3.125, 6.25, 12.5 และ 25 μg/mL ตามลำดับ โดยการทดลองนี้จะใช้ 10 % FBS เป็นสารมาตรฐาน นำไปเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ CO_2 incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (0.5 mg/mL) นำไปบ่มในตู้อบ CO_2 incubator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม 50 μL DMSO เพื่อละลายผลึก formazan นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader คำนวณค่า cell proliferation ของเซลล์ที่ได้รับ MLE ในรูปของ % of control เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5 % DMSO) โดยให้กลุ่มควบคุม มีค่า cell viability เท่ากับ 100%

การศึกษาความเป็นพิษของ MLE ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay (Jantaratnotai et al., 2006)

เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MLE ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน (12.5, 25, 50, 100 และ 200 μg/mL ตามลำดับ) ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย MLE จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มี CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (0.5 mg/mL) ละลายอยู่ จากนั้นนำไปบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง จากนั้นเติม DMSO ปริมาณ 200 μL ต่อหลุม เพื่อละลายผลึก formazan นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader คำนวณค่า cell viability ของเซลล์ที่ได้รับ MLE เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control โดยให้กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle มีค่า cell viability เท่ากับ 100%

การศึกษาผลของ MLE ต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)

นำเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator ที่มี CO_2 5% และอุณหภูมิ 37°C จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MLE ละลายอยู่ในความเข้มข้นต่างๆ กัน (12.5, 25, 50, 100 และ 200 μg/mL ตามลำดับ) ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะสาร DMSO (0.5% v/v) ในการทดลองนี้จะใช้สาร L-N^G-nitroarginine methyl ester (L-NAME) ที่ความเข้มข้น 2 μM เป็นสารมาตรฐาน โดยในแต่ละหลุมจะเติมสาร LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 100 ng/mL เพื่อกระตุ้นการสร้าง NO จากเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจวัดปริมาณของ NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจ ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับ MLE ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) โดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้กลุ่มควบคุม มีปริมาณ nitrite เป็น 100%

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ผู้วิจัยได้รับอนุมัติให้ทำการทดลองในสัตว์ทดลองได้จากคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่การอนุมัติ AEKKU 52/2556

ใช้หนู mice ICR อายุ 4 สัปดาห์ เพศผู้ น้ำหนัก 20-30 กรัม ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สถานที่เลี้ยงเป็นห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีการควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25°C และควบคุมความสว่าง-มืด 12/12 ชั่วโมงในแต่ละวัน เปิดไฟจาก 6.00 น. ถึง 18.00 น. ที่ระดับความชื้น 70% ติดตั้งพัดลมดูดอากาศเพื่อการถ่ายเทของอากาศ กรงที่เลี้ยงจะปูรองด้วยขี้กบหนา 1 นิ้ว เพื่อใช้ดูดซับสิ่งปฏิกูล พักสัตว์ทดลองไว้ก่อนการทดลอง 1 สัปดาห์ ให้น้ำและอาหารให้ไว้กินตลอดเวลา เมื่อจะทำการทดลองสัตว์ทดลองจะถูกงดน้ำและอาหาร 1 คืน ก่อนที่จะทำการทดลอง เพื่อลดผลรบกวนการทดลองจากอาหารให้น้อยที่สุด

การศึกษาฤทธิ์ลดปวดโดยวิธี Acetic acid-induced writhing test (Panthong et al., 2007)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบ (inflammatory analgesia) โดยจะทำการสังเกตอาการที่หนูมีการบิดตัว เอาท้องถูแนบไปกับพื้นและเหยียดขาหลังออก เรียกว่า writhing response โดยทำการแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แล้ว pretreat ด้วยสารที่จะทดสอบโดยการป้อนทางปาก โดยกลุ่มที่ 1 จะได้รับ vehicle (15% Tween 20) กลุ่มที่ 2 ได้รับสารมาตรฐาน aspirin (300 mg/kg) กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับ MLE ในขนาด 250, 500 และ 1,000 mg/kg ตามลำดับ หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง ทำการกระตุ้นให้หนูปวดโดยการฉีด 0.7 % acetic acid (ปริมาณ 0.1 mL ต่อ 10 กรัมน้ำหนักตัว) เข้าที่ช่องท้องหนู แล้วบันทึกจำนวนของ writhing response ที่เกิดขึ้นหลังจากช่วงเวลา 5 นาทีแรก เป็นเวลา 30 นาที ทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวน writhing response แล้วจึงนำค่า % inhibition ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาการลดการปวดโดยวิธี tail flick test (ปณต ตั้งสุจริต และคณะ, 2549)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่ผ่านระบบประสาทส่วนกลาง โดยใช้ความร้อนเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวด การทำการทดลองใช้วิธีเอาหางหนูจุ่มลงในน้ำอุณหภูมิ 50°C และจับเวลาที่หนูทนความร้อนโดยไม่สะบัดหางหนี โดยหนูทั้งหมดจะได้รับการบันทึก response time ก่อนให้ยา และ หลังให้ยา แบ่งหนู mice ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัวแล้ว pretreat ด้วยสารที่จะใช้ทดสอบ กลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ vehicle (15% Tween 20) ป้อนทางปาก และสารมาตรฐาน tramadol (50 mg/kg) ฉีดเข้าช่องท้องตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับ MLE ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 mg/kg ป้อนทางปาก หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 60 นาทีจึงจับเวลาที่หนูสามารถทนน้ำอุ่นที่หางได้ก่อนที่จะเกิด reflex สะบัดหางออก แล้วเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันโดยวิธี Croton oil induced ear edema in mice (Gomig et al., 2008)

เป็นการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่ใบหูหนูโดยการทา croton oil ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบแล้วเปรียบเทียบขนาดความหนาของใบหูหนู ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากทา croton oil หนู mice แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่ม ละ 6 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะ DMSO 15 µL ทาใบหูซ้ายด้านนอก กลุ่มที่ 2 ได้รับสารมาตรฐาน prednisolone 10 µg ที่ละลายใน DMSO 15 µL ทาใบหูซ้ายด้านนอก กลุ่มที่ 3-5 จะได้รับ MLE ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 µg/ear (15 µL) ทาที่ใบหูซ้ายด้านนอก แล้วเหนี่ยวนำการอักเสบ โดยใช้ 75 µg croton oil ใน DMSO 15 µL ทาที่หูด้านในข้างซ้าย 3 ชั่วโมงถัดมาวัดความหนาของใบหูหนู โดยใช้ digital vernier caliper แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของหู

หนูที่บวมขึ้นของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเรื้อรังโดยวิธี Cotton pellet-induced granuloma in mice (Panthong et al., 2007)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเรื้อรังโดยผ่าตัดฝังก้อนสำลีเข้าไปใต้ผิวหนังหนู การที่น้ำหนักของก้อนสำลีเพิ่มขึ้นจะเป็นตัววัดถึงการอักเสบแบบเรื้อรัง แบ่งหนู mice เพศผู้ ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว จากนั้นสลบหนูด้วยการฉีด pentobarbital sodium (50 mg/kg) เข้าทางช่องท้อง และผ่าตัดเพื่อเอาก้อนสำลีที่ผ่านการ sterile น้ำหนัก 10±1 มิลลิกรัม ขนาด 0.5 cm ใส่เข้าไปใต้ผิวหนังของหนู โดยใช้ sterile technique หลังจากนั้นกลุ่มที่ 1 และ 2 จะได้รับ vehicle (15% Tween 20) และสารมาตรฐาน prednisolone (5 mg/kg) ป้อนทางปากตามลำดับ กลุ่มที่ 3-5 ป้อน MLE ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 mg/kg โดยให้วันละครั้งทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นผ่าตัดเอาก้อนสำลีออกมาแล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C หรือจนน้ำหนักคงที่ เพื่อที่จะดูน้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักก้อนสำลีของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ MLE

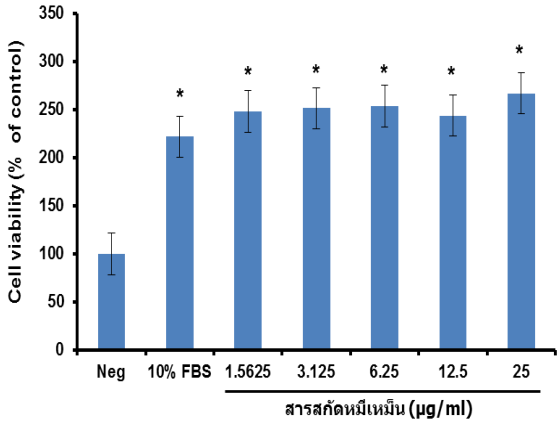
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองที่ได้รับ MLE ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยวิธี Duncan's test กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

การศึกษา cell proliferation

ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มที่ได้รับ 10 % FBS (positive control) สามารถกระตุ้น proliferation ของ human keratinocyte cell ได้ 221.67 % ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดหมีเหม็นนั้น สามารถเพิ่ม cell proliferation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีฤทธิ์แรงกว่า 10% FBS ในทุกความเข้มข้นของ MLE โดยที่ความเข้มข้น 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5 และ 25 µg/ml สามารถกระตุ้น cell proliferation ได้ 248.04 %, 251.29 %, 253.26 %, 243.77 % และ 266.93 % ตามลำดับ ดังภาพที่ 1



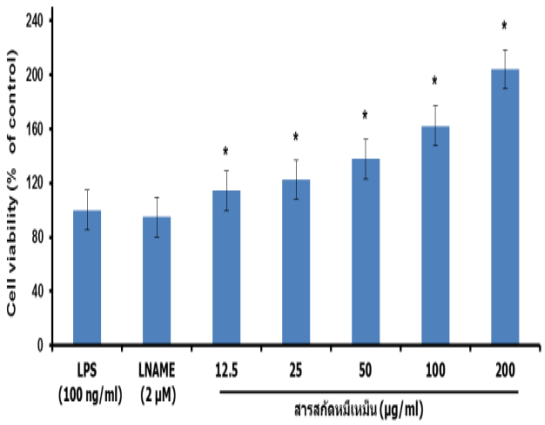
ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดใบหมีเหม็นความเข้มข้นต่างๆ และ 10 % FBS ต่อการเพิ่ม cell proliferation ของ human keratinocyte cell (HaCaT) ข้อมูลแสดงในรูป mean ± SD (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาความเป็นพิษของ MLE ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay

เป็นการศึกษาความเป็นพิษของ MLE ต่อเซลล์ RAW 264.7 ก่อนที่จะทำการทดสอบเซลล์ RAW 264.7 เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดที่จะไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ต่อไป

ผลการศึกษาพบว่า MLE ที่ขนาดความเข้มข้นของสารสกัด 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/ml ไม่มีความป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) โดยมี cell viability 114.15 %, 122.52 %, 137.65 %, 162.15 % และ 203.77 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ และยังมีแนวโน้มของ cell

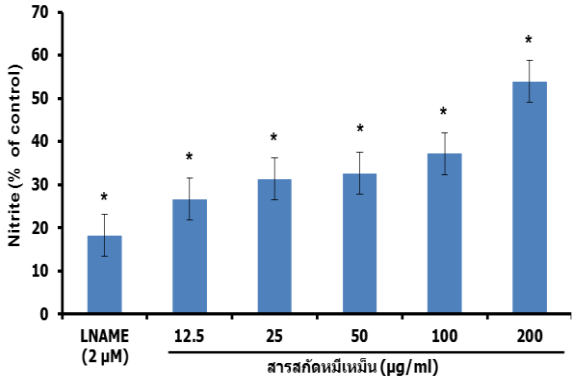
viability ที่สูงขึ้นแปรไปตามขนาดของความเข้มข้นของ MLE (ภาพที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นเหล่านี้มาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดใบหมีเหม็นที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อ cell viability ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ข้อมูลแสดงในรูป mean ± SD (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาผลของ MLE ต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO)

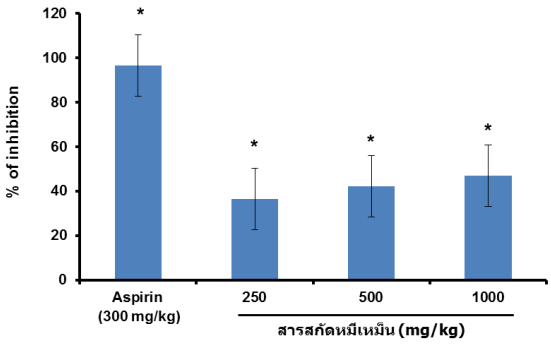
ผลการศึกษาพบว่าสาร L-NAME (2 μM) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ 18.23% ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลุ่มที่ได้รับ MLE พบว่าที่ขนาดความเข้มข้นของสารสกัด 12.5, 25, 50, 100 และ 200 μg/ml สารสกัดหมีเหม็นสามารถยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถยับยั้งได้ 26.64 %, 31.30 %, 32.66 %, 37.15 % และ 53.93 % ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังมีแนวโน้มของการยับยั้งการสร้าง NO ที่สูงขึ้นแปรไปตามขนาดของความเข้มข้นของ MLE ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดใบหมีเหม็นที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7) ข้อมูลแสดงในรูป mean ± SD (n = 8) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาฤทธิ์ลดปวดโดยวิธี writhing test

ผลการศึกษาพบว่ายา aspirin (300 mg/kg) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากเป็นยาที่มีฤทธิ์ลดปวดผ่านทางระบบประสาทรอบนอก สามารถลดจำนวนครั้งการเกิด writhing response ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle (15 % Tween 20) โดยสามารถยับยั้งการเกิดได้ 96.39 % ในกลุ่มทดลองพบว่า MLE ขนาด 250, 500 และ 1,000 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิด writhing response ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยยับยั้งได้ 36.39 %, 42.17 % และ 46.99 % ตามลำดับ โดยแปรผันตามความเข้มข้นของ MLE อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4



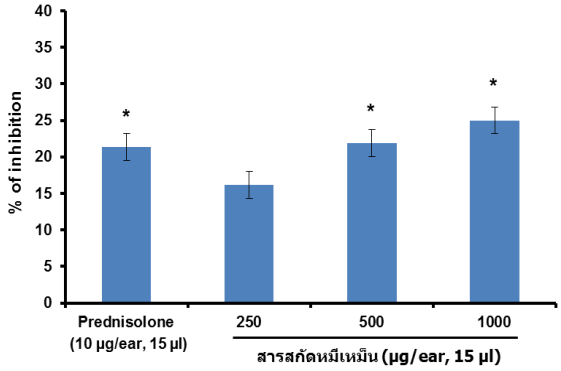
ภาพที่ 4 ผลของสารสกัดใบหมีเหม็น ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้ง writhing response ในหนู mice ที่ถูกฉีด acetic acid เข้าภายในช่องท้อง ข้อมูลแสดงในรูป mean ± SD (n = 6) * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาการลดการปวดโดยวิธี tail flick test

ผลการทดสอบพบว่ายา tramadol (50 mg/kg) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากเป็นยาที่มีฤทธิ์ลดปวดผ่านทางระบบประสาทส่วนกลาง สามารถเพิ่มเวลาที่หนูทนความร้อนโดยไม่สะบัดหางหนี (tail flick latency time) ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยสามารถเพิ่มได้ 103.43 % ในกลุ่มทดลองพบว่าที่ขนาด 250, 500 และ 1,000 mg/kg ไม่มีผลเพิ่ม tail flick latency time อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ไม่ได้แสดงภาพประกอบ)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันโดยวิธี Croton oil induced ear edema in mice

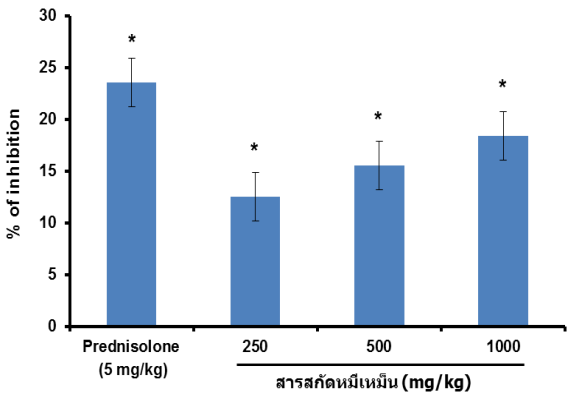
ผลการทดสองพบว่ายา prednisolone ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากมีฤทธิ์ลดการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังได้ดี สามารถลดการบวมของใบหูหนูที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสามารถยับยั้งการบวมได้ 21.35 % ในกลุ่มทดลองพบว่า MLE ในขนาดความเข้มข้น 250 µg/ear นั้นไม่สามารถลดการบวมของใบหูหนูได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ควบคุม แต่ที่ขนาด 500 และ 1,000 µg/ear นั้น MLE สามารถลดการบวมของใบหูหนูได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้น ซึ่งสารสกัดหมีเหม็นขนาด 250, 500 และ 1,000 µg/ear สามารถยับยั้งการบวมของหูได้ 16.15 %, 21.88 % และ 25.00 % ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดใบหมีเหม็นที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการบวมของใบหูหนู mice ที่ได้รับสาร croton oil เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงในรูป mean ± SD (n = 6) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเรื้อรังโดยวิธี Cotton pellet-induced granuloma in mice

ผลการศึกษาพบว่ายา prednisolone (5 mg/kg) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน สามารถลดน้ำหนักก้อนสำลีที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสามารถลดการเกิด granuloma ได้ 23.57 % ในกลุ่มทดลองพบว่า MLE ที่ขนาดความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 mg/kg สามารถลดน้ำหนักก้อนสำลีที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถลดการเกิด granuloma ได้ 12.5 %, 15.52% และ 18.38 % ตามลำดับ ซึ่งมีความแรงแปรไปตามความเข้มข้นของสารสกัด ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ผลของสารสกัดใบหมีเหม็นที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิด tissue granulation ภายในเวลา 7 วันหลังจากผ่าตัดฝังก้อนสำลีลงใต้ผิวหนังหนู ข้อมูลแสดงในรูป mean ± SD (n = 6) * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทวิจารณ์

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้ 80% เอธานอลในการสกัดเนื่องจากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Nualkaew et al. (2012) พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของใบหมีเหม็นสามารถกระตุ้น cell proliferation ใน HaCaT cell ได้อย่างมีนัยสำคัญและเห็นผลดีที่สุดในส่วนของ fraction ที่เป็นสารกลุ่ม non-polysaccharide ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ 80% เอธานอล ในการสกัดเพื่อให้ได้ทั้งสารในกลุ่ม non-polysaccharide และสารกลุ่ม phenolic compounds ซึ่งอาจเป็นสารออกฤทธิ์ของใบหมีเหม็นมาทดสอบ

ผลการทดสอบ cell proliferation พบว่าสารสกัดใบหมีเหม็นสามารถเพิ่ม cell proliferation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีฤทธิ์แรงกว่า 10% FBS ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของหมีเหม็นที่จะนำไปใช้ในการสมานแผล

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบหมีเหม็นมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO จากเซลล์มาโครฟาจได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง NO นั้นจัดเป็นสารสื่อชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ เนื่องจากในกระบวนการอักเสบพบว่า NO จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณสูงมากจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ iNOS

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าหมีเหม็นมีสารเคมีกลุ่ม flavonoids ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด อาทิเช่น naringenin, naringin, kaempferol-3 and 7-glucosides, quercitin เป็นองค์ประกอบ (Devi, Meera, 2010; Wang et al., 2010) สารกลุ่ม flavonoids เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย รวมไปถึงฤทธิ์ลดปวดและต้านอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างสารสื่อที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ (Di Carlo et al., 1999) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การลดการสร้าง NO ของสารสกัดใบหมีเหม็นส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากฤทธิ์ของสารกลุ่ม flavonoids ที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดเหล่านี้ (Mu et al., 2001; Kanno et al., 2006; Ma et al., 2015)

ผลการทดสอบ writhing test แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหมีเหม็นสามารถออกฤทธิ์ลดการปวดจากระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral analgesic) ซึ่งการฉีด acetic acid เข้าภายในช่องท้องหนู จะกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของ phospholipid ของเนื้อเยื่อและทำให้เกิดการสร้างสารสื่อการอักเสบตามมาเช่น serotonin, histamine, bradykinin, substance P และ prostaglandins ทำให้เกิดการกระตุ้นปลายประสาททำให้รู้สึกเจ็บปวดและส่งผลให้เกิดอาการ writhing (Panthong et al., 2007) ซึ่งฤทธิ์ลดปวดของสารสกัดหมีเหม็นส่วนหนึ่งน่าจะมีผลมาจากผลยับยั้งการสร้างสารสื่ออักเสบเหล่านี้ ซึ่งมีรายงานว่าสารสกัด ethanol ของหมีเหม็นนั้นมีสารเคมีที่มีฤทธิ์ลดปวด ต้านอักเสบ อาทิเช่น alkaloids, flavonoids, glycosides, tannins และ saponins ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารเหล่านี้ได้ (Pradeepa et al., 2013; Endale et al., 2013; Arct J, Pytkowska K, 2008)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบแบบเฉียบพลันด้วยวิธี croton oil-induced ear edema เป็นการกระตุ้นให้เกิดการบวมที่ใบหูของหนูโดยการทา croton oil แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหมีเหม็นมีฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยสารสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ (1,000 μg/ear) สามารถยับยั้งการบวมที่ใบหูหนูได้ 25% ซึ่งยับยั้งได้ดีกว่าสารมาตรฐาน prednisolone (10 μg/ear) สาร croton oil จัดเป็นสารก่อความระคายเคืองต่อผิวหนัง โดยมีสารเคมีในกลุ่ม phorbal ester เป็นสารประกอบที่สำคัญ พบว่าเมื่อทา croton oil ลงบนผิวหนังจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบแบบเฉียบพลันบริเวณที่สัมผัส โดยมีอาการ vasodilation, polymorphonuclear leukocyte infiltration ภายในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดอาการบวม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดผ่านการกระตุ้นการทำงานของ protein kinase C (PKC) ส่งผลต่อเนื่องไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 เป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ arachidonic acid ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ cyclooxygenase ทำให้การสร้างสาร leukotriene และ prostaglandin เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่พบว่าอาการบวมที่ใบหูหนูจาก croton oil มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร NO เนื่องจากพบว่าสาร L-N^{ω}-nitroarginine (L-NN) ที่มีฤทธิ์เป็น iNOS inhibitor สามารถลดการบวมที่ใบหูหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโดย croton oil ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Zuoqi et al., 2008) จากผลการดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการที่สารสกัดหมีเหม็นมีฤทธิ์ลดการบวมที่ใบหูหนูได้นั้นคาดว่าอาจเกิดจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร NO ของสารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่พบว่าสารสกัดใบหมีเหม็นสามารถลดการสร้างสาร NO ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ผลจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเรื้อรังโดยวิธี cotton pellet-induced granuloma in mice โดยการผ่าตัดเอาก้อนสำลีใส่เข้าใต้ผิวหนังของหนูเพื่อทำให้เนื้อเยื่อเกิดการสะสมของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (tissue granulation) เมื่อผ่าตัดเอาก้อนสำลีใส่เข้าใต้ผิวหนังของหนูจะทำให้เซลล์ macrophage และสารคัดหลั่งจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเคลื่อนเข้ามาสะสมในก้อนสำลี (Panthong et al., 2007) ซึ่งการเกิด granuloma ในการอักเสบแบบเรื้อรังนี้มีความเกี่ยวข้องกับสาร cytokine หลายชนิด เช่น interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrotic factor (TNF-α) เป็นต้น สารสื่อทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์กระตุ้น fibroblast มีผลเพิ่มจำนวน fibroblast กระตุ้นการสร้างเส้นใย collagen และ ทำให้มีลิมโฟซัยต์เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบมากขึ้น เป็นผลทำให้เกิด granuloma จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบหมีเหม็นทุกความเข้มข้นที่ทดสอบสามารถลดการเกิด granuloma ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งฤทธิ์ส่วนหนึ่งอาจจะมีผลจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารสื่อ IL-1 หรือ TNF-α ของ flavonoids ในสารสกัด (Kanno et al., 2006; Endale et al., 2013)

บทสรุป

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าหมีเหม็นเป็นพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งการอักเสบและมีศักยภาพในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการสมานแผล แต่กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่สามารถทราบได้แน่ชัด ซึ่งต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในเรื่ององค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ของสารสกัดรวมทั้งข้อมูลการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการอักเสบและสมานแผลในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง เช่น ผลการยับยั้งการหลั่งสารสื่อการอักเสบต่างๆ การยับยั้งเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase, lipoxygenase และ cyclooxygenase เป็นต้น รวมทั้งการศึกษาเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านอักเสบและสมานแผลในสัตว์ทดลองและในระดับเซลล์โดยวิธีอื่นๆ ซึ่งการทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์จะเป็นข้อมูลสำคัญที่ยืนยันถึงฤทธิ์ต้านอักเสบและสมานแผลของหมีเหม็น ซึ่งจะทำให้ผู้ที่นำไปใช้เกิดความมั่นใจ นอกจากนั้นยังเป็นแนวทางที่จะนำหมีเหม็นไปผลิตเป็นยาสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อีกทั้งจะ

เป็นข้อมูลสนับสนุนและส่งเสริมการนำหมีเหม็นไปใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบและสมานแผลที่มีผลข้างเคียงน้อยต่อไป ซึ่งจะเป็นการลดปัญหาทางสุขภาพของคนในชุมชน ลดค่าใช้จ่ายด้านสุขภาพ และเป็นการประหยัดเงินงบประมาณของชาติจากการซื้อยาจากต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณเจตนา วีระกุล คุณสันติ โพธิ์ศรี คุณชวพล พิพัฒน์วัชรเดช ที่ได้ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัย การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่นในปีการศึกษา 2556 ภาคต้น

เอกสารอ้างอิง

ปณต ตั้งสุจริต, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์, วันชัย ไอยารัตน์. การตรวจสอบฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านอักเสบของ พืชผักพื้นบ้านอีสาน. ศรีนครินทร์เวชสาร. 2549; 21(4): 305–310

Arct J, Pytkowska K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. Clin Dermatol. 2008; 26(4): 347–357.

Bhowmick R, Sarwar M, Dewan S, Das A., Das B, Uddin M, Islam M, Islam M. *In vivo* analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory potential in Swiss albino mice and in vitro thrombolytic activity of hydroalcoholic extract *from Litsea glutinosa* leaves. Biol Res. 2014; 47(1): 56–64.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci. 1999; 65(4): 337–353.

Devi P, Meera R. Study of antioxidant, anti-inflammatory and wound healing activity of extracts of *Litsea glutinosa*. J Pharm Sci & Res. 2010; 2(2): 155–163.

Endale M, Park SC, Kim S, Kim SH, Yang Y, Cho JY, Rhee MH. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF-KB-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7cells. Immunobiology. 2013; 218(12): 1452–1467

Gomig F, Pietrovski EF, Guedes A, Dalmarco EM, Calderari MT, Guimarães CL, Pinheiro RM, Cabrini DA, Otuki, MF. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta Radlk* (Sapindaceae) extracts. J Ethnopharmacol. 2008; 118(2): 220–224.

Jantaratnotai N, Utaisincharoen P, Piyachaturawat P, Chongthammakun S, Sanvarinda Y. Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia. Life Sci. 2006; 78 (6): 571–577.

Kanno S, Shouji A, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Ujibe M, Obara Y, Nakahata N, Ishikawa M. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide(LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 2006; 78(7): 673–681.

Ma X, Yu Q, Guo X, Zeng K, Zhao M, Tu P, Jiang Y. Nitric oxide inhibitory flavonoids from traditional Chinese medicine formula Baoyuan Decoction. Fitoterapia. 2015; 103: 252–259.

Mu MM, Chakravortty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. J Endotoxin Res. 2001; 7(6): 431–438.

Nualkaew N, Wang R, Hensel A. Stimulation of cellular proliferation of human fibroblasts and human keratinocytes cell by *Eclipta prostrata* and *Litsea glutinosa* extracts. Planta Med. 2012; 78 (11): PI166.

Panthong A, Norkaew P, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Anantachoke N, Reutrakul V. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboge from *Garcinia hanburyi* Hook f. J Ethnopharmacol. 2007; 111(2): 335–340.

Pradeepa K, Krishna V, Veenkatesh V, Santosh R, Girish K. Antinociceptive Property of Leaves Extract of *Litsea glutinosa*. Asian J Pharm Clin Res. 2013; 6 (Suppl 1): 182–184.

Wang Y-S, Huang R, Lu H, Li F-Y, Yang J-H. A new 2'-oxygenated flavone glycoside from *Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob. Biosci Biotechnol Biochem. 2010; 74(3): 652–654.

Zuoqi D, Yue D, Haiping H, Rong P, Xiujuan Y, Zhengtao W. Anti-Inflammatory Effects of Scopoletin and Underlying Mechanisms. Pharm Biol 2008; 46(12): 854–860.