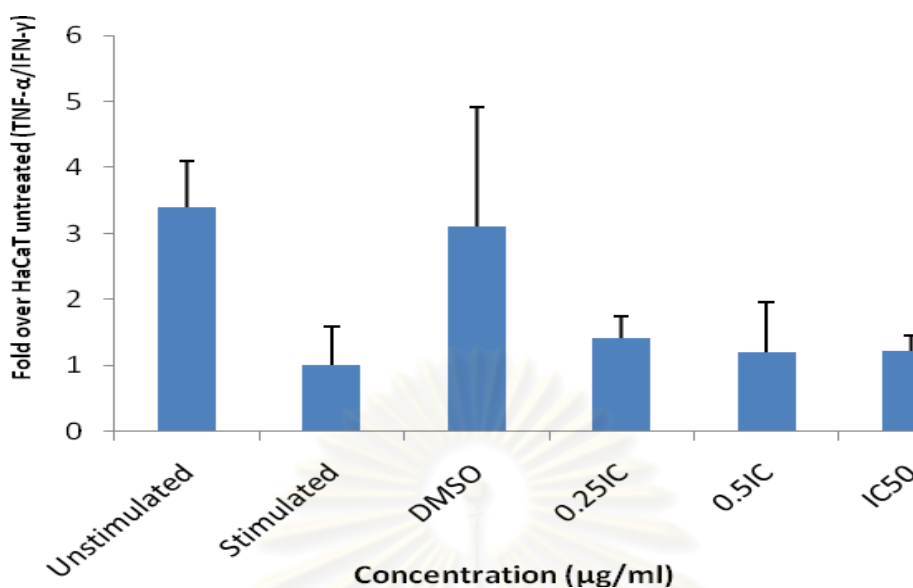
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ E2A เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยจากขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ มีการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.7 ถึงภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.7 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน E2A ในเซลล์ HaCaT เมื่อ

ทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

- 1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
- 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
- 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO
- 4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀
- 5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀
- 6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.8 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน E2A ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้าจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

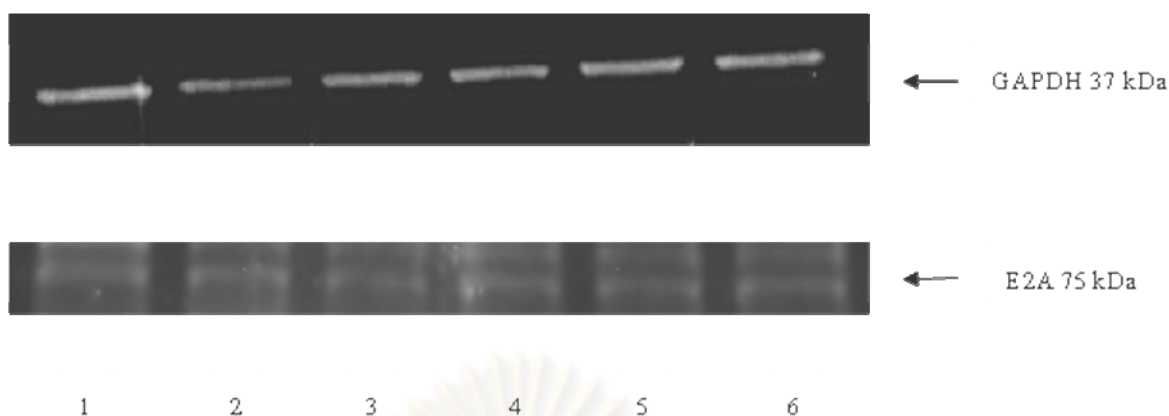
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.9 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน E2A ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดชา จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.575 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.15 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.3 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

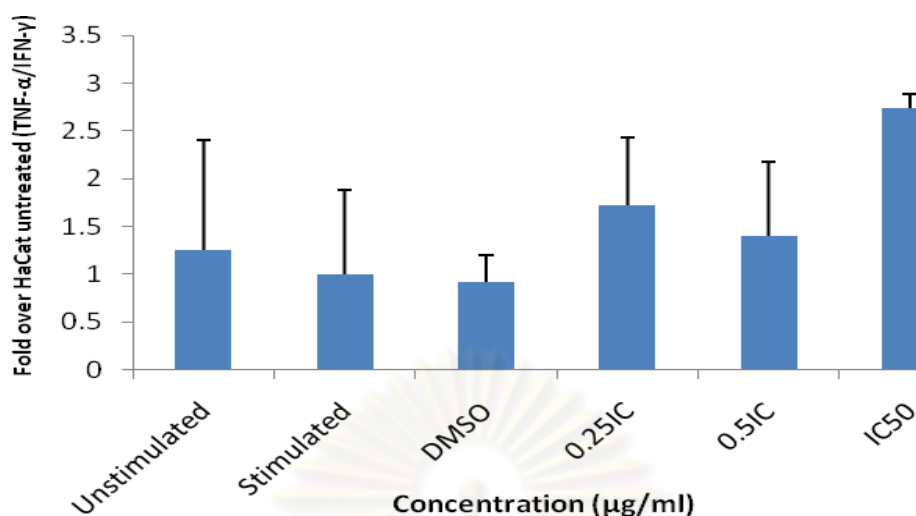
3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น IC_{50}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.10 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน E2A ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

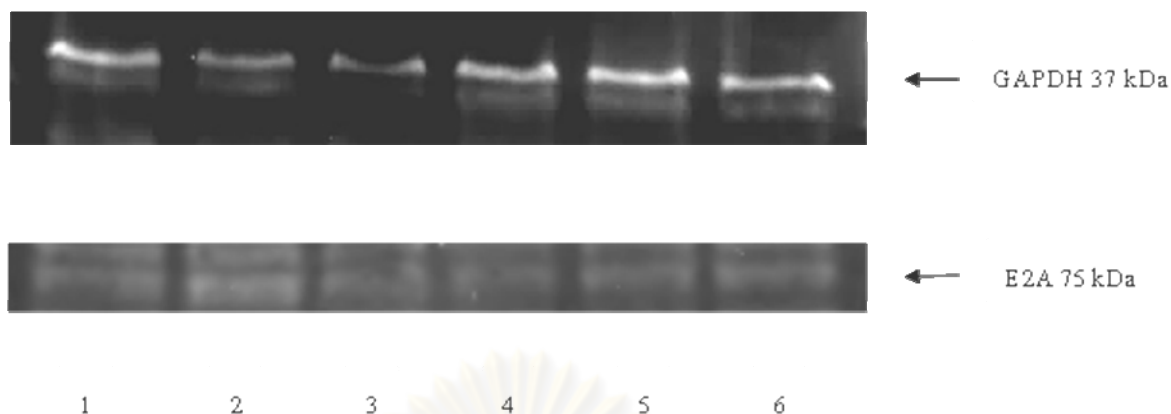
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับค่าที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับค่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับค่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.11 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน E2A ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.675 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.35 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.7 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

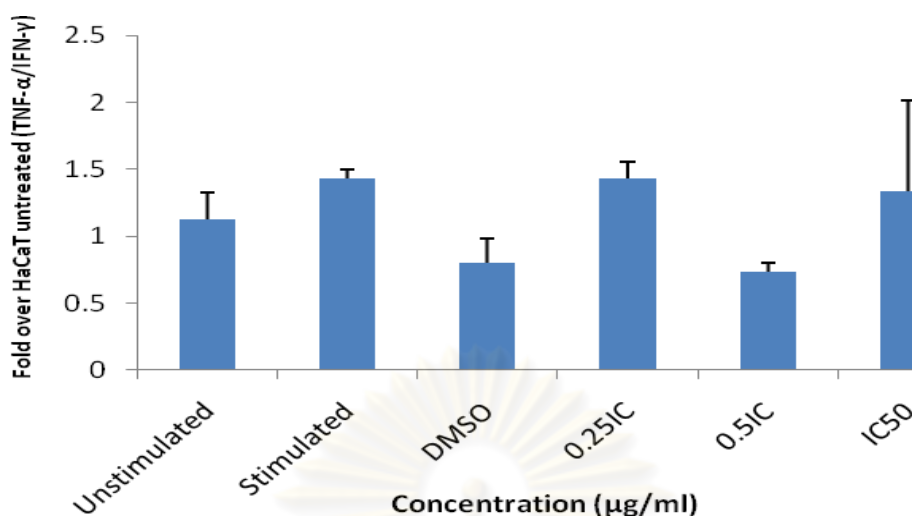
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.12 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน E2A ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.675 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.35 µg/ml) และ IC₅₀ (6.7 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC₅₀

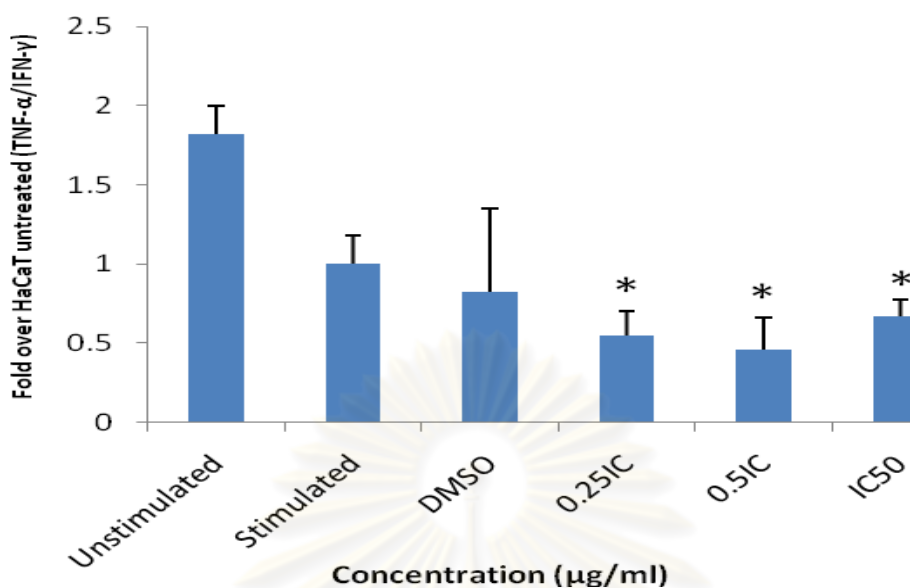
4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Inhibitor of differentiation or DNA binding-1 (Id1) ด้วยวิธี Western blot

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Id1 เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Id1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.13 และภาพที่ 4.14



ภาพที่ 4.13 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO
 4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀
 5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀
 6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.14 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

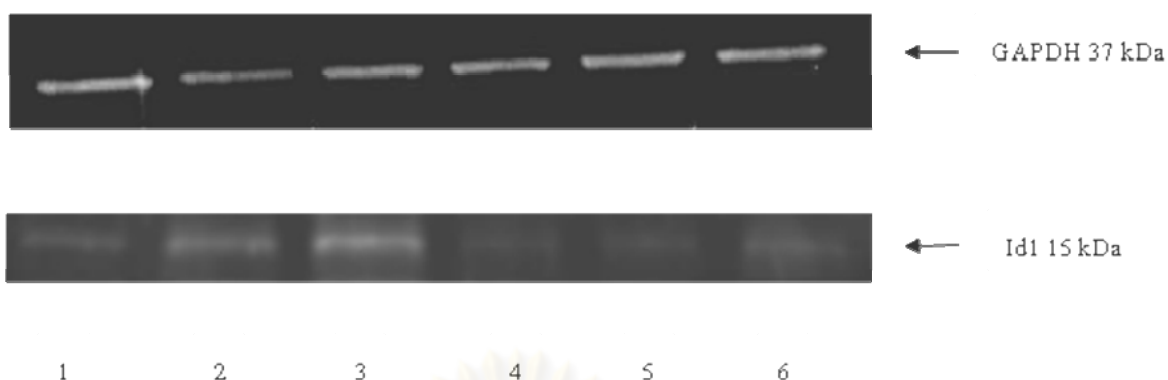
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.15 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดฆ่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.575 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.15 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.3 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

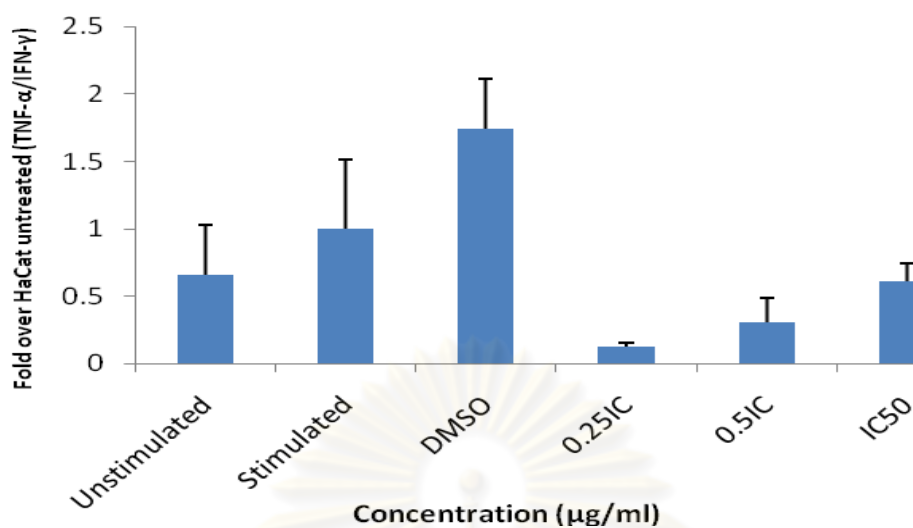
3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับฆ่าที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับฆ่าที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับฆ่าที่ความเข้มข้น IC_{50}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.16 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

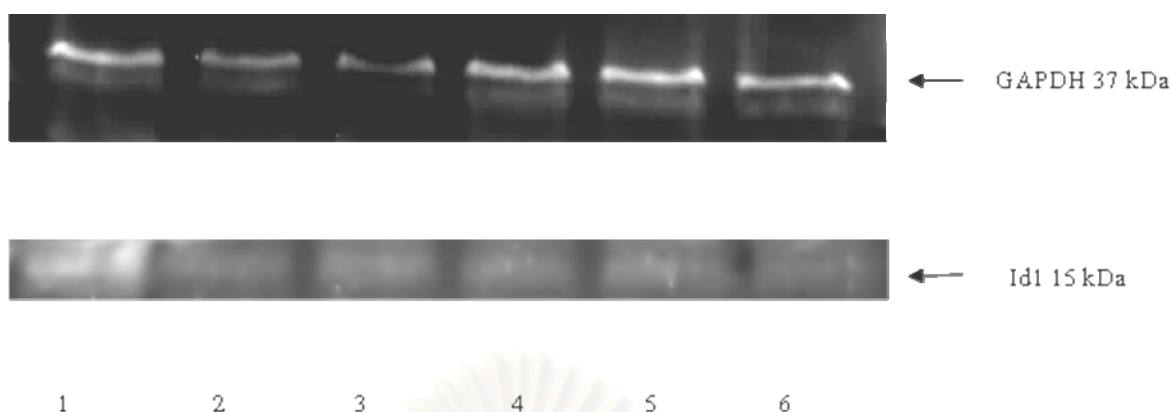
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับซ้ำที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

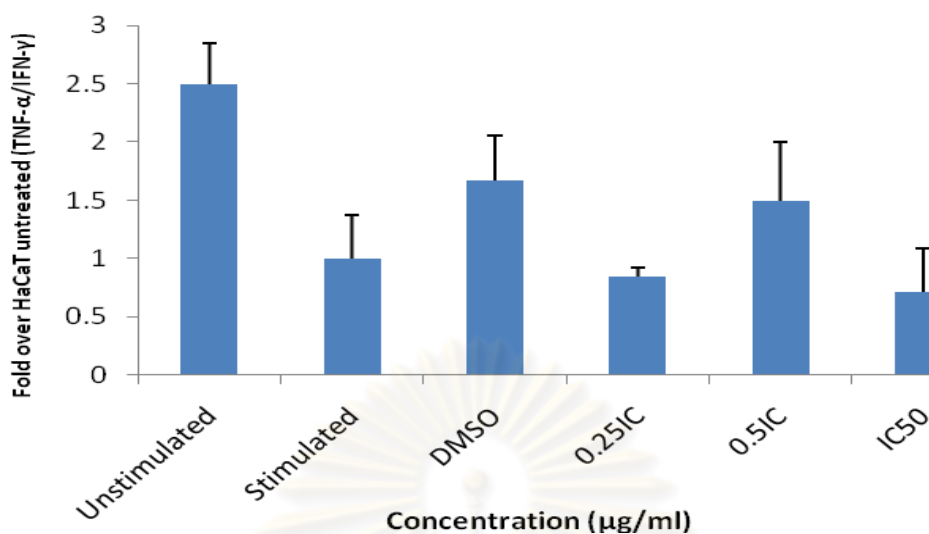
0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับซ้ำที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับซ้ำที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.17 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.675 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.35 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.7 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO
 4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$
 5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$
 6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.18 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.675 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.35 µg/ml) และ IC₅₀ (6.7 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO

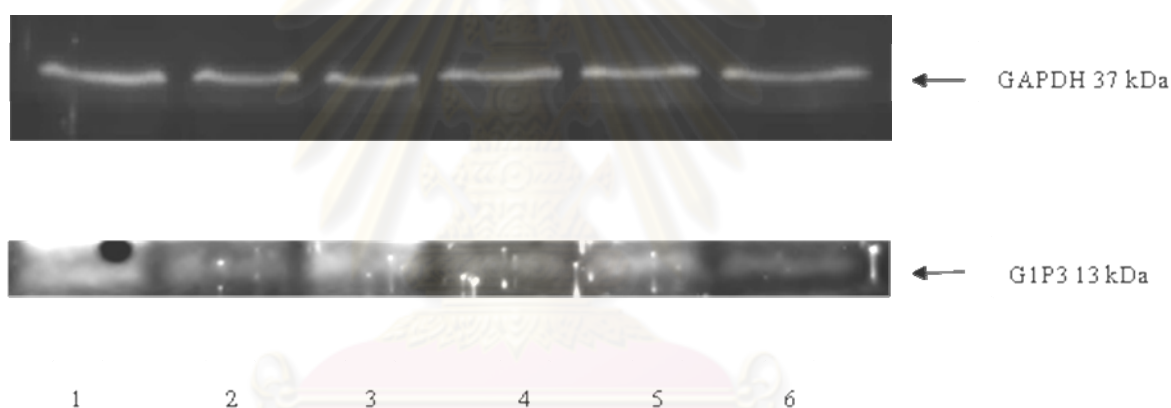
0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC₅₀

4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Interferon inducible gene 6-16 (G1P3)

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ G1P3 เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยจากขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ มีการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.19 ถึงภาพที่ 4.24



ภาพที่ 4.19 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน G1P3 ในเซลล์ HaCaT

เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

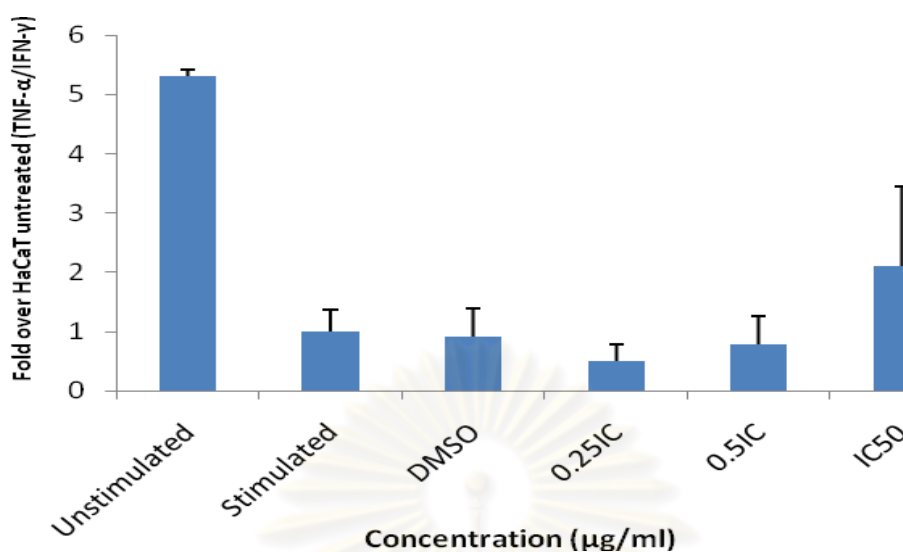
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.20 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน G1P3 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับ สารสกัดน้อยหน้าจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α และ IFN-γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.21 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน G1P3 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดชา จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.575 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.15 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.3 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

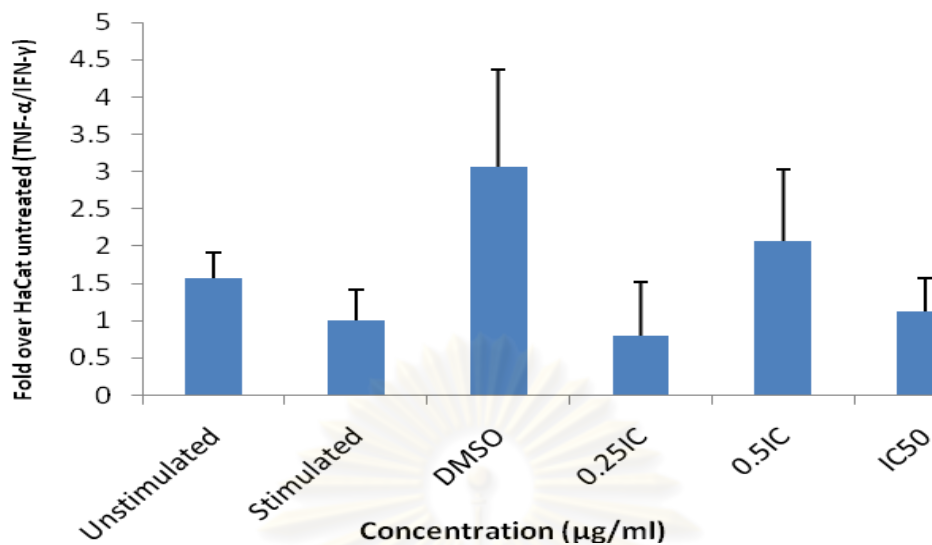
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.22 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน G1P3 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับ สารสกัดฆ่าจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

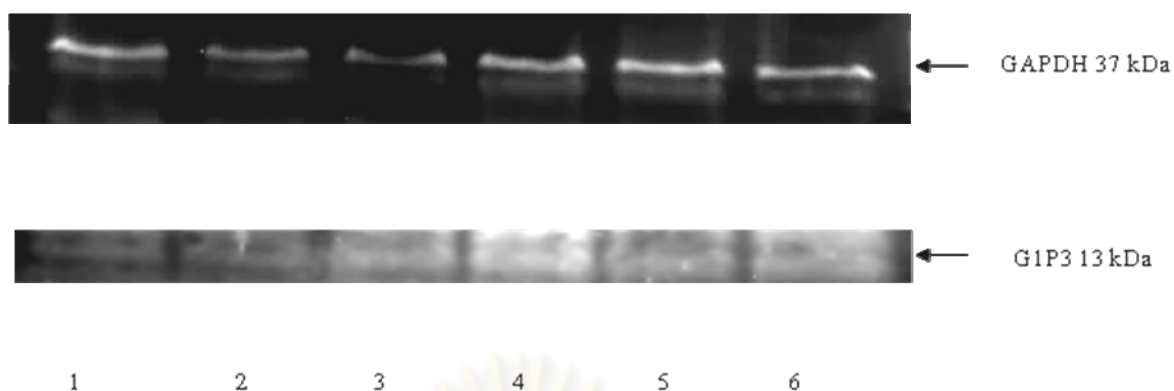
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัด สมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063%

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับค่าที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับค่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับค่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.23 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน G1P3 ในเซลล์ HaCaT

เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.675 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.35 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.7 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

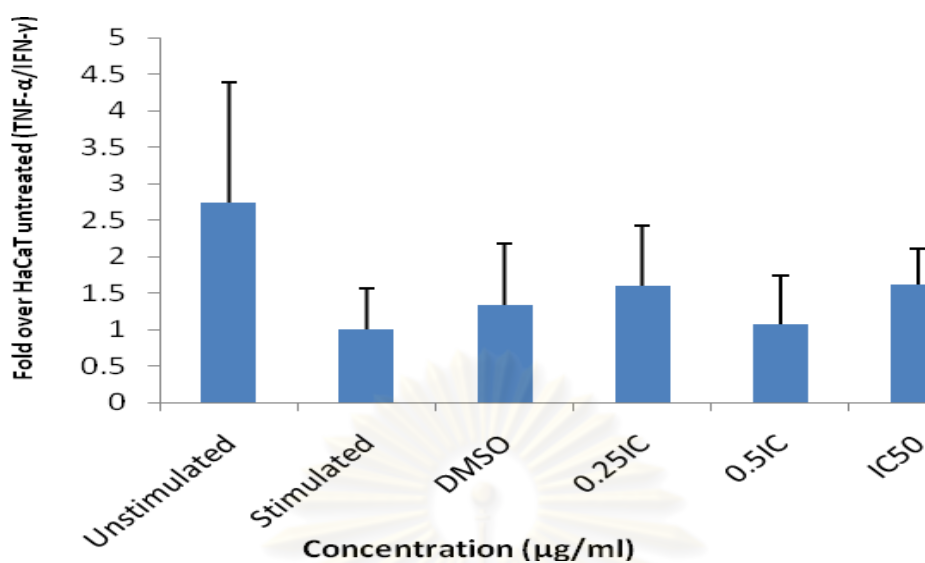
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.24 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน G1P3 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับ สารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.675 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.35 µg/ml) และ IC₅₀ (6.7 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067%

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC₅₀

4.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Caspase 9

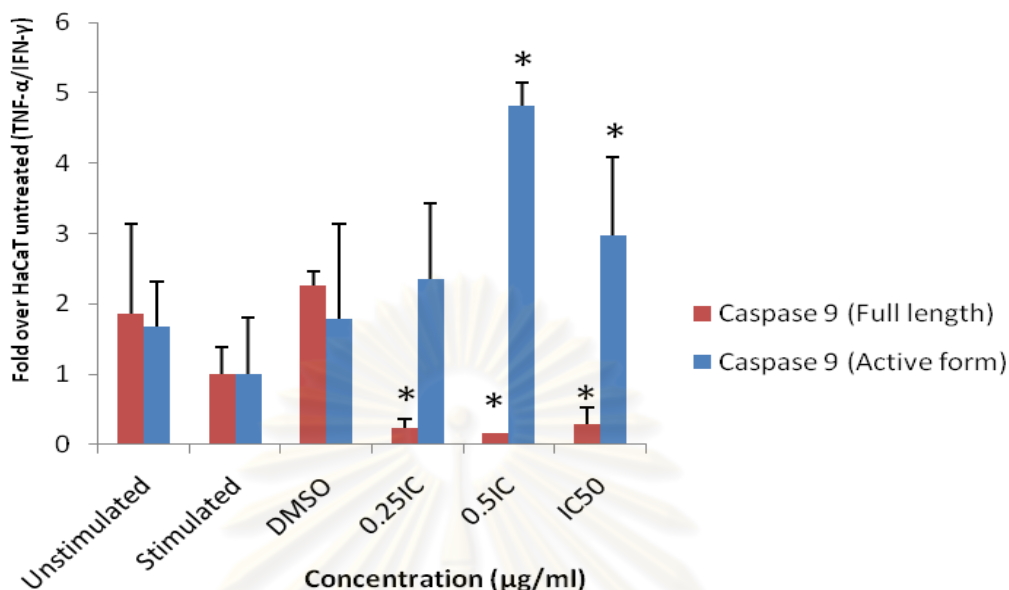
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนของ Caspase 9 เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 แบบ Full length ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และสารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 แบบ Active form ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ภาพที่ 4.25 และภาพที่ 4.26



ภาพที่ 4.25 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.575 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.15 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.3 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

- 1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
- 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
- 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO
- 4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$
- 5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$
- 6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น IC_{50}

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.26 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

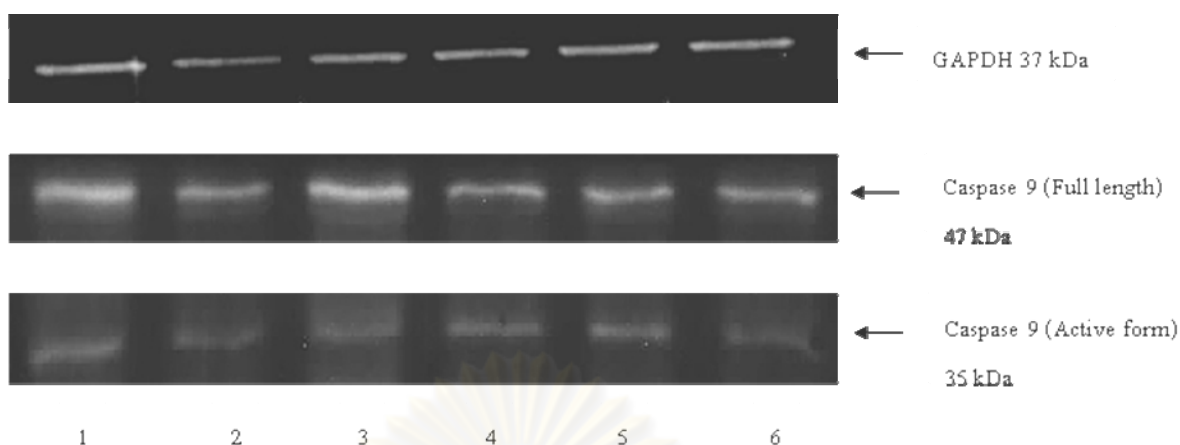
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063%

DMSO
0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25IC₅₀

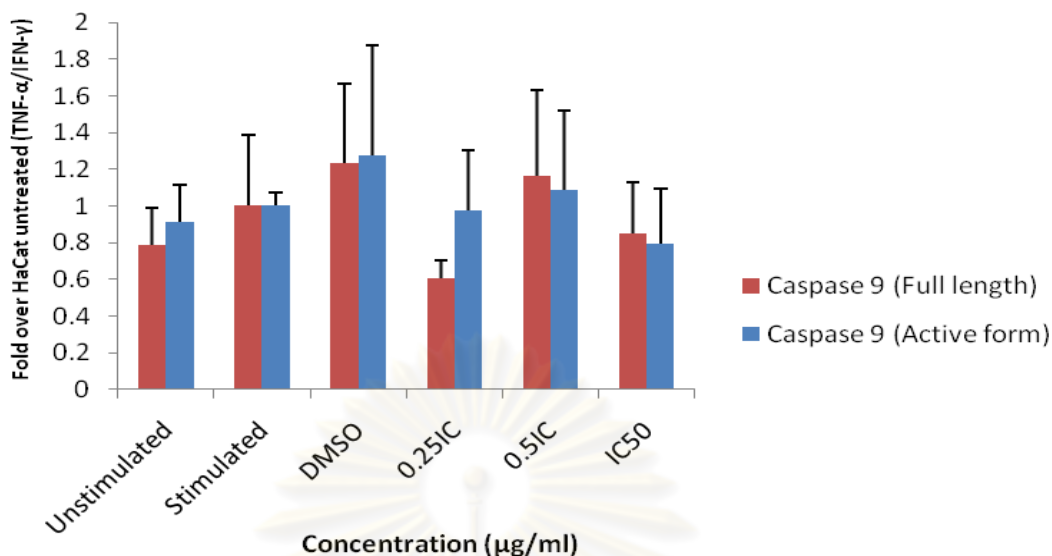
0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.27 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดชา จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.575 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.15 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.3 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
 2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย
 3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO
 4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$
 5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$
 6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.28 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.25IC₅₀ (1.575 μg/ml), 0.5IC₅₀ (3.15 μg/ml) และ IC₅₀ (6.3 μg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

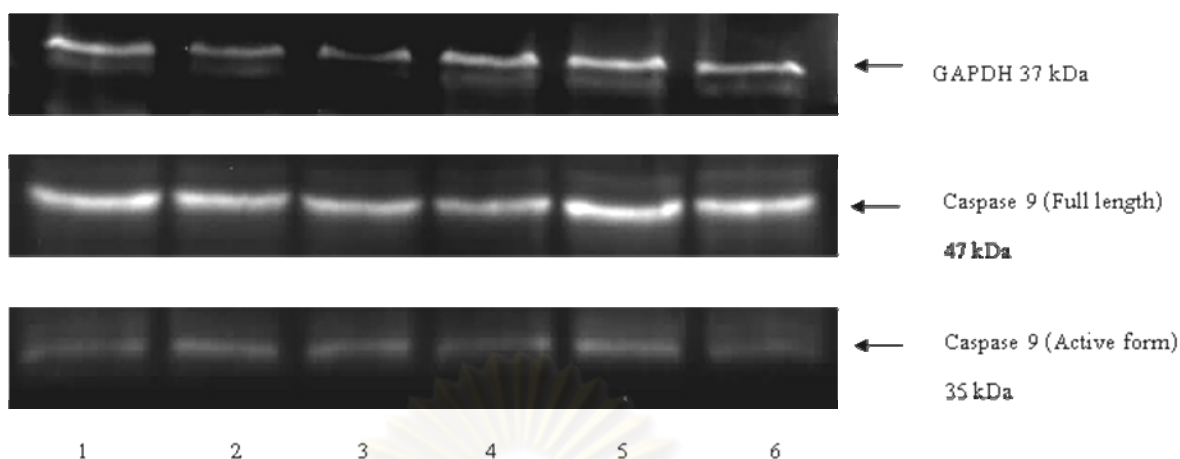
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

0.25IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀

0.5IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀

IC₅₀ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับชาที่ความเข้มข้น IC₅₀



ภาพที่ 4.29 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้น จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.675 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.35 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.7 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

1 = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

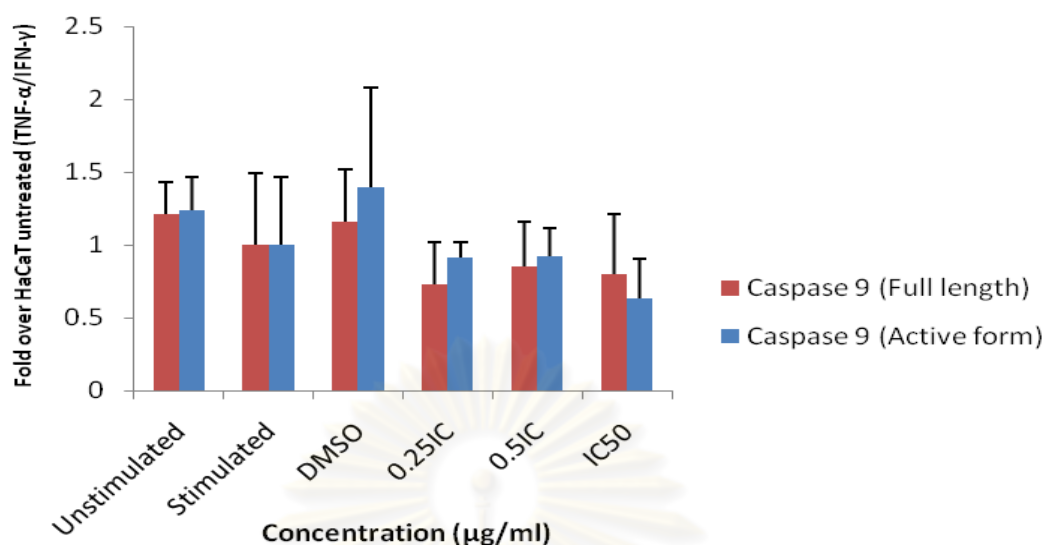
2 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

3 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0067% DMSO

4 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

5 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

6 = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.30 กราฟผลการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดขมิ้นจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.675 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.35 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.7 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Western blot

Unstimulated = เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

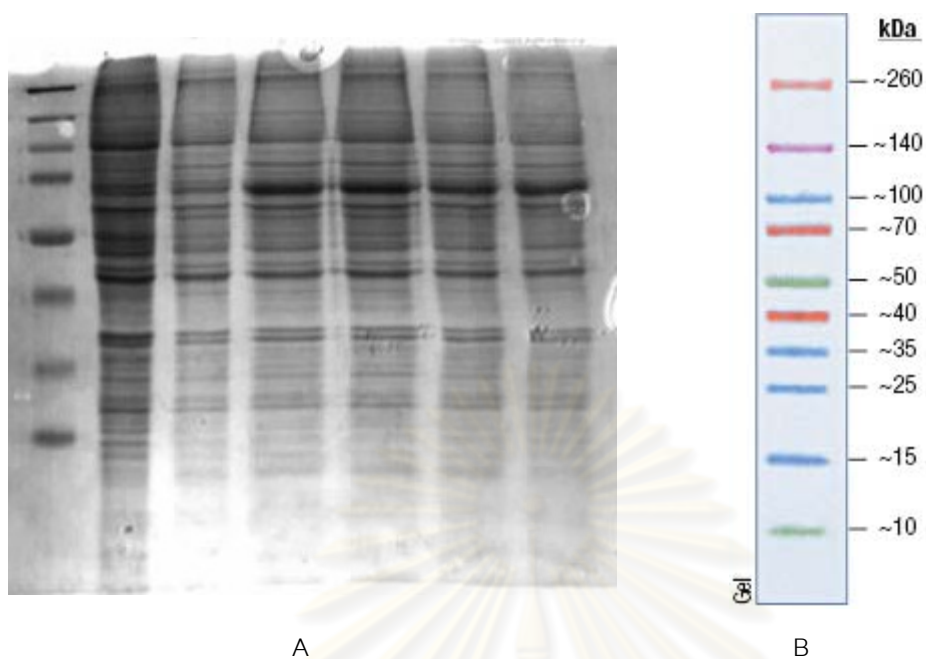
Stimulated = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

DMSO = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับ 0.0063% DMSO

$0.25IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

$0.5IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

IC_{50} = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับขมิ้นที่ความเข้มข้น IC_{50}



ภาพที่ 4.31 (A) โปรตีนตัวอย่างที่นำมาแยกบน SDS-PAGE และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue G แสดงให้เห็นว่า ปริมาณโปรตีนที่นำมา load นั้นมีปริมาณไม่แตกต่างกัน
(B) Broad Range Protein Molecular Weight Markers

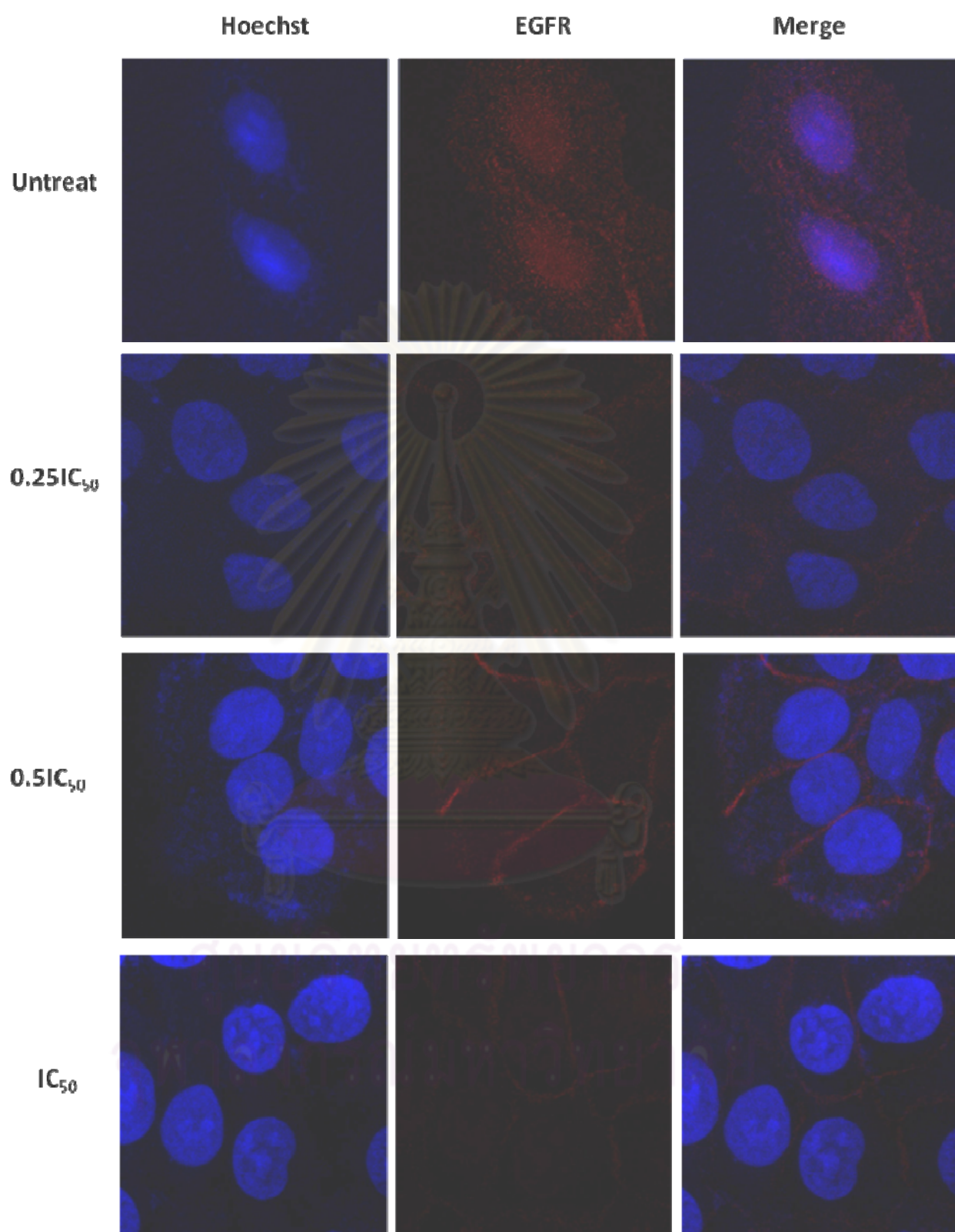
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ EGFR เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน EGFR ได้ แสดงดังภาพที่ 4.32



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.32 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน EGFR ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน้า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.575 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.15 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.3 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

Untreat = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

$0.25IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

$0.5IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

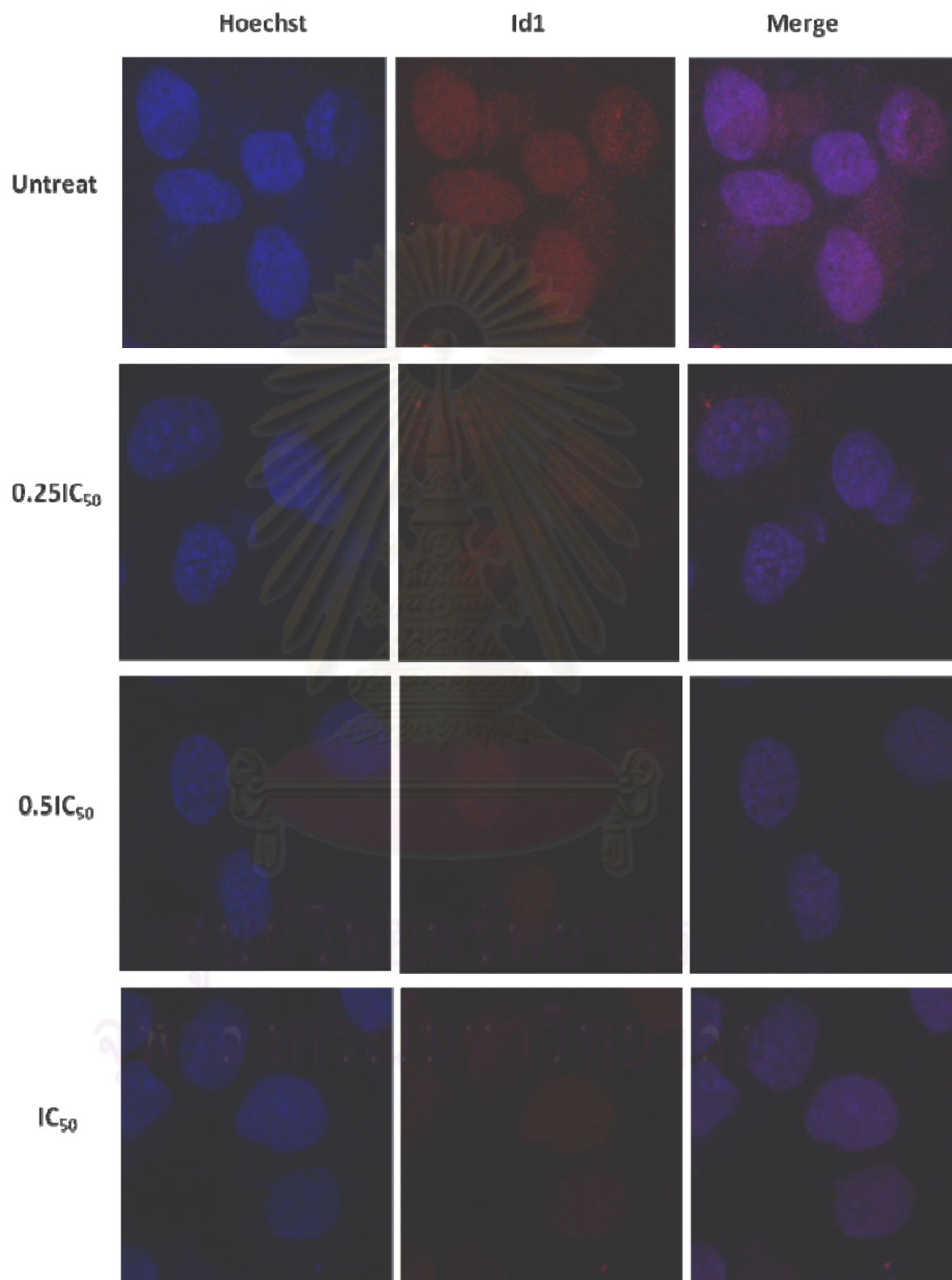
IC_{50} = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน้าที่ความเข้มข้น IC_{50}

4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Inhibitor of differentiation or DNA binding-1 (Id1) ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Id1 เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Id1 ได้แสดงดังภาพที่ 4.33



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.33 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Id1 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ (1.575 $\mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ (3.15 $\mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} (6.3 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

Untreat = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

$0.25IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น

$0.25 IC_{50}$

$0.5IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น

$0.5 IC_{50}$

IC_{50} = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น

IC_{50}

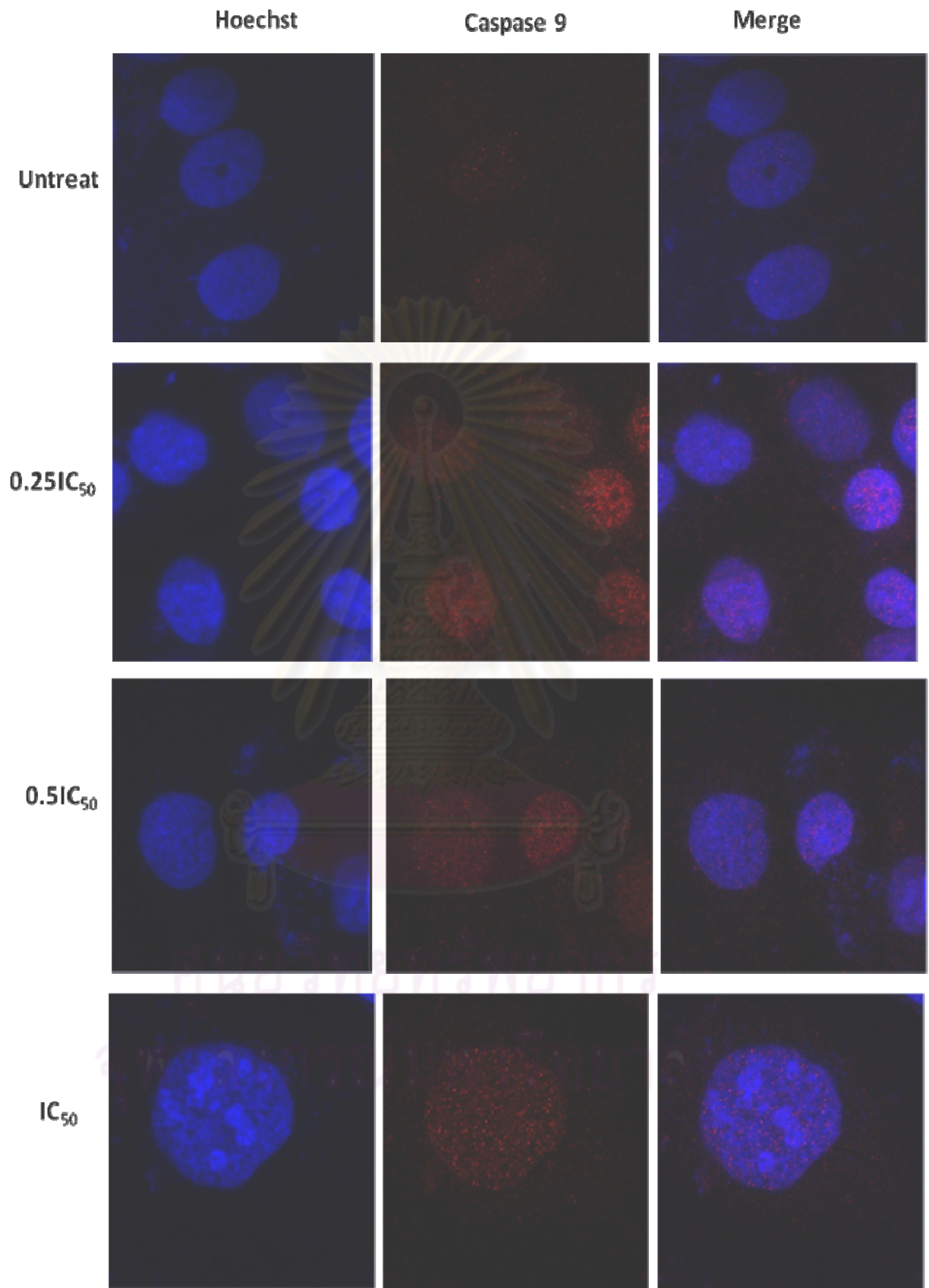
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Caspase 9 ด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Caspase 9 เมื่อทดสอบในเซลล์ HaCaT ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทดสอบกับสารสกัดขมิ้น, ข่า และน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀, 0.5 IC₅₀ และ IC₅₀ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 μ g/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 μ g/ml) และ IC₅₀ (6.3 μ g/ml) สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ได้แสดงดังภาพที่ 4.34



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.34 แสดงผลการแสดงออกในระดับโปรตีนของโปรตีน Caspase 9 ในเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบกับสารสกัดน้อยหน่า จากตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น $0.25IC_{50}$ ($1.575 \mu\text{g/ml}$), $0.5IC_{50}$ ($3.15 \mu\text{g/ml}$) และ IC_{50} ($6.3 \mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธี Immunocytochemistry และใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดด้วยแสงเลเซอร์

Untreat = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และไม่ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย

$0.25IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น $0.25 IC_{50}$

$0.5IC_{50}$ = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น $0.5 IC_{50}$

IC_{50} = เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α และ IFN- γ และทดสอบกับน้อยหน่าที่ความเข้มข้น IC_{50}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

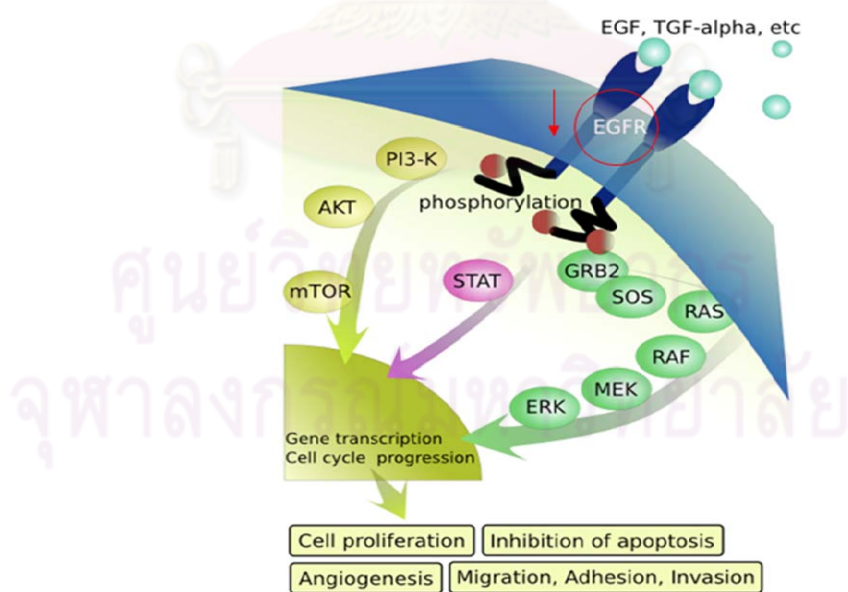
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการแสดงออกระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์พบว่า สารสกัดจากใบน้อยหน่า สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน EGFR ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) และ Id1 ที่ความเข้มข้น 0.25 IC₅₀ (1.575 µg/ml), 0.5 IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) ได้ อีกทั้งสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ที่ความเข้มข้น 0.5 IC₅₀ (3.15 µg/ml) และ IC₅₀ (6.3 µg/ml) ได้ นั่นแสดงว่าสารสกัดจากน้อยหน่ามีฤทธิ์ในการต้านโรคสะเก็ดเงินที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ได้

อภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินของสารสกัดสมุนไพรไทยนั้น ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง คือเซลล์ HaCaT เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนังมนุษย์ที่มีอัตราการแบ่งตัวที่เร็วกว่าปกติคล้ายกับผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน จึงเป็นเซลล์ที่นิยมใช้เป็น In vitro model สำหรับการศึกษาในโรคนี้ โดยผู้วิจัยใช้เซลล์ HaCaT เพื่อใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรไทยที่ออกฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินในการแสดงออกระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ อีกทั้งผู้วิจัยทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF- α และ IFN- γ (40, 50) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น โดยไซโตไคน์นี้จะไปกระตุ้น adhesion molecules เช่น ICAM-1, V-CAM-1 หรือ E-selectin ไปเรียกให้ T cell มาในบริเวณนี้ ก่อให้เกิดการอักเสบ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด และเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ keratinocyte ผิดปกติ และพบว่ามีปริมาณสูงในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน โดยทำการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย ซึ่งประกอบไปด้วย ข่า ขมิ้น และน้อยหน่า เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปกติแล้วเซลล์ HaCaT จะใช้เวลาในการแบ่งตัวประมาณ 16 ชั่วโมง ผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะครอบคลุมเวลาที่

ใช้ในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ ก่อนหน้านี้มีรายงานของคุณวิสาข์ ทองระภาค ซึ่งเกี่ยวกับ TGF- α ซึ่งเป็น growth factor ชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ EGF family ว่ามีหน้าที่หลักในการควบคุมการพัฒนา และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนัง (150) ซึ่ง TGF- α นั้นเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคผิวหนังที่มีลักษณะการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังที่สูงขึ้น รวมทั้งในโรคสะเก็ดเงินด้วย (151, 152) พบว่าสารสกัดจากข่าเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TGF- α ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะใช้สารสกัดสมุนไพรไทยมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ อันประกอบไปด้วยโปรตีน EGFR, Id1, Caspase 9, E2A และ G1P3

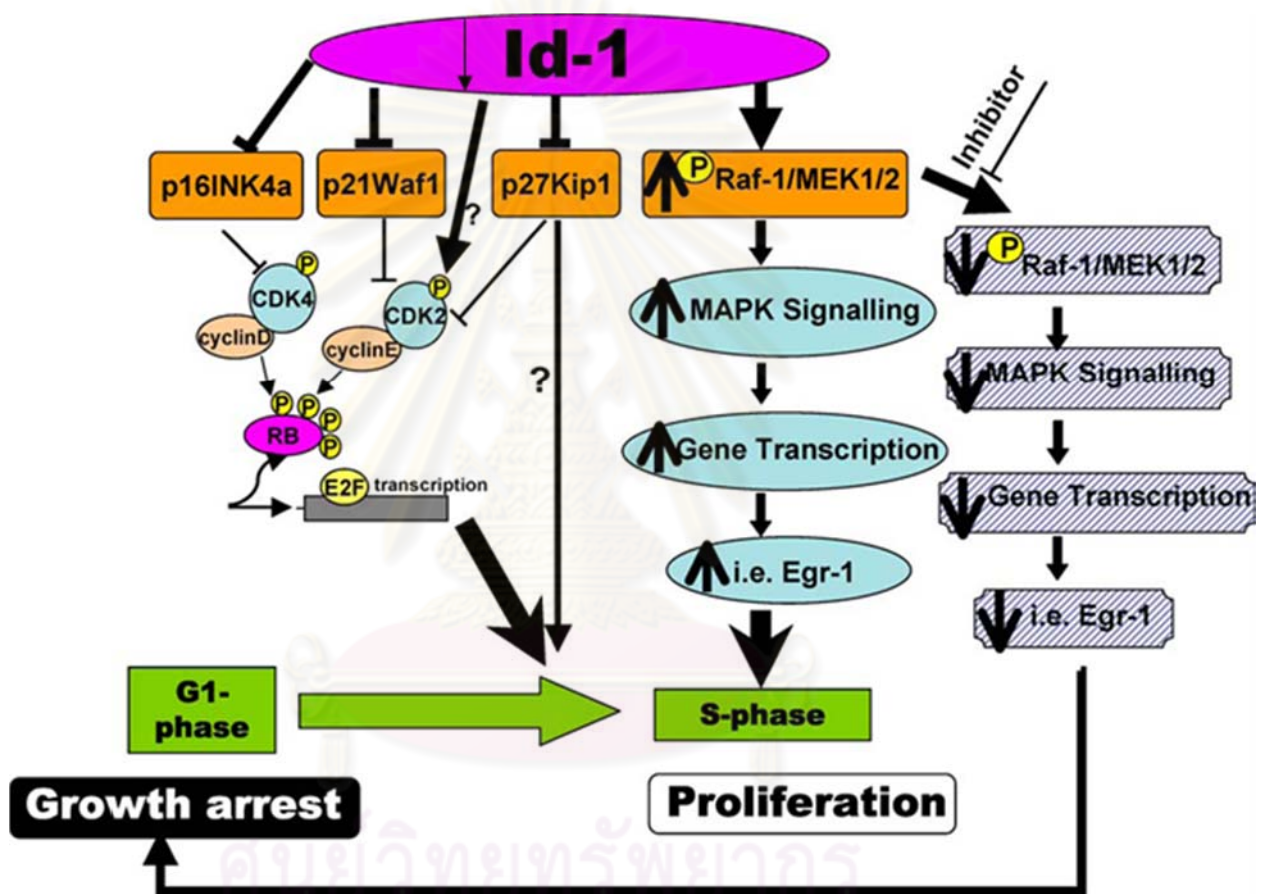
จากผลการวิจัยพบว่า สารสกัดจากน้อยหน่าในตัวทำละลายเอทานอล มีฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินในระดับโปรตีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การแปรรูปเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ พบว่าสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน EGFR และ Id1 ได้ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



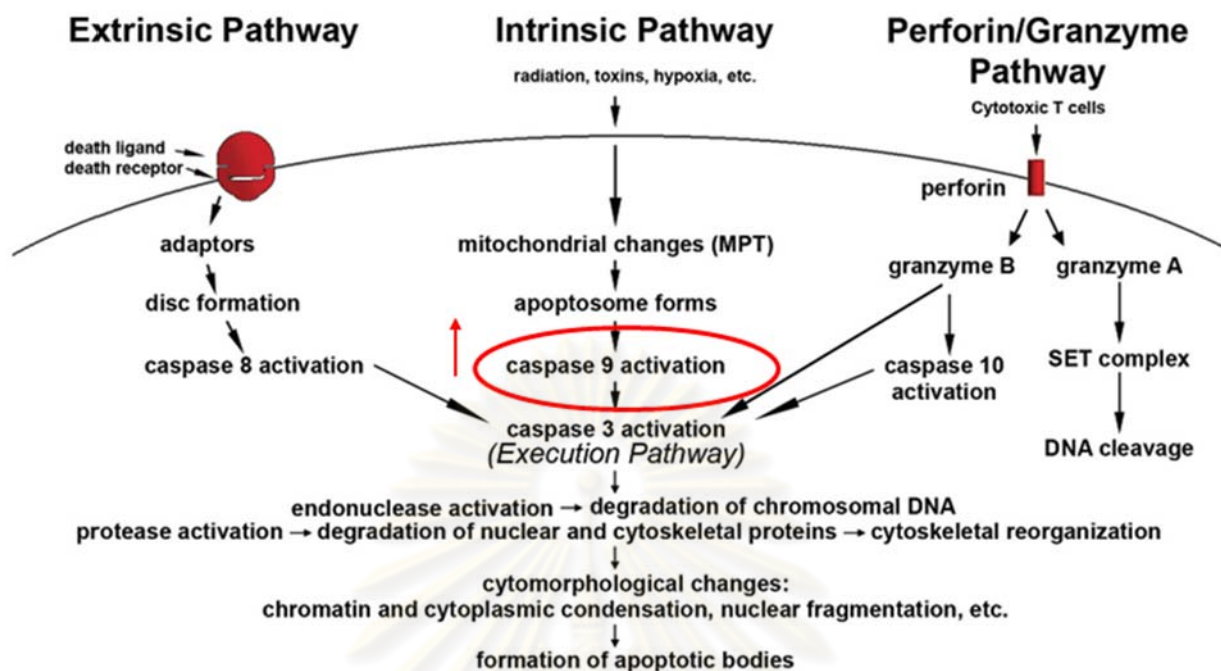
ภาพที่ 5.1 แสดงกลไกการทำงานของ EGFR เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดน้อยหน่า

ดัดแปลงมาจาก: <http://knol.google.com/>

สารสกัดจากน้อยหน่าในตัวทำละลายเอทานอลสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน EGFR ได้ จึงมีผลทำให้ การจับกันของ GRB2 และ SOS ลดลง และทำให้เกิด Phosphorylation ลดลง เกิดการส่งสัญญาณผ่านทาง MAPK pathway ลดน้อยลง ส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลดลง เซลล์เกิดการแปรรูปมากขึ้น และเกิดการต้านการตายแบบอะพอพโทสิสลดน้อยลง ในโรคสะเก็ดเงิน



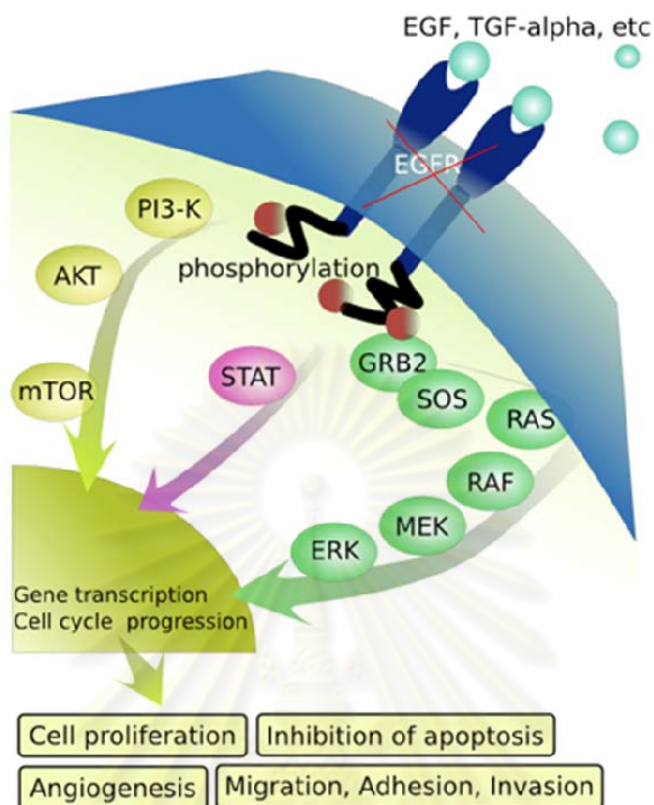
ภาพที่ 5.2 แสดงกลไกการทำงานของ Id1 เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดน้อยหน่า (139) และสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอล สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน Id1 ได้ โดยไปลดการส่งสัญญาณผ่านทาง MAPK pathway ด้วยเช่นกัน ทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนลดน้อยลง เกิดการแปรรูปมากขึ้น และเกิดการต้านการตายแบบอะพอพโทสิสลดน้อยลงในโรคสะเก็ดเงิน



ภาพที่ 5.3 แสดงกลไกการทำงานของ Caspase 9 เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดน้อยหน่า (122)

ในด้านการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์พบว่า สารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอล สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Caspase 9 แบบ active form ได้ นั่นแสดงว่าสารสกัดน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอลสามารถไปกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ โดยผ่านทาง Intrinsic pathway มีผลทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสมากขึ้นในโรคสะเก็ดเงิน

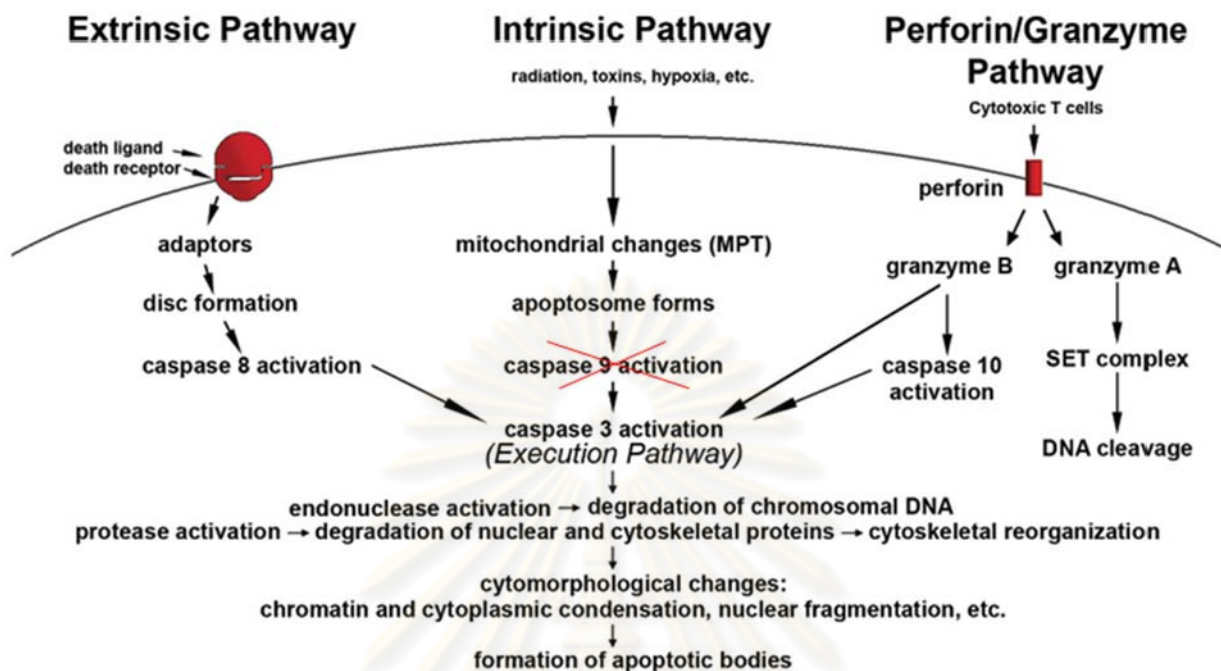
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.4 แสดงกลไกการทำงานของ EGFR เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดชาหรือขมิ้น
ดัดแปลงมาจาก: <http://knol.google.com/>

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากชา และขมิ้นจากตัวทำละลายเอทานอล ไม่สามารถลดการส่งสัญญาณผ่านทาง MAPK pathway ได้ ทำให้ไม่สามารถต้านการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ไม่สามารถทำให้เกิดการแปรรูปของเซลล์มากขึ้น และไม่สามารถไปกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทสิสมากยิ่งขึ้นในโรคสะเก็ดเงิน

ศูนย์วิจัยทางการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.5 แสดงกลไกการทำงานของ Caspase 9 เมื่อทำการ treat ด้วยสารสกัดชาหรือขมิ้น

(122)

ในด้านการตายแบบอะพอพโทสิสนั้น สารสกัดชา และขมิ้นจากตัวทำละลายเอทานอล ก็ไม่สามารถเพิ่มการส่งสัญญาณผ่านทาง Intrinsic pathway ของ Caspase 9 ได้ ทำให้ไม่สามารถเพิ่มการตายแบบอะพอพโทสิสได้ในโรคสะกดเงิน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากน้อยหน่าจากตัวทำละลายเอทานอล สามารถต้านโรคสะกดเงินต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การแปรรูปของเซลล์ และการตายแบบอะพอพโทสิสของเซลล์ได้ ในอนาคตคาดว่าจะควรทำการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรไทย โดยทำการแยกสารออกฤทธิ์ แล้วนำมาดูการแสดงออกของโปรตีน เพื่อให้ได้ผลที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้นสารสกัดสมุนไพรไทย อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคสะกดเงินที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และมีความปลอดภัยสูงอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ทำการแยกสารออกฤทธิ์ต่างๆของสารสกัดสมุนไพรวไทย ทำให้ไม่ทราบว่าสารออกฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงินนั้น เกิดจากสารออกฤทธิ์ของ Quercetin เพียงตัวเดียวหรือไม่ ดังนั้นควรทำการแยกสารออกฤทธิ์ ซึ่งอาจจะใช้เทคนิค HPLC (High-performance liquid chromatography) จะได้ทราบว่าฤทธิ์การต้านโรคสะเก็ดเงินนั้นมีฤทธิ์มาจากสารออกฤทธิ์ตัวใด เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ และชัดเจนมากยิ่งขึ้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- (1) Nestle, F.C. Mechanisms of psoriasis. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 1 (2004): 315-319.
- (2) Gottlieb, A.B. Recombinantly Engineered Human Proteins. Transforming the Treatment of Psoriasis. Clinical Immunology 105 (2002): 105-116.
- (3) Jillson, O.F. Andrews' diseases of the skin, clinical dermatology. Journal of the American Academy of Dermatology 6 (1982): 966-967.
- (4) สาธารณสุข, กระทรวง. สถาบันโรคผิวหนัง. สถิติโรคของสถาบันโรคผิวหนัง. สถาบันโรคผิวหนัง (2552).
- (5) Gladman, D.D. Natural history of psoriatic arthritis. Baillière's Clinical Rheumatology 8 (1994): 379-394.
- (6) Krueger ,G., and Ellis, C.N. Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. Journal of the American Academy of Dermatology 53 (2005): S94-S100.
- (7) Bowcock, A.M., and Krueger, J.G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. Nat Rev Immunol 5 (2005): 699-711.
- (8) Prinz. Which T cells cause psoriasis? Clinical and Experimental Dermatology 24 (1999): 291-295.
- (9) Zenz, R.K., Florin,L., Hummerich,L., and Mehic.D. what cause psoriasis.
- (10) Krueger, G., Koo, J., Lebwohl , M., Menter, A., Stern, R.S., and Rolstad T. The Impact of Psoriasis on Quality of Life: Results of a 1998 National Psoriasis Foundation Patient-Membership Survey. Arch Dermatol 137 (2001): 280-284.
- (11) Jowett, S., and Ryan, T. Skin disease and handicap: An analysis of the impact of skin conditions. Social Science & Medicine 20 (1985): 425-429.
- (12) Capon, F., Semprini, S., Dallapiccola, B., and Novelli, G. Evidence for Interaction between Psoriasis-Susceptibility Loci on Chromosomes 6p21 and 1q21. The

- American Journal of Human Genetics 65 (1999): 1798-1800.
- (13) Sagoo, G.S., Cork, M.J., Patel, R., and Tazi-Ahnini, R. Genome-wide studies of psoriasis susceptibility loci: a review. Journal of Dermatological Science 35 (2004): 171-179.
- (14) Makredes, M., Robinson, D., Bala, M., and Kimball, A.B. The burden of autoimmune disease: A comparison of prevalence ratios in patients with psoriatic arthritis and psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 61 (2009): 405-410.
- (15) Schlaak, J.F., et al. T Cells Involved in Psoriasis Vulgaris Belong to the Th1 Subset. J Investig Dermatol 102 (1994): 145-149.
- (16) Valdimarsson, H., Baker, B.S., Jónsdóttir, I., Powles, A., and Fry, L. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? Immunology Today 16 (1995): 145-149.
- (17) Nograles, K.E., Davidovici, B., and Krueger, J.G. New Insights in the Immunologic Basis of Psoriasis. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery 29 (2010): 3-9.
- (18) van de Kerkhof, P.M. Options for the treatment of psoriasis: a multifactorial approach. Clinics in Dermatology 26: 419-423.
- (19) Walsh, D.S., et al. Psoriasis is characterized by altered epidermal expression of caspase 14, a novel regulator of keratinocyte terminal differentiation and barrier formation. Journal of Dermatological Science 37 (2005): 61-63.
- (20) Canavese, M., Altruda, F., Ruzicka, T., and Schaubert, J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of psoriasis--A possible target for novel therapies? Journal of Dermatological Science 58 (2010): 171-176.
- (21) Flisiak, I., et al. Effect of psoriasis activity on VEGF and its soluble receptors concentrations in serum and plaque scales. Cytokine 52 (2010): 225-229.

- (22) Wolfram, J.A, et al. Keratinocyte but Not Endothelial Cell-Specific Overexpression of Tie2 Leads to the Development of Psoriasis. The American Journal of Pathology 174 (2009): 1443-1458.
- (23) Duan, H., et al. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis. Journal of Dermatological Science 26 (2001): 119-124.
- (24) Pietrzak, A.T., et al. Cytokines and anticytokines in psoriasis. Clinica Chimica Acta 394 (2008): 7-21.
- (25) Tarutani, M., et al. Neutrophil-dominant psoriasis-like skin inflammation induced by epidermal-specific expression of Raf in mice. Journal of Dermatological Science 58 (2010): 28-35.
- (26) Möller, I., et al. Effectiveness of chondroitin sulphate in patients with concomitant knee osteoarthritis and psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Osteoarthritis and Cartilage 18 (2010): S32-S40.
- (27) Leal, L., Ribera, M., and Daudén, E. Psoriasis and HIV Infection. Actas Dermo-Sifiligráficas (English Edition) 99 (2008): 753-763.
- (28) Menter, A., et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 3. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapies. Journal of the American Academy of Dermatology 60 (2009): 643-659.
- (29) Menter, A., et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 5. Guidelines of care for the treatment of psoriasis with phototherapy and photochemotherapy. Journal of the American Academy of Dermatology 62 (2010): 114-135.
- (30) Menter, A., et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. Journal of the

- American Academy of Dermatology 61 (2009): 451-485.
- (31) Cornell, R.C. CLINICAL TRIALS OF TOPICAL CORTICOSTEROIDS IN PSORIASIS: CORRELATIONS WITH THE VASOCONSTRICTOR ASSAY. International Journal of Dermatology 31 (1992): 38-40.
- (32) Stein, L. Clinical studies of a new vehicle formulation for topical corticosteroids in the treatment of psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 53 (2005): S39-S49.
- (33) Dodd, W. TARS : their role in the treatment of psoriasis. Dermatologic clinics 11 (1993): 131-135.
- (34) Strong, A.M., Horrobin, D.F., Manku, M.S., and Huang, Y.S. Prostaglandin precursors in plasma phospholipids of patients with psoriasis: Effects of treatment with coal tar. Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine 14 (1984): 185-190.
- (35) Swinehart, J.M., and Lowe, N.J. UVABA therapy for psoriasis: Efficacy with shortened treatment times with the combined use of coal tar, anthralin, and metal halide ultraviolet machines. Journal of the American Academy of Dermatology 24 (1991): 594-597.
- (36) Schooten, F.G. Coal tar therapy. Is it carcinogenic? Drug Saf 15 (1996): 374-7.
- (37) Kragballe, K .I. Calcipotriol. A new topical antipsoriatic. Dermatol Clin 11 (1993): 137-141.
- (38) Boer, J., and Smeenk, G. Effect of short-contact anthralin therapy on ultraviolet B irradiation of psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 15 (1986): 198-204.
- (39) Lowe, N.J., Ashton, R.E., Koudsi, H., Verschoore, M., and Schaefer, H. Anthralin for psoriasis: Short-contact anthralin therapy compared with topical steroid and conventional anthralin. Journal of the American Academy of

- Dermatology 10 (1984): 69-72.
- (40) Müller, K. Antipsoriatic and proinflammatory action of anthralin : Implications for the role of oxygen radicals. Biochemical Pharmacology 53 (1997): 1215-21.
- (41) Carretero, G., et al. Guidelines on the Use of Methotrexate in Psoriasis. Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition) 101 (2010): 600-613.
- (42) Roenigk, J.H., Auerbach, R., Maibach, H., Weinstein, G., and Lebwohl, M. Methotrexate in psoriasis: Consensus conference. Journal of the American Academy of Dermatology 38 (1998)1: 478-485.
- (43) Lowe, N.J., Lazarus, V., and Matt, L. Systemic retinoid therapy for psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 19 (1988): 186-191.
- (44) Peck, G.D. The retinoids In: Freedberg IM, Eisen AZ, eds. Fitzpatrick's dermatology in general medicine 2 (1999): 2853-2861.
- (45) Christophers, E., Mrowietz, U., Henneicke, H.H., Färber, L., and Welzel, D. participants in the German multicenter s. Cyclosporine in psoriasis: A multicenter dose-finding study in severe plaque psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 26 (1992): 86-90.
- (46) Nousari, H. A. Immunosuppressive and immunomodulatory drugs. In: Freedberg IM, Eisen AZ, eds. Fitzpatrick's dermatology in general medicine 2: 2853-61.
- (47) Rebora, A. Cyclosporine A in psoriasis. Clinics in Dermatology 9: 515-522.
- (48) Rosmarin, D.M., Lebwohl, M., Elewski, B.E., and Gottlie, A.B. Cyclosporine and psoriasis: 2008 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. Journal of the American Academy of Dermatology 62 (2010): 838-853.
- (49) Mendonça, C.O., and Burden, A.D. Current concepts in psoriasis and its treatment. Pharmacology & Therapeutics 99 (2003): 133-147.
- (50) Tang, L., et al. The inhibitory effect of VitD3 on proliferation of keratinocyte cell line HACAT is mediated by down-regulation of CXCR2 expression. Clinical

and Experimental Dermatology 28 (2003): 416-419.

- (51) พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สุริยบรรณ, 2539.
- (52) เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย: สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2549.
- (53) Chudiwal, A., Jain, D., and Somani, R. Alpinia galanga Willd.– An overview on phyto-pharmacological properties. Indian Journal of Natural Products and resources 1 (2010): 143-149.
- (54) Bao, Z.T. Identification of the chemical components of two Alpinia species. Article in Chinese 13 (1988): 34-36,63.
- (55) FE, D. Eugenol, a prototype phenolic prostaglandin synthetase inhibitor, it's anti-inframmatory activity, it's effects on sheep vestibular. Univ Rochester (1979): 191.
- (56) Sundari, S. V., Dayabaran, D., and Mohamed, P.N. Studies on the anti-inflammatory activity of Gugula Thiktha Kashayam (GTK). Indian drugs 38 (2001): 380-382.
- (57) Venkataranganna, M.G., Mitra, S.K., and Anturlikar, S.D. Anti-inflammatory activity of JCB, a polyherbal formation. Indian drugs 37 (2000): 543-546.
- (58) Matsuda, H., Pongpiriyadacha, Y., Morikawa, T., Ochi, M., and Yoshikawa, M. Gastroprotective effects of phenylpropanoids from the rhizomes of Alpinia galanga in rats: structural requirements and mode of action. European Journal of Pharmacology 471 (2003): 59-67.
- (59) Ogiso, A.K. Antiulcer agents from Alpinia seeds. Japan Kokai 74 (1974): 3.
- (60) Chatchawanchonteeera, A.S., and Trakranrungsie, N. Antifungal activity of Alpinia galanga and Allium ascalonicum extract. Thai J Pharmacol 25 (2003): 85.
- (61) Ficker, C.S., Susiarti, S., Leaman, D.J., Irawati, C., and Arnason, J.T. Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah

- (Indonesian Borneo). J Ethnopharmacol 85 (2003): 289-293.
- (62) Sindhuphak, R. .T, Gindamporn, A., Sindhuphak, W.. The antifungal activity of some Thai plants. Thai J Hlth Resch 6 (1992): 9-20.
- (63) ดำรง พงศ์พุทธชาติ. ผลยับยั้งของพืชสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง. รวมบทความวิจัยการแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคต (2543).
- (64) สมณีย์ ศุขรุ่งเรือง. การพัฒนาชาเมื่อใช้เป็นยารักษาโรคกลาก ภาค 1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราและพิษของชาสกัด. หนังสือรวบรวมผลงานการวิจัย โครงการพัฒนาการใช้สมุนไพรและยาไทยทางคลินิก (2525-2536).
- (65) Murakami, H.K. Possible anti-tumour promoting properties of traditional Thai food items and some of their active constituents Asia Pacific. J Clin Nutr 3 (1994): 185-191.
- (66) Xu, S., et al. (1'S)-Acetoxychavicol acetate and its enantiomer inhibit tumor cells proliferation via different mechanisms. Chemico-Biological Interactions 172 (2008): 216-223.
- (67) Moffatt, J., et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. Carcinogenesis 21 (December 2000): 2151-2157.
- (68) Kolev, T.M., Velcheva, E.A., Stamboliyska, B.A., and Spitteller, M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. International Journal of Quantum Chemistry 102 (2005): 1069-1079.
- (69) Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F., and Torti, S. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. Cellular and Molecular Life Sciences 65 (2008): 1631-1652.
- (70) Naik, S.R., Thakare, V.N., and Patil, S.R. Protective effect of curcumin on

experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: Evidence of its antioxidant property. Experimental and Toxicologic Pathology. In Press, Corrected Proof.

- (71) Madden, K., et al. Proteomics-based approach to elucidate the mechanism of antitumor effect of curcumin in cervical cancer. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 80 (2009): 9-18.
- (72) Kutluay, S.B., Doroghazi, J., Roemer, M.E., and Triezenberg, S.J. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. Virology 373 (2008): 239-247.
- (73) Shukla, P.K., Khanna, V.K., Khan, M.Y., and Simal, R.C. Protective effect of curcumin against lead neurotoxicity in rat. Human & Experimental Toxicology 22 (December 2003): 653-658.
- (74) Yang F, et al. Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid in Vivo. Journal of Biological Chemistry 280 (February 2005): 5892-5901.
- (75) Bala, K., Tripathy, B., and Sharma, D. Neuroprotective and Anti-ageing Effects of Curcumin in Aged Rat Brain Regions. Biogerontology 7 (2006): 81-89.
- (76) Wei, L, Laurence, A, and O'Shea, J.J. New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. Seminars in Cell & Developmental Biology 19 (2008): 394-400.
- (77) Xu, Y., et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. Brain Research 1162 (2007): 9-18.
- (78) Ravindran, J., Prasad, S., and Aggarwal, B. Curcumin and Cancer Cells: How

- Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? The AAPS Journal 11 (2009): 495-510.
- (79) Bhakuni, D.S., Tewari, S., and Dhar, M.M. Aporphine alkaloids of annona squamosa. Phytochemistry 11 (1972): 1819-1822.
- (80) Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Juneau, J.P., Bhacca, N.S., Mukherjee, R. Alkaloids from leaves of Annona squamosa. Phytochemistry 18 (1979): 1584-1586.
- (81) Chen, C.Y., et al. (-)-Anonaine induces apoptosis through Bax- and caspase-dependent pathways in human cervical cancer (HeLa) cells. Food and Chemical Toxicology 46 (2008): 2694-2702.
- (82) Chien, S.Y., et al. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. Human & Experimental Toxicology 28 (August 2009): 493-503.
- (83) Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., and Pelzer, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Il Farmaco 56 (2001): 683-687.
- (84) Hämäläinen, R.N., 1 Pia Vuorela,2 Marina Heinonen,3 and Eeva Moilanen. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. Mediators Inflamm (2007): 456-473.
- (85) Graziani, Y., Erikson, E., and Erikson, R.L. The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. European Journal of Biochemistry 135 (1983): 583-589.
- (86) Brown, J.P., and Dietrich, P.S. Mutagenicity of plant flavonols in the

- Salmonella/mammalian microsome test: Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. Mutation Research/Genetic Toxicology 66 (1979): 223-240.
- (87) Hsieh, C.L., Lin, Y.C., Yen, G.C., and Chen, H.Y. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against [alpha]-dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. Food Chemistry 103 (2007): 528-535.
- (88) Sanderson, J., McLauchlan, W.R., and Williamson, G. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced oxidation of the rat lens. Free Radical Biology and Medicine 26 (1999): 639-645.
- (89) Manach, C., et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. FEBS Letters 426 (1998): 331-336.
- (90) Lurje, H.J. EGFR Signaling and Drug Discovery. Oncology 77 (2009)2: 400-10.
- (91) Hemming, A.K., Robinson, B., Quenville, N.F., Liseman, B., and LeRiche, J. Prognostic markers of colorectal cancer : an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. Surg Oncol 51 (1992): 147-152.
- (92) Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Critical Reviews in Oncology/Hematology 19 (1995): 183-232.
- (93) Klapper, L.N., Kirschbaum, M.H., Seta, M., and Yarden, Y. Biochemical and Clinical Implications of the ErbB/HER Signaling Network of Growth Factor Receptors. In: George FVW, George K, editors. Advances in Cancer Research: Academic Press (1999): 25-79.
- (94) Burgess , A.W., et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Mol Cell 12 (2003): 541-52.

- (95) Press, M.F., Lenz, and Heinz-Josef. EGFR, HER2 and VEGF Pathways: Validated Targets for Cancer Treatment. Drugs 67 (2007): 2045-2075.
- (96) Kwatra, M.B., and Cohn, J.A. The ligand binding domain of the epidermal growth factor receptor is not required for receptor dimerization. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1134 (1992): 178-181.
- (97) Lemmon, M.A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. Experimental Cell Research 315 (2009): 638-648.
- (98) EGFR signaling pathway. Dermatology Online Journal 15: 1.
- (99) Kouhara, H., et al. A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signaling Pathway. Cell 89 (1997): 693-702.
- (100) Lowenstein, E.J., et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. Cell 70 (1992): 431-442.
- (101) Koyama, S., Williams, L.T., and Kikuchi, A. Characterization of the interaction of Raf-1 with ras p21 or 14-3-3 protein in intact cells. FEBS Letters 368 (1995): 321-325.
- (102) Liebmann, C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity. Cellular Signalling 13 (2001): 777-785.
- (103) Hill, C.S., and Treisman, R. Transcriptional Regulation by Extracellular signals: Mechanisms and Specificity. Cell 80 (1995): 199-211.
- (104) West, K.A., Castillo, S., and Dennis, P.A. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. Drug Resistance Updates 5 (2002): 234-248.
- (105) Carpenter, C.L., and Cantley, L.C. Phosphoinositide kinases. Current Opinion in Cell Biology 8 (1996): 153-158.
- (106) Rácz, B., et al. PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are

- involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. Regulatory Peptides 145 (2008): 105-115.
- (107) Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 32 (2000): 1123-1136.
- (108) Jin, Q., et al. Differential regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, mitogen-activated protein kinase, and AMP-activated protein kinase pathways during menadione-induced oxidative stress in the kidney of young and old rats. Biochemical and Biophysical Research Communications 315 (2004): 555-61.
- (109) Andl, C.D., et al. EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 287 (December 2004): G1227-G1237.
- (110) Jorissen, R.N., et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Experimental Cell Research 284 (2003): 31-53.
- (111) Bromberg, J.F., and Darnell, J.E. STAT Proteins in Growth Control. In: Joseph RB, editor. Encyclopedia of Cancer. New York: Academic Press (2002):245-252.
- (112) Martin, G.S. Cell signaling and cancer. Cancer cell 4 (2003): 167-174.
- (113) Roskoski, J.R. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. Biochemical and Biophysical Research Communications 331 (2005): 1-14.
- (114) Zhang, X.H, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent Survival Signals. Cancer cell 16 (2009): 67-78.
- (115) Donepudi, M., and Resh, M.D. c-Src trafficking and co-localization with the EGF receptor promotes EGF ligand-independent EGF receptor activation and signaling. Cellular Signalling 20 (2008): 1359-1367.

- (116) Zenz, R.E. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 38 (2006): 1043-1049.
- (117) Bakiri, L., et al. Role of heterodimerization of c-Fos and Fra1 proteins in osteoclast differentiation. Bone 40 (2007): 867-875.
- (118) Angel, P., and Szabowski, A. Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. Biochemical Pharmacology 64 (2002): 949-956.
- (119) Szabowski A, et al. c-Jun and JunB Antagonistically Control Cytokine-Regulated Mesenchymal-Epidermal Interaction in Skin. Cell 103 (2000): 745-755.
- (120) Angel, P., and Hess, J. The Multi-Gene Family of Transcription Factor AP-1. In: Ralph AB, Edward AD, editors. Handbook of Cell Signaling (Second Edition). San Diego: Academic Press (2010): 2059-2068.
- (121) Gerald, D., et al. JunD Reduces Tumor Angiogenesis by Protecting Cells from Oxidative Stress. Cell 118 (2004): 781-794.
- (122) Apoptosis. Frontiers in Bioscience 14 (2009): 4015-4034.
- (123) Kiechle, F.L., and Zhang, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. Clinica Chimica Acta 326 (2002): 27-45.
- (124) Kumar, R, Herbert, P.E., and Warrens, A.N. An introduction to death receptors in apoptosis. International Journal of Surgery 3 (2005): 268-277.
- (125) Yoon, K., Jang, H.D., and Lee, S.Y. Direct interaction of Smac with NADE promotes TRAIL-induced apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications 319 (2004): 649-654.
- (126) Nieminen, A.L. Apoptosis and necrosis in health and disease: Role of mitochondria. In: Kwang WJ, editor. International Review of Cytology: Academic Press (2003): 29-55.
- (127) Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. Mechanisms of caspase activation. Current Opinion in Cell Biology 15 (2003): 725-731.

- (128) Kelly, J.A., Chernajovsky, Y., Gilbert, C.S., Stark, G.R., and Kerr, I.M.
Characterization of a human gene inducible by alpha- and beta-interferons
and its expression in mouse cells. EMBO Journal 5 (1986): 1601-1606.
- (129) Porter, A.Y., Dale, T.C., Gilbert, C.S., Stark, G.R., and Kerr, I.M. Interferon
response element of the human gene 6-16. EMBO Journal 7 (1988): 85-92.
- (130) Tahara, H.K., et al. Increase in expression levels of interferon-inducible genes in
senescent human diploid fibroblasts and in SV40-transformed human
fibroblasts with extended lifespan. Oncogene 11 (1995): 1125-1132.
- (131) Tahara, H., Hara, E., Tsuyama, N., Oda, K., and Ide, T. Preparation of a
Subtractive cDNA Library Enriched in cDNAs Which Expressed at a High
Level in Cultured Senescent Human Fibroblasts. Biochemical and
Biophysical Research Communications 199 (1994): 1108-1112.
- (132) Özören, N., and El-Deiry, W.S. Cell surface Death Receptor signaling in normal
and cancer cells. Seminars in Cancer Biology 13 (2003): 135-147.
- (133) Croteau, D.L., Stierum, R.H., and Bohr, V.A. Mitochondrial DNA repair pathways.
Mutation Research/DNA Repair 434 (1999): 137-148.
- (134) Dhalluin, S., et al. Apoptosis inhibition and ornithine decarboxylase
superinduction as early epigenetic events in morphological transformation of
Syrian hamster embryo cells exposed to 2-methoxyacetaldehyde, a
metabolite of 2-methoxyethanol. Toxicology Letters 105 (1999): 163-175.
- (135) Nakajima-Shimada, J., et al. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by
Trypanosoma cruzi infection. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General
Subjects 1475 (2000): 175-183.
- (136) Dahal, G.R., et al. Caspase-2 cleaves DNA fragmentation factor
(DFF45)/Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD). Archives of
Biochemistry and Biophysics 468 (2007): 134-139.

- (137) Tsuruta, T., Oh-hashii, K., Kiuchi, K., and Hirata, Y. Degradation of caspase-activated DNase by the ubiquitin-proteasome system. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1780 (2008): 793-799.
- (138) Forootan, S.S., et al. Increased Id-1 expression is significantly associated with poor survival of patients with prostate cancer. Human pathology 38 (2007): 1321-1329.
- (139) Apoptosis 9 (2004): 279-289.
- (140) Ouyang, X.W., Ming-Tat, L., Hing, L.W., Sai, W.T., and Wong, Y.C. Id-1 stimulates serum independent prostate cancer cell proliferation through inactivation of p16INK4a/pRB pathway. Carcinogenesis 23 (2001): 721-725.
- (141) Ling, M.W., et al. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. Oncogene 21 (2002): 8498-8505.
- (142) Ling, M.W., Xu, K., Tsao, S.W., and Wong, Y.C. Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. Oncogene 22 (2003): 4498-4508.
- (143) Parrinello, S.L., et al. Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis. J Biol Chem 27 (2001): 39213-39219.
- (144) Tanaka, K.T., et al. Expression of Id1 results in apoptosis of cardiac myocytes through a redox-dependent mechanism. J Biol Chem 273 (1998): 25922-8.
- (145) Greenbaum, S., and Zhuang, Y. Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins. Seminars in Immunology 14 (2002): 405-414.
- (146) IEa, C.M. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. Nature reviews Immunology 1 (2001): 193-199.
- (147) Slattery, C., Ryan, M.P., and McMorrow, T. E2A proteins: Regulators of cell

- phenotype in normal physiology and disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 40 (2008): 1431-1436.
- (148) ENOa, W.K. bHLH factors in muscle development: deadlines and commitments, what to leave in and what to leave out. Genes & Development 8 (1994): 1-8.
- (149) Wei, Y. A., Kelley R., and Benezra, R.A. High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double- knockout mice. Molecular and Cellular Biology 17 (1997): 7317-7327.
- (150) Miettinen, P.J., et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. Nature 376 (1995): 337-341.
- (151) Coffey, R.J., et al. Production and auto-induction of transforming growth factor-[alpha] in human keratinocytes. Nature 328 (1987): 817-820.
- (152) Elder, J., et al. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. Science 243 (February 1989): 811-814.

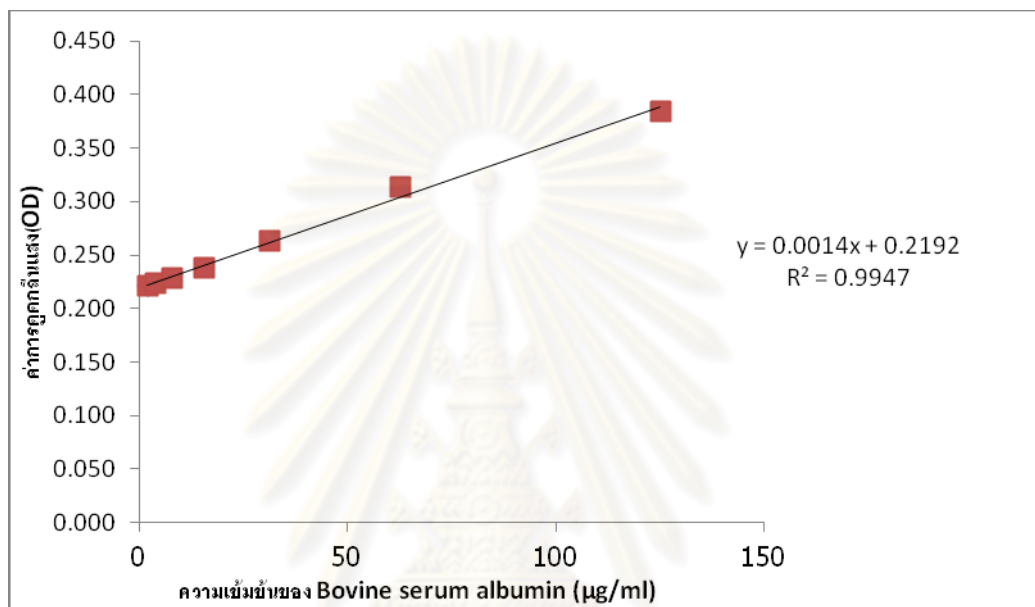


ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
ข้อมูลจากการทดลอง

กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด



ทำการทดสอบสารโปรตีนมาตรฐานทุกครั้งควบคู่ไปกับการตรวจวัดปริมาณโปรตีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
น้ำยา และสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. การเตรียม Nonidet-P 40 (NP-40) lysis buffer

NP-40 buffer	Final concentration	Volume (100 ml)
4M 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
**100mM DTT	1 mM	1 ml
***100mM PMSF	1 mM	1 ml

** เตรียมก่อนใช้ โดยละลายใน Milli-Q water และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

*** เตรียมก่อนใช้ โดยละลายใน Isopropanol และเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น เนื่องจากสารคงตัวเป็นเวลา 30 นาที

2. Bradford protein assay

2.1 การเตรียม Bradford Stock Solution (5X) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

95% ethanol 100 มิลลิลิตร

85% Phosphoric acid 200 มิลลิลิตร

Serva blue G 350 มิลลิกรัม

เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิห้อง

2.2 การเตรียม Bradford Working Buffer (1X) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Milli-Q water 425 มิลลิลิตร

95% ethanol 15 มิลลิลิตร

85% Phosphoric acid 30 มิลลิลิตร

Bradford Stock Solution 30 มิลลิลิตร

กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม Laemmli sample buffer

Laemmli sample buffer	Final concentration	Volume (10 ml)
10 % SDS	4%	4 ml
100% 2-Mercaptoethanol	10%	1 ml
85% Glycerol	20%	2 ml
Bromphenol blue	0.004%	Trace
1M Tris-HCl, pH 6.8	0.125 M	1.25 ml
Milli-Q water		1.75 ml

4. การเตรียม polyacrylamide gel

1.1 การเตรียม Separating gel

Components	10% gel (5 ml)	12% gel (5 ml)	15% gel (5 ml)	18% gel (5 ml)
Milli-Q water	1.9 ml	1.6 ml	1.1 ml	0.6 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml
10% SDS	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
10% ammonium persulfate*	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
TEMED*	0.002 ml	0.002 ml	0.002 ml	0.002 ml

*เตรียม และใส่หลังสุดเมื่อพร้อม เนื่องจากเป็นตัวที่ทำให้เจลแข็ง

1.2 การเตรียม Stacking gel

Components	5% gel (3 ml)
Milli-Q water	2.1 ml
30% acrylamide mix	0.5 ml
1M Tris (pH 6.8)	0.38 ml
10% SDS	0.03 ml
10% ammonium persulfate*	0.03 ml
TEMED*	0.003 ml

*เตรียม และใส่หลังสุดเมื่อพร้อม เนื่องจากเป็นตัวที่ทำให้เจลแข็ง

5. การเตรียม Running buffer (1X) ปริมาตร 1 ลิตร

25 mM Tris	3.03	กรัม
192 mM glycine	14.42	กรัม
0.1% SDS	1	กรัม
เติม Milli-Q water จนครบ 1000 มิลลิลิตร		

6. การเตรียมสีย้อมเจล 100 มิลลิลิตรต่อเจลDestain solution

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

สามารถใช้ซ้ำได้อีก โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง อย่าให้ถูกแสง

7. การเตรียม Destain solution 1000 มิลลิลิตร

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

8. การเตรียม Transfer buffer, pH 8.75 (1X) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

25 mM Tris	3.03	กรัม
192 mM Glycine	14.42	กรัม
20% Methanol	200	มิลลิลิตร
เติม Milli-Q water จนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส		

9. การเตรียม TBS-Tween 20 หรือ TBS-T (1X) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

20 mM Tris – HCl, pH 7.5	2.42	กรัม
150 mM NaCl	8.76	กรัม
1% Tween-20*	1	มิลลิลิตร
เติม Milli-Q จนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

* เติมก่อนใช้

10. การเตรียม Blocking buffer (5% Non-fat dry milk) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Non-fat dry milk	5	กรัม
เติม TBS-T จนครบ 100 มิลลิลิตร		

ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์ คำย่อ และคำอธิบาย


คำย่อ	คำอธิบาย
%	เปอร์เซ็นต์
/	per
α	alpha
γ	gamma
μ l	ไมโครลิตร
Ab	Antibody
Abs	Absorbance
ACA	1'S'-1'-Acetoxychavicol acetate
AMP	Adenosine monophosphate
APC	Antigen presenting cell
AP-1	Activator protein-1
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosine triphosphate
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CAD	Caspase-activated Dnase
Caspase 9	Cystine-aspartic proteases 9 หรือ Cystine



	dependent aspartate-directed proteases 9
CD	Cluster of differentiation
c-FLIP	Cellular-Flice-like inhibitory protein
CIAP-1	Cellular inhibitory of apoptosis protein-1
CLS	Cell lines service
CMV-2	Human cytomegalovirus type 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr virus
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FAP-1	Fas-associated phosphatase-1
FDA	Food and drug administration
FKHR	Forkhead in rhabdomyosarcoma
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

ศูนย์วิทยพัชกร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GDP	Guanosine diphosphate
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GTP	Guanosine triphosphate
G1P3	Interferon inducible gene 6-16
HaCaT	Human keratinocyte cell
HDL	High density lipoprotein
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradise peroxidase
HSV-1	Herpes simplex virus 1
IAPs	Inhibitor of apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of caspase activated DNase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
Id1	Inhibitor of differentiation หรือ DNA binding-1
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobulin



IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LDL	Low density lipoprotein
Maf	Musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
mM	milliMolar
mg	milligram
ml	milliliter
NP-40	Nonidet-P40
<i>P</i>	<i>P</i> -value
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potential of hydrogen ion
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
PUVA	Psoralen and ultraviolet light A
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RB	Regulation of cell cycle

RIP	Receptor interaction protein
RTK	Receptor tyrosine kinase
SDS	Sodium dodecyl sulphate
S.E.M	Standard error of the mean
SMACs	Second mitochondria-derived activator of caspase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBST	Tris-buffered saline Tween 20
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylene diamine
TGF- α	Transforming growth factor-alpha
Th cell	T helper cell
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
UVB	Ultraviolet light B
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐิติพร จารีกเสรีสกุล สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2551 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษาหลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย