



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การประเมินศักยภาพของ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate  
ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมในการเป็นสารต้านอักเสบชนิดใหม่  
(Potential evaluation of 4-methoxycinnamyl 4-coumarate  
isolated from *Etilingera pavieana* rhizome as a novel anti-  
inflammatory agent)

### โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณิชฐกานต์ จิรันธนัฐ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 258197

สัญญาเลขที่ 118/2560

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การประเมินศักยภาพของ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate  
ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมในการเป็นสารต้านอักเสบชนิดใหม่  
(Potential evaluation of 4-methoxycinnamyl 4-coumarate  
isolated from *Etlingera pavieana* rhizome as a novel anti-  
inflammatory agent)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณ์ฐกานต์ จิรัณนัฐ

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สิงหาคม พ.ศ. 2562

## บทคัดย่อ

4-methoxycinnamyl *p*-coumarate (MCC) ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอมแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (LPS) แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอักเสบในสิ่งมีชีวิตยังไม่ได้ทำการประเมิน การศึกษานี้จึงถูกออกแบบเพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอักเสบในหนูแรท โดยโมเดลการอักเสบแบบเฉียบพลัน 2 โมเดล คือ การบวมของหูหนูที่เหนี่ยวนำด้วย ethylphenylpropiolate (EPP) และการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenan นอกจากนี้ยังทำการประเมินความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสาร MCC ในหนูไม่ซี พบว่าสาร MCC ที่ขนาด 3 มิลลิกรัม/หู สามารถลดการบวมของหูหนูที่เหนี่ยวนำด้วย EPP ในทุกช่วงเวลาทำการทดสอบ ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกับยามาตรฐาน phenylbutazone (ขนาด 1 มิลลิกรัม/หู) สาร MCC ที่ขนาด 25, 75 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenan อย่างมีนัยสำคัญในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นที่เวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอักเสบของสาร MCC ในหนูแรทนั้นมีต่ำกว่าผลของยาแอสไพริน (300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) ที่เวลาชั่วโมงที่ 1 ถึง 5 ทำการศึกษาการแสดงของโปรตีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในเนื้อเยื่ออุ้งเท้าหนูพบว่าสาร MCC ที่ขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวยับยั้งปริมาณโปรตีน COX-2 แต่ไม่ยับยั้งโปรตีน iNOS ยิ่งไปกว่านั้นการให้สาร MCC ทางปากแก่หนูไม่ซี ที่ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่พบการตาย และไม่พบลักษณะอาการที่เป็นพิษ จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร MCC มีฤทธิ์ต้านอักเสบในหนูทดลองโดยไม่แสดงพิษเฉียบพลัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร MCC ในหนูทดลองนี้อาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของปริมาณโปรตีน COX-2 ในเนื้อเยื่ออุ้งเท้า ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับการนำสาร MCC ไปใช้เป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

**คำสำคัญ:** 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, เอทิลฟีนิลโพรพิโอเลต, คาราจีแนน, ฤทธิ์ต้านอักเสบ, พิษเฉียบพลัน

## Abstract

4-methoxycinnamyl *p*-coumarate (MCC) isolated from rhizomes of *Etlingera pavieana* possesses anti-inflammatory activity in LPS-induced RAW 264.7 macrophages, however, *in vivo* anti-inflammatory potential of MCC has not yet been evaluated. This study, therefore, was designed to investigate the anti-inflammatory effect of MCC in rats using two models of acute inflammation, ethylphenylpropiolate (EPP) - induced ear edema and carrageenan-induced paw edema. Moreover, acute oral toxicity of MCC was evaluated in mice. The topical application of MCC at 3 mg/ear significantly attenuated EPP-induced ear edema, at all tested time points, with comparable percentages of inhibition to those of phenylbutazone (1 mg/ear), the reference anti-inflammatory drug. MCC at doses of 25, 75 and 150 mg/kg body weight significantly inhibited the carrageenan-induced rat paw edema in a dose-dependent manner at 1, 3 and 5 h after injection of carrageenan. However, the anti-inflammatory effect of MCC at all tested doses was less than the effect of aspirin (300 mg/kg body weight) from 1st to 5th hours of the experiment. Paw tissues were determined the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins. MCC at doses of 75 mg/kg body weight inhibited COX-2 protein levels but not iNOS. Furthermore, oral administration of MCC at doses of 2,000 mg/kg body weight showed no mortality and none of symptom of toxicity. It can be concluded that MCC has significant anti-inflammatory effects in rat models of inflammation without signs of acute toxicity. This anti-inflammatory activity of MCC might be related to the decrease in the levels of COX-2 in the edema paw tissues. The obtained data provided scientific evidences for the use of MCC as therapeutic agent for treating inflammation-related diseases.

**Keywords:** 4-methoxycinnamyl *p*-coumarate, ethylphenylpropiolate, carrageenan, anti-inflammatory activity, acute toxicity

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณนางสาวเพชรรัตน์ ไสว และนางสาวกมลพร โพธิประสาท สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญภาพ	5
บทนำ	6
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีการทดลอง	11
ผลการทดลอง	15
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	19
บรรณานุกรม	20
ผลผลิตของโครงการวิจัย	26
ประวัตินักวิจัย	27

## สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างทางเคมีของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate	10
ภาพที่ 2	ผลของสาร MCC และยามาตรฐาน phenylbutazone ต่อการบวมของใบหูหนู ในแบบจำลอง EPP-induced ear edema in rats	15
ภาพที่ 3	ผลของสาร MCC และยามาตรฐาน aspirin (ASA) ต่อการบวมของอุ้งเท้าหนู ในแบบจำลอง Carrageenan-induced paw edema in rats	16
ภาพที่ 4	น้ำหนักตัวของหนูไมซ์เพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร MCC	17
ภาพที่ 5	ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ในอุ้งเท้าหนู ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันด้วย carrageenan	18

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรงของอันตรายที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง คุ้มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุม ลด จำกัดและทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหาย หรือตายด้วย เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่าการอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้โปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิล และแมโครฟาจออกนอกหลอดเลือดได้ และเซลล์เม็ดเลือดขาวนี้เคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดอันตราย เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนกิน (phagocytosis) และหลั่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines ความเสียหายหรือผลจากการอักเสบเช่นนี้ ร่างกายมักจะซ่อมแซมจนไม่พบความผิดปกติ แต่หากระบบภูมิคุ้มกันควบคุมสาเหตุก่อการอักเสบเฉียบพลันได้ไม่ดี ทำให้มีการหลั่ง pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines อย่างต่อเนื่องนานออกไป จึงมีการทำลาย ลูกกลมอย่างต่อเนื่อง ระบบภูมิคุ้มกันจะขยายผลการควบคุม เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อการอักเสบอีก เรียกภาวะเช่นนี้ว่าการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สิ่งที่แตกต่างกันไปจากการอักเสบเฉียบพลันคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้น และหากการควบคุมยังทำได้ไม่ดีจะทำให้เกิดความบกพร่องของระบบและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ภาวะช็อกจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคหอบหืด โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และโรคเสื่อมของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005)

ในการอักเสบทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบหลายชนิด เช่น พรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และ cytokines เป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้จะเป็นเครื่องมือทำให้เกิดการตอบสนอง และการอักเสบมากขึ้น (Van der Vliet, 2000) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการหลั่งสารเหล่านี้จะทำให้การอักเสบลดลง เป้าหมายของยาต้านการอักเสบจึงมุ่งยับยั้งหรือลดการหลั่งสารเหล่านี้ แต่ยาส่วนใหญ่ยังขาดความจำเพาะ และมีผลข้างเคียงจากการใช้ยาเป็นเวลานาน (Seibert et al., 1994; Dhikav, 2002) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะหาวิธีใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น



ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดการผลิต pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบ ดังนั้น เพื่อเป็นการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้ายาต้านการอักเสบ จากต่างประเทศเป็นมูลค่าปีละหลายพันล้านบาท การค้นคว้าหาสารที่จะนำมาเป็นยาต้านการอักเสบจึงมีความจำเป็น โดยเฉพาะจากพืชและสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการต้านการอักเสบ เช่น สาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ที่เป็นสารจากเหง้าเร่วหอม (*Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.) ที่มีฤทธิ์ในการ ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (LPS) และสารนี้มีฤทธิ์สูงกว่า aminoguanidine ซึ่งเป็นสารที่รู้จักกันดีว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) คณะผู้วิจัยเล็งเห็น ศักยภาพของสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate ในการนำไปพัฒนาเป็นสารต้านการอักเสบชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามเรายังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์กลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลของสารประกอบ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ที่แยกจากเหง้าเร่วหอมในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และการ อักเสบแบบเฉียบพลันในหนูทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลในการนำสารนี้ไปพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบ หรือในการนำไป เป็นสารนำ (lead compound) ในการพัฒนายาต้านการอักเสบในอนาคต เป็นการลดการนำเข้ายาต้านการอักเสบจาก ต่างประเทศ เป็นการประหยัดงบประมาณและอาจนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้ เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ในหนูทดลอง

## 1.3 ขอบเขตของการทดลอง

นำสารประกอบ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอม มาทดสอบ ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสาร MCC ที่ให้ทางปากในหนูขาว (Acute oral toxicity test) และทดสอบฤทธิ์ ต้านการอักเสบของในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่หูด้วย ethyl phenyl propiolate และที่อุ้งเท้าด้วย carrageenan ซึ่งเป็นโมเดลการอักเสบเฉียบพลัน รวมทั้งน้ำเนื้อเยื่อที่อุ้งเท้าหนูในโมเดลการอักเสบเฉียบพลัน มา วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ iNOS และ COX-2

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ทฤษฎี

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรงของอันตราย ที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง ตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือ ปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น ในขณะที่มีการอักเสบจะมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อหลอดเลือด จึงเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านหลอดเลือด เป็นผลให้สารน้ำและเซลล์เม็ดเลือดขาว ออกจากหลอดเลือดมายังบริเวณที่มีการอักเสบ เป็นผลให้เกิดการบวม แดง ร้อน ของบริเวณที่มีการอักเสบ เม็ดเลือดขาวที่ออกมาออกหลอดเลือด เช่น นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจจะถูกกระตุ้นโดยสิ่งแปลกปลอมที่รุกรานทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี หลังสารสื่อกลางในการอักเสบ (Pro-inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น แบริคติน (bradykinin), ฮิสตามีน (histamine), ไนตริกออกไซด์ และ พรอสตาแกลนดิน เป็นต้น รวมทั้ง pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) และ interleukin-6 (IL-6) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ (พีรียูท สิริไชยากุล, 2552; Kumar et al., 2007) ซึ่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เหล่านี้ที่ถูกหลั่งมากเกินไป หรือหลังต่อเนื่องในระยะเวลาต่างๆ จะทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ มีรายงานว่า การอักเสบเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์จาก L-arginine เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม เกิด five-electron oxidation ขึ้นที่อะตอมของไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มกวานิดิน (guanidine) ของ L-arginine ได้เป็นไนตริกออกไซด์รวมทั้งได้ L-citrulline เป็นผลผลิตร่วม โดยในปฏิกิริยานี้จะอาศัย flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH4) เป็นโคแฟกเตอร์ร่วม เอนไซม์ NOS มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ iNOS ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity) แมคโครฟาจทำหน้าที่กำจัดจุลชีพที่บุกรุก โดยผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมากจากเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine, endotoxin ของแบคทีเรีย หรือไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย (Coleman,

2001) การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS ส่งผลให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมาก โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบที่สำคัญที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS พบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

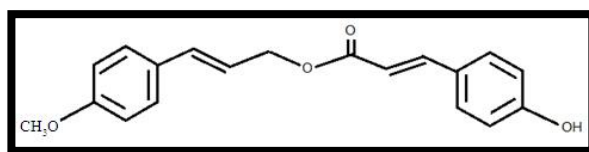
โพรสตาแกลนดิน (prostaglandins, PGs) เป็นสารตัวกลางในกลุ่มลิพิดที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น ควบคุมความดันโลหิต การแข็งตัวของหลอดเลือด และตอบสนองต่อการอักเสบ ในกระบวนการสังเคราะห์โพรสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์หลักคือ COX เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโพรสตาแกลนดินที่ทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา ควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (Rao and Knaus, 2008) และอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของโพรสตาแกลนดินในปริมาณมาก (Katzung, 2001; Rao and Knaus, 2008) PGE<sub>2</sub> เป็นไอโซฟอร์มหนึ่งของพรอสตาแกลนดินทำหน้าที่ร่วมกับสารในร่างกายในการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การขยายตัวและบีบตัวของหลอดเลือด ควบคุมความดันเลือด (Serhan and Levy, 2003) และเป็นตัวกลางการอักเสบที่กระตุ้นการทำลายเนื้อเยื่อ

มีการรายงานว่ LPS จะเข้าจับที่ Toll-like receptor 4 (TLR4) และกระตุ้นการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ก่อให้เกิดการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ pro-inflammatory cytokines (Lowenstein et al., 1993; Zhang et al., 2012) ในสถานะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- $\kappa$ B จะอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จับกับโปรตีน inhibitor of  $\kappa$ B (IKB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF- $\kappa$ B ทำให้ NF- $\kappa$ B ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ (Zhang et al., 2012) ในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ ไซโตไคน์ต่างๆ จะเกิดการจับกับตัวรับสัญญาณ (receptor) ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ inhibitor of  $\kappa$ B kinase (IKB kinase) ทำให้เกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) จากนั้น IKB จะถูกทำลายด้วยการกระบวนการ proteasome-mediated proteolytic ทำให้ NF- $\kappa$ B อยู่ในภาพ heterodimer ของ p65 ที่รวมกับ p50 หรือ p52 (Tak and Firestein, 2001) ทำให้สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียส ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่ง NF- $\kappa$ B binding site ที่บริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีน การกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านวิถีสัญญาณ MAPKs อีกด้วย (Lu et al., 2012) นอกจากนี้ยังมี transcription factor ตัวอื่นที่ควบคุมการแสดงออกของยีน COX-2 และ iNOS เช่น activate protein-1 (AP-1), c-AMP response element binding protein (C/EBPs) และ CREB เป็นต้น (Yang et al., 2012)

## 2.2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

เร่วหอม [*Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.] เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกาหลาและปุด พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น ระยอง จันทบุรี และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อ แทงจากเหง้า ดอก

ย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลมและแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียง ก๋วยเตี๋ยวเนื้อเลียง แกงป่า และผัดเผ็ด การปลูกเร่วหอมแต่ดั้งเดิมเป็นการปลูกเป็นพืชสวนครัว และปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย ในปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์เพื่อจำหน่ายทั้งในและนอกประเทศ (วารสารเคหเกษตร, มปป.; รายการเกษตรกรน่ารู้, 2553) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Srisook และ Srisook, 2011) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมยังยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ได้ลดการกระตุ้น nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) ซึ่งเป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ heme oxygenase-1 (Palachot, 2012) ต่อมา มีการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, p-anisic acid, p-hydroxy benzaldehyde, 4-methoxycinnamyl alcohol, p-coumaric acid, trans-4-methoxycinnamaldehyde, สาร (E)-methyl isoeugenol, trans-anethole และ , p-anisaldehyde และพบว่าสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate (แสดงโครงสร้างทางเคมีในภาพที่ 1) ซึ่งเป็นสารที่มีการพบเป็นครั้งแรกในเหง้าเร่วหอม มีฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และสารนี้ยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate ที่แยกได้จากเหง้าเร่วหอม

## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

#### 3.1 การสกัดสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) จากเหง้าเร่วหอม

นำสมุนไพรเร่วหอมประมาณ 100 กิโลกรัมจาก จังหวัดจันทบุรี มาล้างด้วยน้ำประปา และอบแห้ง บดให้ละเอียด และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการกรอง จากนั้นนำผงพืชมาแช่ในเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้ง โดยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ จากนั้นสกัดแยกส่วนสกัดเอทานอล มาสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ

#### 3.2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ และหนูไมซ์พันธุ์ ICR เพศเมีย จากบริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด เลี้ยงสัตว์ทดลองไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 24 + 1 องศาเซลเซียส ความชื้น 50 + 10% ควบคุมแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และความมืด 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำตามปกติ โดยจะเลี้ยงสัตว์ทดลองไว้อย่างน้อย 5-7 วันก่อนทำการทดลอง

#### 3.3 การทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ

##### 3.3.1 Ethylphenylpropiolate (EPP) - induced ear edema in rats (Brattsand et al., 1982)

ใช้หนูแรทเพศผู้ น้ำหนัก 40- 60 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว (6 หนู)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับตัวทำละลาย Acetone ปริมาตร 20 ไมโครลิตร/หนู

กลุ่มที่ 2 กลุ่มยามาตรฐาน ได้รับ phenylbutazone ขนาด 1 มิลลิกรัม/หนู

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดสอบ ได้รับ สาร MCC ขนาด 3 มิลลิกรัม/หนู

วัดความหนาของใบหูใช้ vernier caliper จากนั้นหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับสารต่างๆ โดยการทาบนใบหูทั้งด้านในและด้านนอกในปริมาตรที่เท่ากัน (20 ไมโครลิตร/หนู) แล้วจึงทา EPP 1 มิลลิกรัม/หนู จากนั้นทำการวัดความหนาของใบหูที่นาที่ 15, 30, 60 และ 120 หลังทา EPP เปรียบเทียบผลของสารทดสอบกับกลุ่มควบคุม และคำนวณค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการอักเสบตามวิธีที่รายงานโดย (Brattsand et al., 1982) ดังนี้

$$EDX = ETX - ETO$$

$$\%EDI = \frac{ED_c - ED_t}{ED_c} \times 100$$

เมื่อ	
EDX	= ความหนาของการบวม ( $\mu\text{m}$ ) ที่เวลา X
ETX	= ความหนาของหู ( $\mu\text{m}$ ) ที่เวลา X
ETO	= ความหนาของหู ( $\mu\text{m}$ ) ก่อนสัมผัสกับ EPP
%EDI	= % การยับยั้งการบวมของสารทดสอบที่เวลา X
EDC	= ความหนาของการบวม ( $\mu\text{m}$ ) ของกลุ่มควบคุมที่เวลา X
EDT	= ความหนาของการบวม ( $\mu\text{m}$ ) ของกลุ่มสารทดสอบที่เวลา X

### 3.3.2 Carrageenan-induced paw edema in rats (Winter *et al.*, 1962)

ใช้หนูแรท เพศผู้ น้ำหนัก 100-120 กรัม แบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ 5% Tween80

กลุ่มที่ 2 กลุ่มยามาตรฐาน ได้รับ aspirin (ASA) ขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

กลุ่มที่ 3-5 กลุ่มทดสอบ ได้รับสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) ในขนาด 25, 75 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

หนูแต่ละกลุ่มได้รับสารต่างๆ โดยการป้อนทางปาก วัดปริมาตรอุ้งเท้าหลังด้านขวาของหนูแรทด้วยเครื่อง Plethysmometer ก่อนและหลังฉีด 1% carrageenan 0.05 มล. ที่ชั่วโมงที่ 1, 3 และ 5 หลังการฉีด carrageenan เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการุณฆาตหนูด้วย Pentobarbital sodium 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง แล้วตัดเก็บอุ้งเท้าหลังข้างขวาของหนูเพื่อนำไปตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป และคำนวณค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการอักเสบตามวิธีที่รายงานโดย (Winter *et al.*, 1962) ดังนี้

$$EVX = PVX - PVO$$

$$\% EI_x = \frac{EV_x \text{ of control group} - EV_x \text{ of test group}}{EV_x \text{ of control group}} \times 100$$

เมื่อ

EVX = ปริมาตรของการบวม (ml) ที่เวลา X

PVX = ปริมาตรของอุ้งเท้า (ml) ที่เวลา X

PVo = ปริมาตรของอุ้งเท้า (ml) ก่อนฉีด carrageenin

% EIX = % การยับยั้งการบวมของสารทดสอบที่เวลา X

### 3.4 การทดสอบกลไกระดับโมเลกุลของการลดการอักเสบเฉียบพลันในสัตว์ทดลองของสาร MCC

เมื่อทำการทดลองการต้านอักเสบในโมเดลการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เหนียวหนาโดย carrageenan ที่เวลา 5 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan แล้ว ทำการุณฆาตตามวิธีในข้อ 3.2 ก่อนตัดเท้าด้านที่ถูกเหนียวหนาให้มีการบวม และตัดเฉพาะเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) จากบริเวณอุ้งเท้าที่บวมในตัว -80 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบ

ปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 โดยนำเนื้อเยื่อบริเวณอุ้งเท้ามาบดใน liquid nitrogen และสกัดโปรตีนโดยใช้ RIPA buffer แล้วนำมา sonicate ก่อนนำไปปั่นที่ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS ในสารละลายบัฟเฟอร์ (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนจะย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน Polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol] เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแทงค์ที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการส่งผ่านโปรตีนแล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5% (w/v) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน iNOS, COX-2 และ GAPDH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย anti-mouse IgG (H+L) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนบ่มในสารละลายซับสเตรทสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์ในห้องมืด

### 3.5 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูแรท (Acute oral toxicity-fixed dose procedure) (OECD, 2001)

ใช้หนูเม้าส์ เพศเมีย น้ำหนัก 100-120 กรัม แบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ได้แก่

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ 5% Tween80

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดสอบ ได้รับสาร MCC ในขนาด 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ทำการทดลองโดยนำหนูตัวที่ 1 ของกลุ่มที่ 2 มาป้อนสารทดสอบคือ MCC ในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางปากเพียงครั้งเดียว หลังจากที่ไม่พบการตายหรืออาการพิษใดๆ เกิดขึ้น จึงได้นำหนูที่เหลืออีก 4 ตัวมาป้อนสารทดสอบในขนาดเดียวกัน ส่วนหนูกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมได้นำมาป้อนตัวทำละลายคือ 5% tween80 ทั้งนี้หนูทั้งสองกลุ่มจะได้รับการป้อนสารในปริมาณเท่ากัน และได้รับการสังเกตการตายและอาการทั่วไปอย่างใกล้ชิดภายใน 6 ชั่วโมงแรก แล้วเฝ้าดูอาการต่อไปวันละครั้ง จนครบ 14 วัน จากนั้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูที่รอดชีวิตทุกตัวจะถูกนำมาการุณยฆาตด้วย Pentobarbital sodium 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง และได้รับการผ่าตัดเพื่อตรวจดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน

### 3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ข้อมูลของผลการทดลองแสดงในรูป mean + S.E.M. และทำการวิเคราะห์โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และ post hoc least-significant difference (LSD) test โดยที่  $P < 0.05$  ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



## บทที่ 4

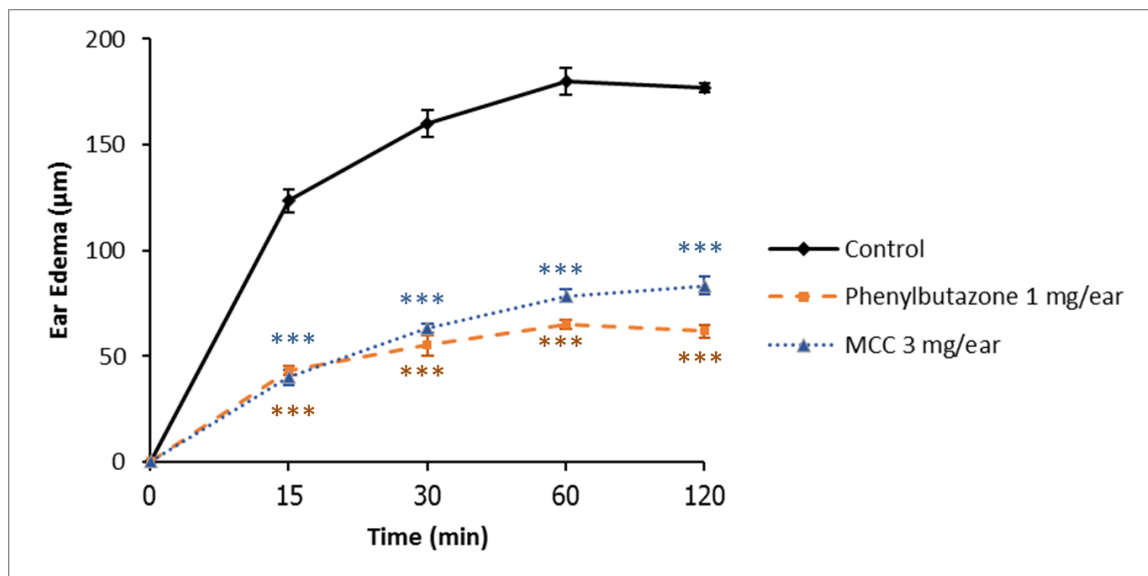
### ผลการทดลอง

#### 4.1 การสกัดสาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) จากเหง้าเร่วหอม

ทำการสกัดสาร MCC จากเร่วหอม โดยนำสมุนไพรเร่วหอมประมาณ 100 กิโลกรัม ได้ผงสมุนไพรอบแห้งจำนวน 6.8 กิโลกรัม และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลาย คือ 1 ต่อ 10 นำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้งโดยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นทำการแยกสาร MCC จากส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอมที่ได้ทั้งหมดโดยคอลัมน์ที่บรรจุ silica gel และนำสาร MCC ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR เพื่อยืนยันว่าสารที่ได้เป็น MCC ดังแสดงสเปกตรัม NMR ที่รายงานโดย Srisook et al. (2017)

#### 4.2 ผลของสาร MCC ในแบบจำลอง EPP-induced ear edema in rats

จากแบบจำลอง EPP-induced ear edema in rats ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบของสาร MCC โดยในการทดลองนี้ มีการกระตุ้นการบวมของใบหูหนูแรทด้วยสาร EPP ซึ่งผลการทดลองพบว่า สาร MCC และยามาตรฐาน phenylbutazone ซึ่งให้โดยการทาที่ใบหู สามารถลดการบวมของใบหูหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการบวมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกเวลาทำการประเมิน ทั้งนี้ สาร MCC ในขนาด 3 มิลลิกรัม/หู สามารถลดการบวมของใบหูหนูได้น้อยกว่ากับยามาตรฐาน phenylbutazone ในขนาด 1 มิลลิกรัม/หู (ภาพที่ 2)

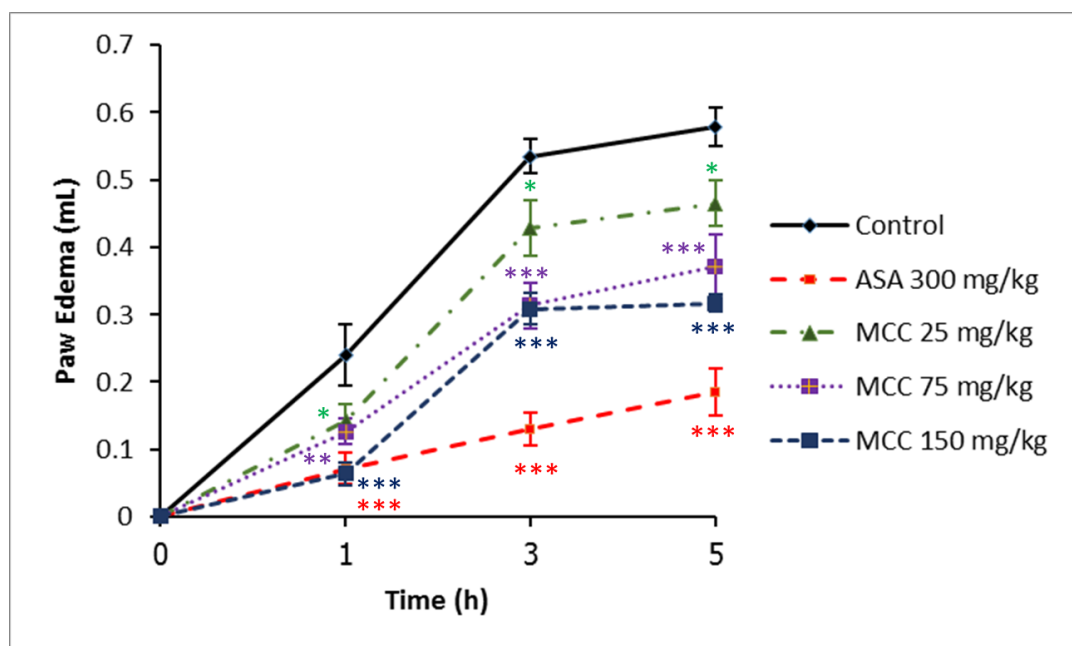


Values: Mean  $\pm$  SEM., n = 6 \*\*\* significantly different from control<sup>a</sup>,  $p < 0.001$

ภาพที่ 2 ผลของสาร MCC และยามาตรฐาน phenylbutazone ต่อการบวมของใบหูหนูในแบบจำลอง EPP-induced ear edema in rats

### 4.3 ผลของสาร MCC ในแบบจำลอง Carrageenan-induced paw edema in rats

จากแบบจำลอง Carrageenan-induced paw edema in rats ซึ่งเป็นการทดลองที่นิยมใช้ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารทดสอบ โดยในการทดลองนี้ มีการกระตุ้นการบวมของอุ้งเท้าข้างขวาของหนูแรทด้วยสาร Carrageenan ซึ่งผลการทดลองพบว่า สาร MCC ในขนาด 25, 75 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งให้โดยการป้อนทางปาก สามารถลดการบวมของอุ้งเท้าข้างขวาที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการบวมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกเวลาที่ทำการประเมิน (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตาม สาร MCC ในขนาดสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง (150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) มีฤทธิ์ลดการบวมและการอักเสบได้น้อยกว่ากับยามาตรฐาน aspirin ในขนาด 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม



Values: Mean  $\pm$  SEM., n = 6

\* significantly different from control<sup>a</sup>, p<0.05

\*\* significantly different from control<sup>a</sup>, p<0.01

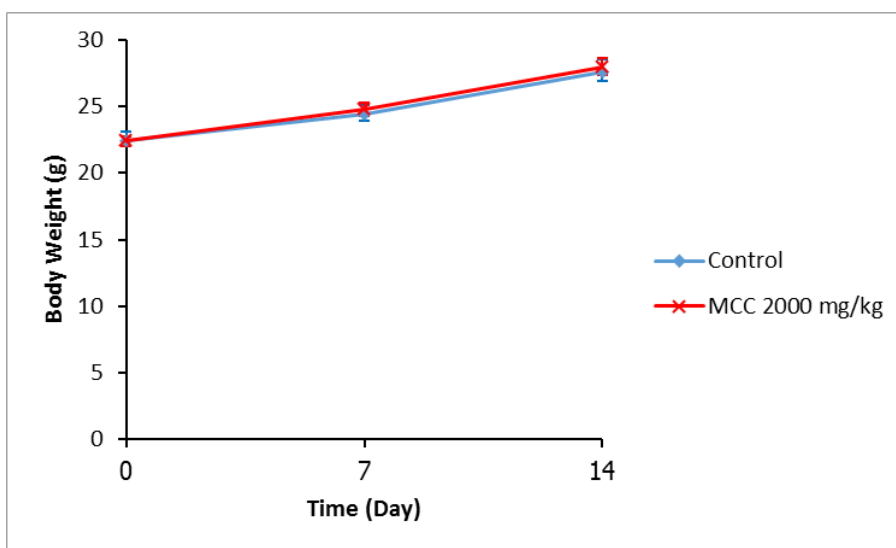
\*\*\* significantly different from control<sup>a</sup>, p<0.001

ภาพที่ 3 ผลของสาร MCC และยามาตรฐาน aspirin (ASA) ต่อการบวมของอุ้งเท้าหนูในแบบจำลอง Carrageenan-induced paw edema in rats

#### 4.4 ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน

จากการทดลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร MCC ในหนูไมซ์เพศเมีย ซึ่งทำโดยการป้อนสาร MCC ในขนาด 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ให้แก่หนูไมซ์ทางปาก ส่วนหนูไมซ์กลุ่มควบคุมได้รับการป้อน 5% tween 80 แล้วสังเกตอาการของหนูไมซ์ทุกตัวภายใน 24 ชั่วโมงแรกและทุกวันเป็นเวลา 14 วันพบว่าหนูทุกตัวที่ได้รับสาร MCC ไม่มีอาการตาย ไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ รวมทั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและการกินอาหารในหนูไมซ์กลุ่มที่ได้รับสาร MCC และหนูไมซ์กลุ่มควบคุม

เมื่อพิจารณาถึงผลของสาร MCC ต่อน้ำหนักตัวของหนูไมซ์เพศเมีย พบว่าในวันที่ 7 และ 14 หลังจากได้รับการป้อนสารทดสอบ หนูไมซ์ที่ได้รับสาร MCC ในขนาด 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ เมื่อทำการตรวจดูอวัยวะภายในต่างๆของหนูไมซ์ทุกตัว ก็ไม่พบลักษณะที่ผิดปกติใดๆ ของอวัยวะภายในเลย



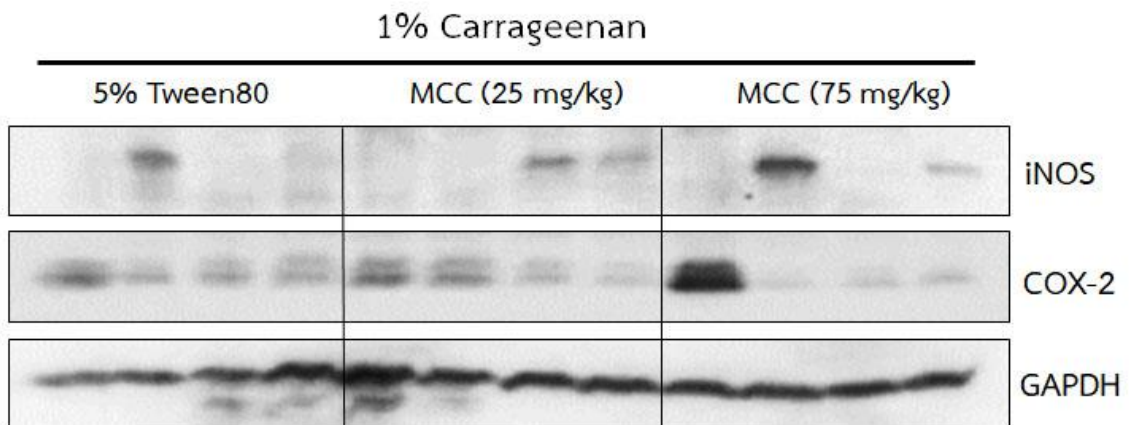
Values: Mean  $\pm$  SEM., n = 5

No significant difference between test groups and control groups.

ภาพที่ 4 น้ำหนักตัวของหนูไมซ์เพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร MCC

#### 4.5 กลไกระดับโมเลกุลของการลดการอักเสบเฉียบพลันในสัตว์ทดลองของสาร MCC

เมื่อนำเนื้อเยื่อจากอุ้งเท้าหนูมาสกัดโปรตีนและทดสอบปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 ด้วยเทคนิค Western blot analysis พบว่าเมื่อหนูได้รับ carrageenan เป็นเวลา 5 ชั่วโมง carrageenan สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 แต่เมื่อหนูได้รับ MCC ที่ขนาด 75 mg/kg สามารถลดปริมาณโปรตีน COX-2 ได้ แต่ไม่สามารถลดปริมาณ iNOS ได้ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลของสาร MCC ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ในอุ้งเท้าหนูที่เหนียวทำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันด้วย carrageenan เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในการศึกษาใช้ GAPDH เป็น house-keeping protein

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

แบบจำลอง EPP-induced ear edema in rats เป็นการทดลองที่นิยมใช้ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยใช้สาร EPP เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมและการอักเสบของใบหูหนู (Brattsand et al., 1982) สารสื่อกลางของการอักเสบที่หลังจากการกระตุ้นด้วยสาร EPP ได้แก่ histamine, serotonin, bradykinin และ PGs (Carlson et al., 1985) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า สาร MCC ที่ให้โดยการทาที่ใบหูหนู สามารถลดการบวมของใบหูหนูที่กระตุ้นด้วย EPP ได้ ซึ่งแม้ว่าฤทธิ์ลดการบวมของสาร MCC จะน้อยกว่ายามาตรฐาน phenylbutazone แต่ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสาร MCC มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

แบบจำลอง Carrageenan-induced paw edema in rats เป็นการทดลองที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารทดสอบต่อการอักเสบเฉียบพลัน โดยใช้สาร Carrageenan เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมและการอักเสบของอุ้งเท้าหนู ทั้งนี้การบวมของอุ้งเท้าที่เกิดขึ้นในช่วงต้นเป็นผลจากการหลั่งของสารสื่อกลางของการอักเสบเช่น histamine, serotonin, และ bradykinin จากนั้นในช่วงหลังของการอักเสบจะมีการหลั่งของสารสื่อกลางอื่นๆ ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PGs (DiRosa et al., 1971) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สาร MCC ที่ให้โดยการป้อนทางปาก สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูจากการกระตุ้นด้วย carrageenan ได้ แม้ว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร MCC น้อยกว่ายามาตรฐาน aspirin แต่ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาร MCC มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เมื่อทำการศึกษาเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) จากบริเวณอุ้งเท้าที่บวม พบว่าสาร MCC ที่ขนาด 75 mg/kg สามารถลดปริมาณโปรตีน COX-2 ได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ DiRosa et al. (1971) ที่รายงานว่าสารสื่อกลางกลุ่มพรอสตาแกลนดิน (PGs) จะหลั่งออกมาในช่วงท้ายของการอักเสบที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenan ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร MCC อาจเกิดจากการยับยั้งการสร้างหรือการหลั่งของสารสื่อกลางของการอักเสบในกระบวนการอักเสบเฉียบพลัน เนื่องจากการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยของเราพบว่าสาร MCC สามารถยับยั้งการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ (NO) พรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) และ tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (Mankhong et al., 2017; Mankhong et al., 2019) อย่างไรก็ตามสาร MCC ไม่สามารถลดปริมาณ iNOS ได้ชัดเจน

จากผลการทดลองการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร MCC ในหนูไม่ช้เพศเมีย พบว่า สาร MCC ในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ให้โดยการป้อนทางปาก ครั้งเดียวแก่หนูไม่ช้เพศเมีย ไม่ก่อให้เกิดการตายหรือความผิดปกติใดๆ น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับสาร MCC ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบ

กับกลุ่มควบคุม เมื่อทำการผ่าตัดตรวจดูอวัยวะภายในต่างๆ ก็ไม่พบลักษณะที่ผิดปกติใดๆ ผลการทดลองที่ได้ แสดงว่า สาร MCC ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันในหนูเม้าส์ แม้จะให้ในขนาดสูง

### สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่า สาร MCC จากเร่วหอม มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยสามารถลดอาการบวมจากการอักเสบเฉียบพลันที่กระตุ้นด้วย ethyl phenylpropiolate (EPP) และ carrageenan ในหนูแรทได้ นอกจากนี้ จากการศึกษาความพิษเฉียบพลันของสาร MCC ในหนูเม้าส์ พบว่า สาร MCC ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันเมื่อให้ในขนาดสูงถึง 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อย่างไรก็ตาม การจะได้ข้อมูลด้านความปลอดภัย ยังจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ในการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง จึงจะได้ข้อสรุปด้านความปลอดภัยที่แน่ชัด

## บรรณานุกรม

- พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณัภรณ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- พิริยทุธ สิทธิไชยากุล. (2552). เอกสารประกอบการสอนวิชา 499303 หลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์. ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสมุนไพรจาก ภาคตะวันออก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และ กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่าน สาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357:593-615.
- Brattsand, R., Thalen, A., Roempke, K., Kallstrom, L. and Gruvstad, E., 1982. Influence of 16 alpha, 17 alpha-acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 16, 779-786.
- Buapool D, Mongkol N, Chantimal J, Roytrakul S, Srisook E, Srisook K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 146 : 465-504.
- Carlson, R., O'Neill-Davis, L., Chang, J. and Lewis, A., 1985. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions* 17, 197-204.
- Coleman JW. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. 1:1397-1406.
- Dhikav, V., Singh, S., Anand, K.S., (2002). Newer non-steroidal anti-inflammatory drugs—a review of their therapeutic potential and adverse drug reactions. *J. Ind. Acad. Chem. Med.* 3, 332–338.

- DiRosa, M., Giroud, J.P. and Willoughby, D.A., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology* 104, 15-29.
- Dorheim MA, Tracey WR, Pollock JS, Grammas P. (1994). Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 205:659-665.
- Guzik TJ, Korbout R, Guzik TA. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 54:469-487.
- Huang GJ., Pan CH., Liu FC., Wu TS., Wu CH. (2012). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages and the  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema model. *Food Chem Toxicol*. 2012 May;50(5):1485-93.
- Kaminska B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1754 : 253-262.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R.N., (2007). *Robbins Basic Pathology*, eight ed. Elsevier Saunders, United States of America.
- Latham KA, Whittington KB, Zhou R, Qian Z, Rosloniec EF. (2005). Ex vivo characterization of the autoimmune T cell response in the HLA-DR1 mouse model of collagen-induced arthritis reveals long-term activation of type II collagen-specific cells and their presence in arthritic joints. *Journal of Immunology*. 174:3978-3985.
- Lee KH, Abas F, Alitheen NB, Shaari K, Lajis NH, Ahmad S. (2011). Curcumin Derivative, 2, 6-Bis(2, 5-dimethoxybenzylidene)- cyclohexanone (BDMC33) Attenuates Prostaglandin E2 Synthesis via Selective Suppression of Cyclooxygenase-2 in IFN- $\gamma$ /LPS Stimulated Macrophages. *Mol*. 16:9728-9738.
- Liew CY, Lam KW, Kim MK, Harith HH, Tham CL, Cheah YK, Sulaiman MR, Lajis NH, Israf DA .(2011). Effects of 3-(2-Hydroxyphenyl)-1-(5-methyl-furan-2-yl) propenone (HMP) upon signalling pathways of lipopolysaccharide-induced iNOS synthesis in RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol*. 11: 85-95.



- Liu, S.F., Ye, X., Malik, A.B. (1999). Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*. 100(12):1330-1337.
- Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:9730-9734.
- Lu Y, Suh SJ, Kwak CH, Kwon KM, Seo CS, Li Y, Jin Y, Li X, Hwang SL, Kwon O, Chang YC, Park YG, Park SS, Son JK, Kim CH, Chang HW. (2012). Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF- $\kappa$ B and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW 264.7 cells. *International Immunopharmacology*. 12:175–181.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15:323-350.
- Mankhong S, Srisook E, Srisook K. (2017). Anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes in lipopolysaccharide-induced macrophages. *NU. International Journal of Science*, 14(2), 58-66.
- Mankhong S, lawsipo P, Srisook E, Srisook K. (2019). 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes inhibits inflammatory response via suppression of NF- $\kappa$ B, Akt and AP-1 signaling in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Phytomedicine*, 54, 89-97.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2008. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2001. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
- Palachot M. 2012. Investigation of anti-inflammatory activity and molecular mechanism of the action of selected zingiberaceae plant extract. Master thesis. Biological science Faculty of Science, Burapha University.

- Pangoop, R. (2009). Anti-inflammatory and analgesic effects of the methanol extract from *Garcinia wallichii choisy* in animal models. Thesis in Master of Science. Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Rao PP, Knaus EE. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) : Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 11 : 81s-110s.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 : 12013-12017.
- Serhan CN, Levy B. (2003). Success of prostaglandin E<sub>2</sub> in structure–function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 : 8609-8611.
- Srisook, K., Srisook, E. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. *Proceeding of the 3<sup>rd</sup> International Natural Products for Health and Beauty*. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).
- Srisook E, Palachot M, Mankhong S, Srisook S. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacognosy Magazine*, 13, 50, s230-235.
- Strickson, S., Campbell, D.G., Emmerich, C.H., Knebel, A., Plater, L., Ritorto, M.S., Shpiro, N., Cohen, P. (2013). The anti-inflammatory drug BAY 11-7082 suppresses the MyD88-dependent signalling network by targeting the ubiquitin system. *Biochem J*. 451(Pt 3): 427–437.
- Tak PP, Firestein GS. (2001). NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 107 : 7-11.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E., (2000). Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Research* 1:67–72.
- Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 11, 544-547.

- Wright CE, Rees DD, Moncada S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*. 26:48-57.
- Yang Y, Moh SH, Yu T, Park JG, Yoon DH, Kim TW, Kim SH, Lee S, Hong S, Cho JY. (2012). Methanol extract of *Osbeckia stellata* suppresses lipopolysaccharide and HCL/ethanol-induced inflammatory responses by inhibiting Src/Syk and IRAK-1. *Journal of Ethnopharmacology*. 143 : 876-883.
- Zhang X, Xiong H, Liu L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141 : 206-211.

## ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ผลงานวิจัยบางส่วนกำลังอยู่ในขั้นตอนเตรียมบทความเพื่อเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ  
ดังนี้ Natthakarn Chiranthanut, Ekaruth Srisook and Klaokwan Srisook. An *in vivo* anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl *p*-coumarate isolated from rhizomes of *Etlingera pavieana*. *Planta Medica* (Manuscript in preparation).
2. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่าของเร่วหอมที่เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของภาคตะวันออก นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของชุมชนในภาคตะวันออกของไทย