

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของยางโมก (*Wrightia pubescens*) และ
โมกบ้าน (*Wrightia religiosa*) ใน RAW 264.7 mouse macrophages

The study of anti-inflammatory activity of *Wrightia pubescens* and
Wrightia religiosa latex in RAW 264.7 mouse macrophages

คณะผู้วิจัย

นางสาวจุฑารัตน์ จิตติมณี

วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประจำปีงบประมาณ 2551

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2551 ได้รับการสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือวิจัยจากวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งเป็นต้นสังกัด ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมีและศูนย์เมลิออยโดสิส มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือวิจัย และขอขอบคุณอาจารย์ช่อทิพย์ ถิ่นทโชติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งช่วยให้คำแนะนำในการเก็บตัวอย่างพืชเพื่อศึกษา ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2552

รายงานการวิจัยเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของยาง โมก (<i>Wrightia pubescens</i>) และ โมกบ้าน (<i>Wrightia religiosa</i>) ใน RAW 264.7 mouse macrophage
ผู้วิจัย	นางสาวจุฑารัตน์ จิตติมณี วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
คำสำคัญ	<i>Wrightia pubescens</i> , <i>Wrightia religiosa</i> , PGE ₂ , COX-2

บทคัดย่อ

ยางโมก (*Wrightia pubescens*) และ โมกบ้าน (*Wrightia religiosa*) ถูกใช้ในบรรเทาอาการอักเสบและอาการปวดตามรายงานภูมิปัญญาท้องถิ่น อย่างไรก็ตามกลไกในการบรรเทาอาการอักเสบและอาการปวดของยาง โมกยังไม่มีข้อมูลแน่ชัด ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยางโมกในยับยั้งการสร้าง prostaglandin E₂ (PGE₂) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในเซลล์ RAW 264.7 mouse macrophage เนื่องจาก PGE₂ เป็นโมเลกุลสื่อกลางที่สำคัญในกระบวนการอักเสบและการปวด และมักเป็นเป้าหมายในการศึกษาและผลิตยาแก้อักเสบ การทดลองเริ่มจากการเตรียมยาง โมกและ โมกบ้านแห้งก่อนใช้งาน และเตรียมเซลล์ macrophage สำหรับใช้ในการศึกษา ซึ่งเซลล์จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS พร้อมกับการเติมยาง โมกและ โมกบ้านความเข้มข้นต่างๆ (10, 25, และ 100 µg/mL) ลงไปทันที กลุ่มที่สอง กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS 1 ชั่วโมง ก่อนเติมยาง โมกและ โมกบ้านความเข้มข้นต่างๆ (10, 25, และ 100 µg/mL) จากนั้นตรวจวัดปริมาณของ PGE₂ และ COX-2 โดยอาศัยเทคนิค enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) และ western blotting analysis ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้พบว่า ยางโมกสามารถยับยั้งการสร้าง PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้ง PGE₂ จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาง โมกขึ้น ในขณะที่ปริมาณของเอนไซม์ COX-2 ก็ลดลงเช่นเดียวกัน ระดับ PGE₂ ที่ลดลงเป็นผลมาจากการยับยั้งการสร้าง COX-2 ไม่ใช่การยับยั้งการทำงานของ COX-2 โดยตรง ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ของยางโมกบ้าน พบว่าสามารถการยับยั้งการสร้าง PGE₂ เช่นกัน ยกเว้นในกลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ก่อนเติมยางโมกบ้าน ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยังไม่ชัดเจน และยางโมกบ้านก็สามารถยับยั้งการสร้าง COX-2 ได้เช่นเดียวกับยางโมก ถึงแม้ว่าปริมาณ COX-2 จะลดลงเพียงเล็กน้อย

ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นฤทธิ์ของยาง โมกและ โมกบ้านในการยับยั้งการสร้าง COX-2 และ PGE₂ ใน RAW 264.7 mouse macrophage โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยาง โมก ซึ่งอาจมีผลในการลดและบรรเทาอาการอักเสบและอาการปวดได้

Title The study of anti-inflammatory activity of *Wrightia pubescens* and *Wrightia religiosa* latex in RAW 264.7 mouse macrophage

Researcher Miss Jutharat Jittimane
College of Medicine and Public Health Ubonratchathani University

Keywords *Wrightia pubescens*, *Wrightia religiosa*, PGE₂, COX-2

Abstract

Wrightia pubescens (WP) and *Wrightia religiosa* (WR) latex has been used as anti-inflammatory and antinociceptive drug in traditional medicine. However, the mechanism of this latex is still unclear. This study was aimed to determine inhibitory activity of WP and WR latex on prostaglandin E₂ (PGE₂) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme produced by RAW 264.7 mouse macrophages. Because, PGE₂ is an important mediator in inflammation and pain. Moreover, PGE₂ is frequently used as target of anti-inflammatory drug. Initially, the dry plant latex was prepared. The macrophages were cultured and divided in to 2 main groups. The first group, macrophages were treated with lipopolysaccharide (LPS) and WP/ WR latex in various concentration (10, 25, and 100, µg/mL) at the same time. The second group (pre-induced COX-2 group), macrophages were treated with LPS for 1 hour before added WP/WR latex in various concentration (10, 25, and 100, µg/mL). PGE₂ and COX-2 were detected by using enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) and western blotting analysis techniques, respectively. Compared with LPS group, significantly reduction of PGE₂ was found in WP-activated groups ($P < 0.05$), especially in high concentration of WP latex. The level of COX-2 enzyme in WP-activated groups was also decreased as well. The reduction of PGE₂ may be caused by suppression of COX-2 induction, but not by inhibition of COX-2 activity directly. As well as WP latex, significantly reduction of PGE₂ was found in WR-activated groups, excepted pre-induced COX-2 group which is still unclear. While slightly reduction of COX-2 can be observed.

These results suggest that both WP and WR latex, particularly WP latex, can inhibit COX-2 and PGE₂ in RAW 264.7 mouse macrophages which may lead to relief inflammation and pain.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	vi
สารบัญภาพ	vii
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	viii
บทที่ 1 บทนำ	
- ความสำคัญ และที่มาของการวิจัย	1
- วัตถุประสงค์	2
- ขอบเขตของงานวิจัย	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
- การอักเสบ	3
- สาเหตุของการอักเสบ	3
- สารสื่อกลางในการอักเสบ	4
- การสังเคราะห์และบทบาทของ prostaglandin	7
- บทบาทของ PGE ₂ ในกระบวนการอักเสบและการปวด	8
- การใช้สมุนไพรในการบรรเทาการอักเสบและการปวด	9
- ลักษณะของโมกและ โมกบ้าน	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
- การเก็บและเตรียมยาง โมกแห้ง	13
- การทดสอบความเป็นพิษของยาง โมก	14
- การกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 mouse macrophage ด้วยยางโมกและ โมกบ้าน	15
- การตรวจวัดความเข้มข้นของ PGE ₂	17
- การตรวจหาเอนไซม์ COX-2 โดยวิธี western blotting analysis	18
- การวิเคราะห์ข้อมูล	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
- การเตรียมตัวอย่างยาง โมกและ โมกบ้านแห้ง	20
- การเตรียม RAW 264.7 mouse macrophage ในการทดลอง	21

- การทดสอบความเป็นพิษของยาง โมกและ โมกบ้าน	21
- การตรวจวัดความเข้มข้นของ PGE ₂	23
- การตรวจหาเอนไซม์ COX-2 ที่สกัดจากเซลล์	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	28
- สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	28
- ปัญหาอุปสรรคและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	33
- ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการวิจัย	34
- ภาคผนวก ข ข้อมูลวิจัยและผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	39
ประวัตินักวิจัย	52

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การทดลองกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 mouse macrophage ด้วย LPS, NS-398, ขางโมกและโมกบ้าน	16

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 กระบวนการสร้าง prostaglandin, prostacyclin และ thromboxane	7
รูปที่ 2 ปริมาณ PGE ₂ ที่สร้างขึ้นมาจาก macrophage หลังกระตุ้นด้วย LPS	8
รูปที่ 3 แสดงลักษณะดอกของโมก <i>Wrightia pubescens</i> (A) ดอกของโมกบ้าน <i>Wrightia religiosa</i> (B)	20
รูปที่ 4 ยางโมกแห้ง	20
รูปที่ 5 RAW 264.7 mouse macrophage (กำลังขยาย 400 เท่า)	21
รูปที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจาก RAW 264.7 mouse macrophage ที่เติมยางโมก (WP) (A) และ โมกบ้าน (WR) (B) ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งทดสอบ โดยอาศัย XTT cell viability assay	22
รูปที่ 7 ความเข้มข้นของ PGE ₂ (pg/mL) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้น เซลล์ macrophage ด้วยยางโมก	24
รูปที่ 8 ความเข้มข้นของ PGE ₂ (pg/mL) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้น เซลล์ macrophage ด้วยยางโมกบ้าน	26
รูปที่ 9 แถบของเอนไซม์ COX-2 จากเซลล์กลุ่มต่างๆ ตรวจวัดโดยวิธี western blotting analysis	27

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

A ₄₅₀	Absorbance at wavelength 450 nanometer
ATCC	American type culture collection
CO ₂	Carbondioxide
cm	Centimeter
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
°C	Degree celsius
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	Enzyme linked-immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
g	Gram
HRP	Horseradish peroxidase
hr	Hour
IgG	Immunoglobulin G
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
µg	Microgram
µm	Micrometer
µL	Microliter
mL	Milliliter
mM	Milimolar
nm	Nanometer
pg	Picogram
PBS	Phosphate saline buffer
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ or Prostacyclin

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
NaCl	Sodium chloride
SDS	Sodium dodecyl sulfate
xg	Times gravity
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
Tris-HCl	Tris hydrochloride
WP	<i>Wrightia pubescens</i>
WR	<i>Wrightia religiosa</i>

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของการวิจัย

สมุนไพรเป็นสิ่งที่อยู่คู่กับวิถีชีวิตของคนไทยมานาน ถึงแม้ในปัจจุบันประชาชนจะคุ้นเคยกับการใช้ยาแผนปัจจุบัน แต่แนวโน้มในการกลับมาใช้และให้ความสำคัญกับการใช้สมุนไพรต่างๆ เริ่มมีมากขึ้น จากข้อมูลทางด้านเศรษฐกิจของศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย พบว่ามูลค่าตลาดรวมของสมุนไพรในปี 2548 มีมูลค่าถึง 4,800 ล้านบาท นอกจากนี้ ยังมีการจัดทำฐานข้อมูลสมุนไพรมากมายเพื่อให้ความรู้แก่ประชาชน เช่น ศูนย์ข้อมูลสมุนไพรของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และฐานข้อมูลสมุนไพรของสถาบันอุดมศึกษาต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและเผยแพร่วารสาร ถึงประโยชน์และกลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรต่างๆ

สมุนไพรที่ใช้ในวงการแพทย์แผนไทยมีหลากหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มที่บรรเทาอาการท้องอืดท้องเฟ้อ ถ่ายพยาธิ แก้ไอแก้เจ็บคอ เป็นต้น สมุนไพรที่ใช้บรรเทาอาการปวดและการอักเสบก็เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่ใช้กันมาก เนื่องจากการอักเสบมักพบได้บ่อยครั้งในการดำรงชีวิตประจำวัน ซึ่งสาเหตุที่ก่อให้เกิดการอักเสบก็มีหลายประการ อาจเกิดจากการได้รับพิษจากพืชหรือสัตว์ เช่น พิษงู พิษแมลงป่อง พิษผึ้ง หรือแม้กระทั่งสารพิษจากพืชที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ตัวอย่างของสมุนไพรในกลุ่มนี้ได้แก่ ขงระระอา ทองกลาง เทียนบ้าน ผักคราดหัวแหวน และ โหมก เป็นต้น

โหมกซึ่งเป็นพืชที่นิยมปลูกกันทั่วไป เนื่องจากดอกมีกลิ่นหอมและเป็นไม้มงคล ก็มีรายงานภูมิปัญญาท้องถิ่นว่าขงโหมก (*W. pubescens*) มีฤทธิ์บรรเทาการปวดฟัน (Batugal et al., 2004) และพบว่าเปลือกลำต้น โหมกชนิด *Wrightia tinctoria* มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด (antinociception) ใช้ในการรักษาอาการปวดท้อง (Joshi et al., 1980) นอกจากนี้ในอินเดียยังมีรายงานการใช้สารสกัดจากเปลือกลำต้น และเปลือกรากของ *Wrightia tomentosa* ในการรักษาพิษแมลงป่อง (Hutt and Houghton, 1997) การศึกษาต้นโหมกชนิด *W. tinctoria* ในหนู mice พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวด (Reddy et al., 2002) อย่างไรก็ตามยังไม่มียางานการศึกษากลไกการอักเสบที่แน่ชัด

การทดลองครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ในบรรเทาการอักเสบของขงโหมก 2 ชนิด ได้แก่ โหมก (*W. pubescens*) และ โหมกบ้าน (*W. religiosa*) โดยวัดระดับการยับยั้งการสร้าง Prostaglandin E₂ (PGE₂) ซึ่งเป็นโมเลกุลในกลุ่ม inflammatory mediator และ ศึกษาการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง PGE₂ ใน RAW 264.7 mouse macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งจะทำหน้าตัวกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ

ผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น (Preliminary data) ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของขงโหมกต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยางโมก (*W. pubescens*) และ โมกบ้าน (*W. religiosa*) ในการยับยั้งการสร้าง PGE₂ และ เอนไซม์ COX-2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ใน RAW 264.7 mouse macrophage (*in vitro*) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการศึกษาฤทธิ์ของยางโมก (*W. pubescens*) และ โมกบ้าน (*W. religiosa*) ในการยับยั้งการสร้าง PGE₂ และ เอนไซม์ COX-2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ใน RAW 264.7 mouse macrophage (*in vitro*) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยอาศัยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ western blotting analysis ตามลำดับ ซึ่งจะทำให้การทดลองที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุขมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลที่ได้มาสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน (preliminary data) ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของยางโมกและโมกบ้านต่อไป

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การอักเสบ (inflammation)

การอักเสบเป็นการกระบวนการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายเพื่อต่อต้านสิ่งแปลกปลอมนั้นๆ

การอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) เป็นกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว บริเวณที่เกิดการอักเสบจะมีลักษณะ บวม (swelling) แดง (redness) ปวด (pain) ร้อน (heat) และเนื้อเยื่อ บริเวณนั้นจะสูญเสียหน้าที่การทำงาน (lost of function) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่เกิดขึ้น การอักเสบจะเกิดขึ้นตลอดเวลาจนกว่าสิ่งแปลกที่เป็นสาเหตุจะถูกกำจัดหรือถูกทำลายไป กระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลันเริ่มต้นจากการรั่วหลุดออกมาของ plasma protein และ leukocytes จากหลอดเลือดบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บหรือสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม เข้าสู่เนื้อเยื่อรอบข้างก่อให้เกิดอาการบวมบริเวณนั้น มีการเพิ่มการไหลของเลือดตรงบริเวณดังกล่าวเกิดลักษณะสีแดงขึ้นและมี ความร้อนเกิดขึ้น เนื้อเยื่อ บริเวณที่เกิดการบาดเจ็บหรือถูกบุกรุกด้วยสิ่งแปลกปลอมจะปล่อยสาร chemotactic ดึงดูด leukocyte โดยเฉพาะ neutrophils ซึ่งจะพบมากในระยะแรกของการอักเสบ หลังจากนั้น 4-6 ชั่วโมงก็จะพบ monocytes และ lymphocytes ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) จะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นไม่ถูกกำจัดออกไปจนหมด การอักเสบยังดำเนินต่อไป เกิดพยาธิสภาพขึ้นและร่างกายพยายามจะซ่อมแซมบริเวณดังกล่าว ลักษณะของการอักเสบแบบเรื้อรังจะแตกต่างจากแบบเฉียบพลัน การอักเสบแบบเรื้อรังจะเกิดการรวมตัวของ mononuclear cells (monocytes, lymphocytes, macrophages, plasma cells) พบ collagen จำนวนมาก และเกิด fibrosis

สาเหตุของการอักเสบ

สาเหตุที่ก่อให้เกิดการอักเสบมีมากมาย ได้แก่

- การเผาไหม้
- การได้รับสารเคมี
- การสัมผัสพิษต่างๆ จากทั้งพืชและสัตว์
- การติดเชื้อต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส
- การอักเสบหลังจากเกิดการบาดเจ็บ
- ภาวะภูมิคุ้มกันไวเกิน (hypersensitivity)

สารสื่อกลางในการอักเสบ (Inflammatory mediator)

สารสื่อกลาง หรือ mediator ในการอักเสบมีแหล่งที่มาจาก plasma โดยอยู่ในรูปของสารตั้งต้น (precursor) หรือหลั่งออกมาโดยเซลล์บางชนิด สารสื่อกลางเหล่านี้จะไปจับกับ receptor ซึ่งมีความจำเพาะต่อกันบนเซลล์ต่างๆที่มีบทบาทในการอักเสบ ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แตกต่างกันไปตามชนิดสารสื่อกลางในการอักเสบ และชนิดของเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย (target cell) สารสื่อกลางในการอักเสบส่วนใหญ่มีอายุสั้น มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ไม่นาน สารสื่อกลางในการอักเสบบางชนิดกระตุ้นให้เซลล์สร้าง secondary mediator ต่อไปอีกเป็นการขยายผลปฏิกิริยาการอักเสบ

สารสื่อกลางในการอักเสบ (Kumar et al., 2006)

กลุ่มที่สำคัญได้แก่

1. Vasoactive amine

สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ histamine และ serotonin สาร histamine มีบทบาทสำคัญอย่างมากในระยะเริ่มต้นปฏิกิริยาการอักเสบ โดยมีฤทธิ์เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือดชนิด venule (โดยวิธี endothelial contraction) และทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดชนิด arteriole เซลล์สำคัญในการสร้าง histamine ได้แก่ mast cell ซึ่งพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่บริเวณรอบหลอดเลือด basophil และเกร็ดเลือด (platelet)

2. สารสื่อกลางที่สร้างขึ้นจากสารประกอบใน plasma หรือ สารกลุ่ม plasma protease

สารสื่อกลางในกลุ่มใหญ่นี้ประกอบด้วยระบบ mediator ที่สำคัญ 3 ระบบได้แก่

complement system kinin system และ clotting system

2.1 complement system

การกระตุ้นระบบ complement (โดยวิธี classical หรือ alternative pathway) ทำให้เกิด mediator ที่สำคัญ ได้แก่

- C3a และ C5a มีฤทธิ์เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด และทำให้หลอดเลือดขยายตัว โดยการกระตุ้นการหลั่ง histamine จาก mast cell นอกจากนี้ C5a ยังสามารถกระตุ้นการสร้าง mediator บางส่วนในกลุ่ม arachidonic acid metabolites ที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการสร้าง mediator ในปฏิกิริยาการอักเสบ
- C3b มีฤทธิ์เป็น opsonin ซึ่งมีบทบาทช่วยเสริมการจับกิน (phagocytosis) ของเม็ดเลือดขาว

2.2 Kinin system

เมื่อมีการกระตุ้นกลไกการแข็งตัวของเลือดด้วยวิธี intrinsic โดยเริ่มจากการกระตุ้น Hageman factor (factor XII) จะเกิดการกระตุ้นระบบ kinin ด้วย ทำให้มีการเปลี่ยน prekallikrein เป็น kallikrein ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยน high-molecular-weight kininogen (HMWK) ไปเป็น bradykinin

ฤทธิ์สำคัญของสารสื่อกลางในระบบ kinin ในการอักเสบ ได้แก่

- Bradykinin มีฤทธิ์เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด ทำให้ smooth muscle หดตัว และทำให้เกิดอาการปวด bradykinin ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์สั้นเนื่องจากถูกยับยั้งได้ด้วยเอนไซม์ kininase
- Kallikrein มีฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญของ Hageman factor (factor XII) ทำให้เกิดการทวีคูณและขยายผลของปฏิกิริยาต่อไป และยังมีฤทธิ์เป็น chemotactic factor อีกด้วย

2.3 Clotting system

การกระตุ้น clotting system ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ซึ่งในขั้นสุดท้ายจะมีการสร้าง thrombin ไปเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ในภาวะปกติ Hageman factor อยู่ในสภาพ inactive แต่จะถูกกระตุ้นสัมผัสกับ collagen หรือ basement membrane หรือ เกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated platelet) ผลผลิตของ clotting system ที่เกิดขึ้น มีฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่

- Thrombin กระตุ้น leukocyte adhesion และ กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์สำคัญในการซ่อมแซม และ มีบทบาทในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่
- Fibrinopeptide ซึ่งมีฤทธิ์เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด และ เป็น chemotactic factor

3. Cytokines

Cytokine เป็นสาร polypeptide ที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ก่อการอักเสบ สร้างโดยเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะ activated lymphocyte และ macrophage cytokine ที่สำคัญที่มีฤทธิ์เกี่ยวกับการอักเสบ ได้แก่ interleukin-1 (IL-1), Tumor Necrotic Factor alpha (TNF- α), และ IL-8 ทั้ง IL-1 และ TNF- α มีฤทธิ์เกี่ยวกับการอักเสบคล้ายคลึงกัน ได้แก่

- กระตุ้น endothelial cell ทำให้เพิ่มการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาว เพิ่มการสร้างสารกลุ่ม eicosanoids เพิ่มการกระตุ้นการสร้างลิ่มเลือดโดย endothelial cell (endothelial thrombogenicity) และเพิ่มการสังเคราะห์ cytokine ชนิดต่างๆ และ growth factor
- ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า acute phase reaction ซึ่งประกอบด้วยอาการดังต่อไปนี้ เช่น อาการไข้ อาการง่วงนอน หรือ เพิ่ม slow-wave sleep อาการเบื่ออาหาร ความดัน

โลหิตลดต่ำหรืออาการช็อค และการมีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในเลือดสูงขึ้น (neutrophilia)

- กระตุ้น fibroblast ซึ่งมีผลเพิ่มจำนวน fibroblast กระตุ้นการสร้างเส้นใย collagen และเพิ่มการสร้าง เอนไซม์ collagenase ที่สามารถย่อยสลาย collagen

นอกจากนี้ IL-8 ยังเป็น chemoattractant ที่มีฤทธิ์มากในการกระตุ้น neutrophil

4. Nitric Oxide (NO)

เป็น free radical gas ที่ละลายในน้ำได้ สร้างขึ้นโดย activated macrophage และ endothelial cell ออกฤทธิ์สั้นและเฉพาะที่มีฤทธิ์สำคัญในการส่งเสริมการอักเสบ ได้แก่ ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและออกฤทธิ์เป็น cytotoxic free radical แต่ NO ก็มีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย ได้แก่ ระวังการจับกลุ่มของเกร็ดเลือด และยับยั้ง leukocyte adhesion NO จึงมีบทบาทเป็น mediator ที่คอยควบคุมปฏิกิริยาการอักเสบไม่ให้เกิดมากเกินไป

5. Arachidonic acid (AA) metabolites

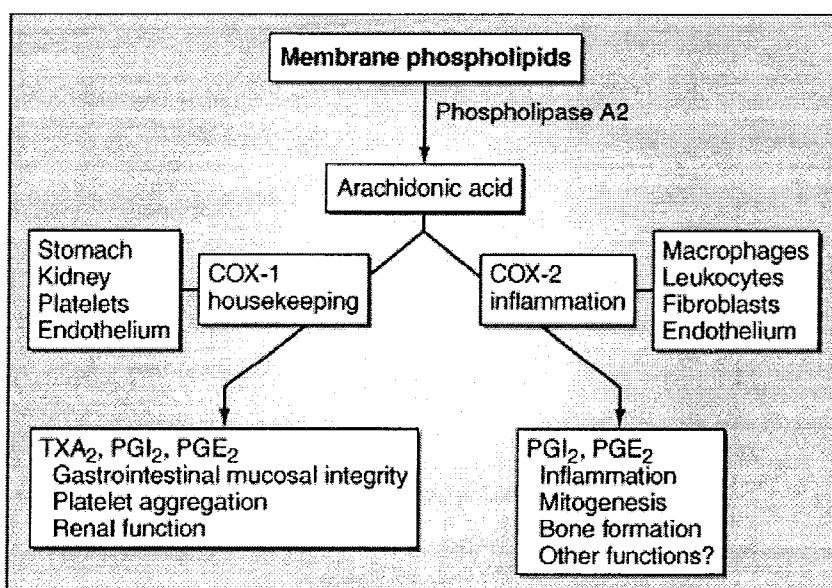
กลุ่มสารที่สำคัญในสารสื่อกลางกลุ่มนี้ ได้แก่ prostaglandins และ leukotrienes หรือเรียกรวมกันว่า eicosanoids

arachidonic acid เป็นกรดไขมันชนิด polyunsaturated ตามปกติจะพบอยู่ในรูป esterified ภายใน phospholipid ของ cell membrane ของเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อเกิดภัยอันตรายต่อเนื้อเยื่อหรือจากการอักเสบ จะเกิดการกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase โดย C5a ทำให้เกิดการย่อย phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์และปลดปล่อยกรดนี้ออกมา จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid จนเกิดเป็นกลุ่ม mediator มีจำนวนมาก ที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการอักเสบเกือบทุกขั้นตอน mediator ชนิดที่สำคัญ ได้แก่

- Thromboxane A₂ มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัวและกระตุ้นการจับกลุ่มของเกร็ดเลือด
- Leukotriene C₄, leukotriene D₄ และ leukotriene E₄ มีฤทธิ์ เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือดและทำให้หลอดเลือดหดตัว
- Leukotriene B₄ มีฤทธิ์เป็น chemotactic factor ที่สำคัญมาก และทำให้เกิดการเกาะติดของเม็ดเลือดขาว
- Prostacyclin หรือ prostaglandin I₂ (PGI₂) และ PGE₂ มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด

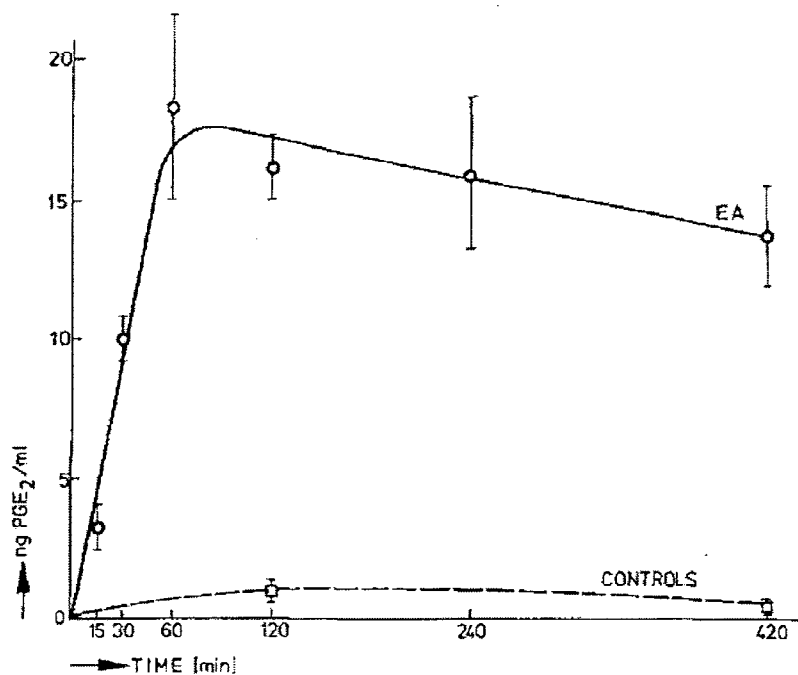
การสังเคราะห์และบทบาทของ PG

กระบวนการสังเคราะห์ PG อาศัยสารตั้งต้นคือ Arachidonic acid ซึ่งกรดไขมันชนิดนี้ได้มาจากการย่อย phospholipid ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการทำงานของเอนไซม์ Phospholipase A₂ จากนั้นขั้นตอนสำคัญต่อมาคือการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ซึ่งแบ่งออกเป็น COX-1 และ COX-2 เอนไซม์ COX-1 พบเป็นปกติในเนื้อเยื่อและเซลล์ต่างๆ เช่น กระเพาะอาหาร ไต เกร็ดเลือด และเซลล์เยื่อ (endothelial cell) COX-1 มีบทบาทสำคัญในการสร้าง TXA₂, PGI₂, และ PGE₂ ซึ่งต่อการทำงานของไต gastrointestinal mucosa และทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) ในขณะที่การแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 จะถูกชักนำโดยสิ่งกระตุ้นการอักเสบ (inflammatory stimuli) ซึ่งเอนไซม์นี้จะพบในเซลล์ macrophages, leukocytes, fibroblasts, และ synovial cells เอนไซม์ COX-2 มีบทบาทสำคัญในการสร้าง PGI₂ และ PGE₂ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบและ mitogenesis (Fauci et al., 2008) PGE₂ ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (Kumar et al., 2006) ส่วน PGI₂ ทำหน้าที่ป้องกันการจับกันของเกล็ดเลือดและทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (Neash, 2006) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 กระบวนการสร้าง prostaglandin, prostacyclin และ thromboxane (Fauci et al., 2008)

ในการทดลองโดย Glatt et al. (1977) พบว่าการกระตุ้น macrophage ด้วย LPS ทำให้มีสร้าง PGE₂ ออกมาตั้งแต่เริ่มกระตุ้นเซลล์ ระดับของ PGE₂ จะสูงมากในช่วง 1-2 ชั่วโมงหลังกระตุ้นเซลล์ จากนั้นระดับ PGE₂ จะค่อยๆ ลดลงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปริมาณ PGE₂ ที่สร้างขึ้นมาจาก macrophage หลังกระตุ้นด้วย LPS (Glatt et al., 1977)

บทบาทของ PGE₂ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการปวด

PGE₂ เป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในร่างกายหลายประการ เช่น บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท ความดันโลหิต (vascular hypertension) การเกิด tumor การทำงานของไต และบทบาทที่สำคัญอีกอย่างคือ เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการปวด (Kobayashi et al, 2002)

กระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลันเป็นกลไกของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม (pathogen) ที่เข้าสู่ร่างกาย ทำให้เกิดอาการแสดงซึ่งมีลักษณะที่สำคัญ ได้แก่ ปวด บวม แดง ร้อน ตรงบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งในบริเวณนี้จะมีการสร้าง PGE₂ ขึ้นมาซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilator) เสริมฤทธิ์กับการทำงานของ histamin และ bradykinin ซึ่งเพิ่ม vascular permeability ของหลอดเลือด (Davies et al., 1984) ยิ่งไปกว่านั้น PGE₂ ยังเป็นสารตัวกลางในกระบวนการอักเสบ และยังเป็น hyperalgesic ใน peripheral nervous system อีกด้วย (Dinarello et al., 1999)

PGE₂ เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในกลุ่ม prostanoid ในร่างกายมนุษย์ การยับยั้งการหลั่ง PGE₂ ถือเป็นกลยุทธ์ในการต่อต้านการอักเสบที่ดูถูกใช้มานานกว่า 100 ปี (Vane and Botting, 2003)

สารที่ยับยั้งการสร้าง PGE₂

ในกระบวนการอักเสบ COX-2 มีบทบาทในการสร้าง PG (Seibert et al., 1994) หากเกิดการยับยั้งการทำงานของ COX-2 จะส่งผลยับยั้งการสร้าง PG ด้วย ดังนั้นยาแผนปัจจุบัน เช่น aspirin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX (Vane and Botting, 2003) จึงมีผลทำให้ลดการอักเสบ อย่างไรก็ตามการยับยั้งทั้ง COX-1 และ COX-2 ของยาชนิดนี้ นอกจากจะทำให้การอักเสบลดลงแล้วยังส่งผลเสียต่อผนังกระเพาะและทางเดินอาหาร สามารถทำให้เกิดแผลขึ้นในทางเดินอาหารได้ ดังนั้นการใช้ยาที่มีฤทธิ์เป็นยับยั้งเฉพาะ COX-2 (selective COX-2 inhibitor) จะช่วยลดผลกระทบต่อทางเดินอาหาร (Fauci et al., 2008) ในการทดลอง NS-398 ก็เป็นสารอีกชนิดที่ถูกใช้ในการยับยั้ง COX-2 (Liu et al., 1998; Meyer-Siegler, 2001)

การใช้สมุนไพรบรรเทาอาการอักเสบและอาการปวด

งูและแมลงกัดต่อย ก่อให้เกิดอาการปวดและการอักเสบเกิดขึ้น ตัวอย่าง เช่น พิษแมลงป่อง (Scorpion venom) ซึ่งเป็นสารหลากหลายกลุ่ม เช่น peptide toxins, enzymes, glycosaminoglycans, และ mucoproteins (Zlotkin et al., 1978) จะกระตุ้นการสร้าง inflammatory mediators หลายชนิด ได้แก่ bradykinin, platelet-activating factor, prostaglandins, leucotriens, และ cytokines ส่งผลให้เกิดอาการปวด (Correa et al., 1997) พิษงู (snake venom) ประกอบด้วยสารหลากหลายกลุ่มทั้งที่เป็น โปรตีนและไม่ใช่โปรตีน กลุ่มที่เป็นโปรตีน ได้แก่ enzymes, peptide toxins ซึ่งมีฤทธิ์เป็นพิษต่อประสาท (neurotoxin), กล้ามเนื้อ (myotoxin), ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulation), ยับยั้งการจับกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation inhibition), และ ก่อให้เกิดการอักเสบ เป็นต้น

การใช้สมุนไพรในการต้านการอักเสบและบรรเทาอาการปวดจากพิษแมลงกัดต่อยถือเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีมานาน เป็นการนำส่วนต่างๆ ที่ได้จากพืชในธรรมชาติมาใช้ นอกจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของพืชกลุ่มนี้ อาทิเช่น

ของระอา หรือ เสดลพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) ถูกใช้กันแพร่หลายในการลดอาการปวดจากแมลงกัดต่อย การทดลองในหนูแรท พบว่าของระอาที่สกัดด้วย methanol สามารถลดการเกิดอาการบวม โดยยับยั้ง carrageenin และ serotonin (Suba et al., 2005) นอกจากนี้สารสกัดจากของระอายังสามารถยับยั้งการตอบสนองของ neutrophil อีกด้วย (Wanikiat et al., 2008)

ผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes acmella*) เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ในการบรรเทาอาการอักเสบและอาการปวด ผักคราดหัวแหวนสกัดด้วยเอทานอลยังสามารถยับยั้งการบวมได้ (Chakraborty et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดการสร้าง iNOS และ COX-2 ใน mouse macrophage RAW 264.7 ได้ (Wu et al., 2008)

โมก (*W. pubescens*) และโมกบ้าน (*W. religiosa*)

ยางโมกบ้านมีสรรพคุณใช้แก้พิษงูและแมลงกัดต่อย (วิทยุเที่ยงบูรณธรรม, 2531) เช่นเดียวกับโมกจากรายงานการศึกษาพบว่ายางโมกชนิด *W. pubescens* มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดฟัน (Batugal et al., 2004) และพบว่าเปลือกลำต้นโมกชนิด *W. tinctoria* มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด (antinociception) ใช้ในการรักษาอาการปวดท้อง (Joshi et al., 1980) นอกจากนี้ในอินเดียยังมีรายงานการใช้สารสกัดจากเปลือกลำต้นและเปลือกกรากของ *W. tomentosa* ในการรักษาพิษแมลงป่อง (Hutt and Houghton, 1997) การศึกษาต้นโมกชนิด *W. tinctoria* ในหนู mice พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวด (Reddy et al., 2002) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาทั่วโลกการอักเสบที่แน่ชัด

ลักษณะของโมกและโมกบ้าน

โมกเป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae สกุล *Wrightia* โมกมีสมาชิกทั่วโลก 23 ชนิด เขตการกระจายพันธุ์กว้าง พบทั้งในแอฟริกา เอเชียและออสเตรเลีย ในไทยมี 10 ชนิด ได้แก่ โมก *W. pubescens* R.Br., โมกเขา *Wrightia lanceolata* Kerr, โมกแดง *Wrightia dubia* (Sims) Spreng., โมกบ้าน *W. religiosa* Benth, โมกใบบาง *Wrightia lecomtei*, โมกมัน *Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb., โมกราชินี *Wrightia sirikitae* D.J. Middleton & T. Santisuk, โมกเหลือง *Wrightia viridiflora* Kerr, โมกเหลืองหอม *Wrightia laevis* Hook.f. และมูกขน *Wrightia coccinea* (Roxb.) Sims นอกจากนี้ยังมี พุดพิชญา *Wrightia antidysenterica* (L.) R. Br. ไม้ต่างประเทศที่เพิ่งมีการนำเข้ามาไม่นานมานี้ และนิยมปลูกเป็นไม้ประดับทั่วไปในปัจจุบัน (เต็ม สมิตินันท์, 2544)

โมก (*W. pubescens*) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้น สูงได้ถึงประมาณ 30 เมตร กิ่งอ่อนขนสั้นปกคลุม กิ่งแก่เกลี้ยงมีช่องอากาศ ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม ใบรูปรี รูปไข่กลับหรือรูปขอบขนาน ยาว 3-12 เซนติเมตร ปลายใบแหลมยาว โคนใบรูปกลมหรือมน แผ่นใบมีขนสั้นนุ่มหนาแน่นโดยเฉพาะตามเส้นแขนงใบ เส้นแขนงใบมี 8-15 คู่ ก้านใบยาว 0.3-0.8 เซนติเมตร ช่อดอกยาว 4-7.5 เซนติเมตร มีขนสั้นละเอียด ก้านดอกยาวประมาณ 0.4-1 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 5 กลีบ รูปไข่ ยาว 0.1-0.5 เซนติเมตร ต่อที่โคนกลีบแผ่กว้าง กลีบดอกสีขาว ครีมนหรือชมพูอ่อน 5 กลีบ ดอกบานรูปกงล้อ หลอดกลีบยาว 0.3-0.7 ซม. กลีบรูปขอบขนาน ยาว 0.8-2.7 เซนติเมตร โคนเรียว มีปุ่มขนกระจาย ภายในหลอดกลีบเกลี้ยง กระบังเรียง 2 ชั้น ติดบนกลีบดอกและระหว่างกลีบดอก มีขนกระจาย กลีบกระบังบนกลีบดอกแนบติดกลีบดอกประมาณกึ่งหนึ่ง ยาวเท่าๆ กับเกสรเพศผู้ จักจี้ห่างๆ กลีบกระบังระหว่างกลีบดอกสั้นกว่าเล็กน้อย ปลายแยกเป็น 2 แฉก เกสรเพศผู้ติดบนปากหลอดกลีบ ยาวประมาณ 0.7-0.9 เซนติเมตร รวมก้านเกสรสั้นๆ มีขนสั้นปกคลุม ยื่นพ้นเลยหลอดกลีบ รังไข่ยาวประมาณ 0.2 เซนติเมตร เกลี้ยง ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว 0.8-1 เซนติเมตร รวมยอดเกสร ผลเป็นฝักคู่ ติดกัน รูปกระสวย แยกจากกันเมื่อแตก ผิวเกลี้ยง ไม่มีช่องอากาศ มีขนละเอียด ยาว 10-38 ซม. เมล็ดรูปแถบ ยาว 1-1.6 เซนติเมตร ที่โคนมีขนกระจุก ยาว 1-4 เซนติเมตร โมกมีเขตการกระจายพันธุ์กว้าง พบตั้งแต่จีนตอนใต้ พม่า ภูมิภาคอินโดจีน ภูมิภาค

มาเลเซีย จนถึงออสเตรเลีย ในไทยพบทุกภาค ขึ้นตามชายป่าดิบแล้ง และป่าเบญจพรรณ ระดับความสูงไม่เกิน 400 เมตร (เต็ม สมิตินันท์, 2544)

โมกบ้าน (*W. religiosa*) ไม้พุ่ม สูงได้ประมาณ 5 เมตร กิ่งอ่อนมีขนละเอียด กิ่งแก่เกลี้ยงมีช่องอากาศกระจาย ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม ใบบาง รูปรี ยาว 2-8 เซนติเมตร ปลายใบแหลมยาวหรือมน โคนใบรูปลิ้น เส้นแขนงใบ 3-8 คู่ ก้านใบยาว 0.1-0.4 เซนติเมตร ช่อดอกยาว 1.5-5 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 0.8-3 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 5 กลีบ รูปไข่หรือรูปขอบขนาน ยาว 0.1-0.3 เซนติเมตร ต่อมโคนกลีบมีขนาดเล็ก กลีบดอก 5 กลีบหรือหลายกลีบซ้อนกันในพื้นที่ปลูกเป็นไม้ประดับ กลีบสีขาว หลอดกลีบยาว 0.2-0.4 เซนติเมตรกลีบรูปไข่กลับ ยาว 0.5-1 เซนติเมตร ผิวมีปุ่มขนกระจาย ภายในหลอดกลีบเกลี้ยง ไม่มีกระบัง เกสรเพศผู้ติดบนปากหลอดกลีบ ก้านเกสรสั้นๆ ยาวประมาณ 0.3 เซนติเมตร อับเรณูยาวประมาณ 0.4 เซนติเมตร มีขนสั้นปกคลุม รังไข่ยาวประมาณ 0.1 เซนติเมตร ก้านเกสรเพศเมียเรียวยาว 0.6-0.8 เซนติเมตร รวมยอดเกสร ผลเป็นฝักคู่แยกกัน รูปกระสวย ยาวประมาณ 30 เซนติเมตร เมล็ดรูปแถบ ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ที่โคนมีขนกระจุก ยาว 3.5-4 เซนติเมตร โมกบ้านมีเขตการกระจายพันธุ์ตั้งแต่พม่า ภูมิภาคอินโดจีน มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ ในไทยพบกระจายทั่วประเทศ ขึ้นตามชายป่าใกล้ลำธาร ระดับความสูงประมาณ 100 เมตร นิยมปลูกเป็นไม้ประดับทั้งชนิดดอกกลาและดอกซ้อน (เต็ม สมิตินันท์, 2544)

ยางโมก

ยางของ โมกและโมกบ้านมีลักษณะขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ที่เรียกว่า latex ในปัจจุบันมีการศึกษาประโยชน์ของยางโมกอยู่บ้าง โดยทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ protease ในยางโมกชนิด *W. tinctoria* ในการห้ามเลือด (Rajesh et al., 2007) ส่วนการศึกษาด้านฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของยางโมกนั้น มีเพียงรายงานการใช้สมุนไพรซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่น ในการใช้ยางของโมกบ้าน (*W. religiosa*) แก้พิษงูและแมลงกัดต่อย (วิทย์ เทียงบูรณธรรม, 2531) และใช้ยางของโมก (*W. pubescens*) บรรเทาการปวดฟัน (Batugal et al., 2004)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ในการต่อต้านการเกิดการอักเสบของยางโมก 2 ชนิด ได้แก่ โมก (*W. pubescens*) และ โมกบ้าน (*W. religiosa*) โดยวัดระดับการยับยั้งการสร้าง Prostaglandin E₂ (PGE₂) ซึ่งเป็นโมเลกุลในกลุ่ม inflammatory mediator และ ศึกษาการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง PGE₂ ใน RAW 264.7 mouse macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ

ผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น (Preliminary data) ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของยางโมกต่อไป

1. สารเคมี

สารเคมีหลักที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่

- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) จากบริษัท Gibco® Invitrogen (USA)
- Fetal bovine serum (FBS) standard quality และ penicillin/streptomycin 100x จากบริษัท Pacific science Co., Ltd.
- COX-2 (murine) polyclonal antiserum, Goat anti-rabbit IgG HRP, และ NS-398 จากบริษัท Cayman chemical (USA)
- XTT reagent จากบริษัท Sigma (USA)
- LPS (*E. coli* 0111:B4) จากบริษัท Sigma (USA)
- PGE₂ parameter assay kit จากบริษัท R&D systems Inc. (USA)
- Bio-Rad protein assay จากบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc. (USA)
- Pico stable peroxide solution และ Pico luminal/enhancer solution จากบริษัท Pierce biotechnology (USA)

2. เครื่องมือวิจัย

เครื่องมือหลักที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่

- เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Lyophilizer)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

- เครื่อง ELISA reader
- เครื่องแยกสารพันธุกรรมแนวตั้ง (Vertical electrophoresis)
- เครื่อง Semi-dry electrophoretic transfer

3. การระบุชนิดของพืช

เนื่องจากพืชในตระกูลโมกมีหลายชนิดที่มีลักษณะใกล้เคียง ดังนั้นก่อนการเก็บตัวอย่างยางโมก จึงต้องมีการระบุชนิดของโมกให้แน่ชัดโดย อาศัยข้อมูลจากหนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์, 2544) และคำแนะนำจากผู้ชำนาญด้านอนุกรมวิธานพืช

ตัวอย่างยางโมก (*W. pubescens*) ได้มาจากบริเวณแพดป่าดู ในมหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วน ตัวอย่างยางโมกบ้าน (*W. religiosa*) ได้มาจากบริเวณวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี นอกจากนี้จะเก็บตัวอย่างยางโมกแล้ว และเพื่อประโยชน์สำหรับการวิจัยในอนาคต ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างแห้งของโมกและโมกบ้าน ไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช (Herbarium) ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสตัวอย่างโมกคือ *Wrightia pubescens* J. Jitimanee 2 (KKU20827) และรหัสตัวอย่างโมกบ้านคือ *Wrightia religiosa* J. Jitimanee 1 (KKU20826)

4. การเก็บและเตรียมยางโมกแห้ง

ยางโมกทั้ง 2 ชนิด เก็บจากบริเวณลำต้นของพืช โดยใช้มีดปลายแหลมกรีดลำต้นพืชเพื่อให้ยางไหลออกมา จากนั้นใช้ปิเปตดูดยางโมกเก็บไว้ในหลอดขนาด 1.5 mL ซึ่งห่อหุ้มหลอดเพื่อป้องกันเมื่อได้ปริมาณที่ต้องการ (1-1.5 mL) นำยางไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างทันที ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- เติม absolute ethanol ใส่ลงไป ปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของยางโมก (อัตราส่วนยางโมกต่อ absolute ethanol เป็น 1:1) เพื่อให้ส่วนที่เป็นยางเหนียวเกิดการจับตัวและสามารถแยกออกมาจากส่วนอื่นๆ ในอย่างโมกได้
- นำส่วนใสที่เหลือของยางโมกไปกรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ขนาด 0.45 μm เพื่อกำจัดแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมที่อาจปนเปื้อน
- นำยางโมกที่ผ่านการกรองไปทำให้แห้งแบบเย็น โดยอาศัยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Lyophilizer) จากนั้น ชั่งน้ำหนักและเก็บยางโมกแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 $^{\circ}\text{C}$

5. การเตรียม RAW 264.7 mouse macrophage ในการทดลอง

นำเซลล์ RAW 264.7 mouse macrophage (American Type Culture Collection; ATCC) มาเลี้ยงใน flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine

serum (FBS) และ 1x penicillin/streptomycin (Penicillin 100 units/mL, Streptomycin 100 µg/mL) ในสภาวะที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37 ° C (Kim et al., 2004) จนได้จำนวน (2 x 10⁷ เซลล์) ตามที่ต้องการ

6. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของยางโมก

นำ RAW 264.7 mouse macrophage (1x10⁶ cells/mL) มาเลี้ยงในเพลทขนาด 96 หลุม (1x10⁵ cells/ well) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM ที่มี 10% FBS และ 1x penicillin/streptomycin ในสภาวะที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็นชนิด serum-free DMEM ทำการทดสอบความเป็นพิษของยางโมกโดย แบ่งเซลล์ออกเป็น 9 กลุ่มๆละ 3 หลุม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 เติม sterile phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 10 µL (กลุ่มควบคุม)
- กลุ่มที่ 2 เติม ยางโมก (*Wrightia pubescens*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 µg/mL (กลุ่มทดลอง)
- กลุ่มที่ 3 เติม ยางโมก (*Wrightia pubescens*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 µg/mL (กลุ่มทดลอง)
- กลุ่มที่ 4 เติม ยางโมก (*Wrightia pubescens*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 25 µg/mL (กลุ่มทดลอง)
- กลุ่มที่ 5 เติม ยางโมก (*Wrightia pubescens*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL (กลุ่มทดลอง)
- กลุ่มที่ 6 เติม ยางโมกบ้าน (*Wrightia religiosa*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 µg/mL (กลุ่มทดลอง)
- กลุ่มที่ 7 เติม ยางโมกบ้าน (*Wrightia religiosa*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 µg/mL (กลุ่มทดลอง)
- กลุ่มที่ 8 เติม ยางโมกบ้าน (*Wrightia religiosa*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 25 µg/mL (กลุ่มทดลอง)
- กลุ่มที่ 9 เติม ยางโมกบ้าน (*Wrightia religiosa*) ใน PBS ปริมาตร 10 µL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL (กลุ่มทดลอง)

หลังจากเลี้ยงเซลล์ไว้นาน 24 ชั่วโมง จึงทำการทดสอบ viability test เพื่อหาอัตราการมีชีวิตของเซลล์ โดยเติม XTT reagent นาน 4 ชั่วโมง แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดการเปลี่ยนแปลงสีของ XTT reagent ที่ความยาวคลื่น 450 nm



7. การเตรียมสารละลายยางโมก LPS และ NS-398

- 7.1 เตรียมสารละลายยางโมก โดยนำยางโมกแต่ละชนิด ไปล้างและละลายด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 mg/mL
- 7.2 เตรียม LPS โดยล้างและละลาย LPS ซึ่งได้จาก *E. coli* 0111:B4 (Sigma, USA) ใน PBS จนได้ความเข้มข้น 1 mg/mL
- 7.3 เตรียม NS-398 โดยละลายในสารละลาย DMSO: PBS อัตราส่วน 1:3 (ตามวิธีแนะนำของผู้ผลิต) จนได้ความเข้มข้น 4 mM

8. การทดลองกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 macrophage ด้วยยางโมกและโมกบ้าน

การทดลองในครั้งนี้ใช้เซลล์ชนิด RAW 264.7 mouse macrophage ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ เนื่องจาก macrophage เป็นเซลล์ที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบและสามารถสร้าง prostaglandin ออกมาเมื่อถูกกระตุ้น ด้วย LPS (Tao et al., 2008; Zhang et al., 2007)

การทดลองเริ่มจากนำ RAW 264.7 mouse macrophage (1×10^6 cells/mL) มาเลี้ยงในเพลทขนาด 6 หลุม (2×10^6 cells/ well) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM ที่ที่มี 10% FBS และ 1x penicillin/streptomycin ในสภาวะที่มี CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็นชนิด serum-free DMEM

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง PGE_2 และ COX-2 ของยางโมกโดย แบ่งเซลล์ออกเป็น 16 กลุ่มๆ (ตารางที่ 1) โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่เติมเฉพาะ PBS (กลุ่มที่ 1) กลุ่มที่เหลือ (กลุ่ม 2-16) จะถูกเติม LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kim et al., 2004) ซึ่งในกลุ่มที่เติม LPS ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มที่เติมเฉพาะ LPS (กลุ่มที่ 3)
- กลุ่มที่เติม NS-398 ยาง โมกและ โมกบ้านพร้อมกับ LPS (กลุ่มที่ 5, 6, 7, 11, 12, และ 13)
- กลุ่มที่เติม NS-398 ยาง โมกและ โมกบ้านหลังจากที่เติม LPS นาน 1 ชั่วโมง (กลุ่มที่ 8, 9, 10, 14, 15, และ 16)

การเติม NS-398 / ยางพืชทันที หรือเติมหลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS แล้ว มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งสร้าง PGE_2 ขณะที่ COX-2 เริ่มต้นทำงาน และ COX-2 ซึ่งทำงานเต็มที่ในการสร้าง PGE_2 หลังจากการกระตุ้นด้วย LPS 1 ชั่วโมง (Glatt et al., 1977)

หลังจากเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ดูเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อแยกออกจากเซลล์ที่เลี้ยงไว้ โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้หาปริมาณ PGE_2 ต่อไป ส่วนเซลล์นำมาสกัดโปรตีนทั้งหมด (total protein) เพื่อใช้หาปริมาณแอนไซม์ COX-2 ต่อไป

ตารางที่ 1 การทดลองกระตุ้นเซลล์ RAW 264.7 mouse macrophage ด้วย LPS, NS-398, ยางโมกและ โมกบ้าน

กลุ่มที่	PBS	ความเข้มข้น สุดท้ายของLPS	ความเข้มข้นสุดท้ายของ NS-398	ความเข้มข้นสุดท้ายของ <i>W. pubescens</i> , WP	ความเข้มข้นสุดท้ายของ <i>W. religios</i> ; WR
1	10 mL				
2		1 µg/mL			
3		1 µg/mL	10 µM (เติมพร้อม LPS)		
4		1 µg/mL	10 µM (เติมหลัง LPS 1 hr)		
5		1 µg/mL		10 µg/mL (เติมพร้อม LPS)	
6		1 µg/mL		25 µg/mL (เติมพร้อม LPS)	
7		1 µg/mL		100 µg/mL (เติมพร้อม LPS)	
8		1 µg/mL		10 µg/mL (เติมหลัง LPS 1 hr)	
9		1 µg/mL		25 µg/mL (เติมหลัง LPS 1 hr)	
10		1 µg/mL		100 µg/mL (เติมหลัง LPS 1 hr)	
11		1 µg/mL			10 µg/mL (เติมพร้อม LPS)
12		1 µg/mL			25 µg/mL (เติมพร้อม LPS)
13		1 µg/mL			100 µg/mL (เติมพร้อม LPS)
14		1 µg/mL			10 µg/mL (เติมหลัง LPS 1 hr)
15		1 µg/mL			25 µg/mL (เติมหลัง LPS 1 hr)
16		1 µg/mL			100 µg/mL (เติมหลัง LPS 1 hr)

9. การสกัดโปรตีนทั้งหมด (Total protein) จากเซลล์ชนิด RAW 264.7 mouse macrophage

เซลล์ macrophage ที่ได้จากการทดลองจะถูกล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS เพื่อกำจัดเอนไซม์ trypsin ที่ตกค้าง จากนั้นเติมสารละลายที่ทำให้เซลล์แตก (cell lysis buffer) ปริมาตร 300 μ L ลงในตะกอนเซลล์ ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดขึ้นลงเพื่อช่วยใช้เซลล์แตกมากขึ้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 30,000 \times g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ดูดส่วนใสออกมาใส่หลอดใหม่และนำไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดต่อไป

10. การตรวจวัดความเข้มข้นโปรตีน

นำโปรตีนที่สกัดได้จาก macrophage มาวัดความเข้มข้นโดยใช้ Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ซึ่งอาศัย Bradford method หลักการคือ อาศัยการเปลี่ยนสีของ Coomassie® Brilliant Blue G-250 ซึ่งจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีน

การวัดความเข้มข้นของโปรตีนทำตามวิธีแนะนำที่มาพร้อมกับชุดตรวจวัด Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) เริ่มจากการเตรียมสารมาตรฐาน IgG (Standard IgG) ความเข้มข้นต่างๆ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ g/mL และเจือจางโปรตีนตัวอย่างแต่ละกลุ่มด้วย PBS อัตราส่วน 1:20 จากนั้นดูดสารมาตรฐานและตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ปริมาตร 800 μ L ลงในหลอดทดลอง และเติม reagent dye จาก Bio-Rad protein assay ปริมาตร 200 μ L ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm เปรียบเทียบหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน IgG

หลังจากทราบความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างแล้ว ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 μ g/ μ L และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

11. การตรวจวัดความเข้มข้นของ PGE₂

อาศัยหลักของเทคนิค enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดตรวจ PGE₂ parameter assay (R&D systems Inc., USA) ซึ่งจะเติมทั้งตัวอย่าง, primary antibody และ PGE₂ conjugate ลงไปพร้อมๆ กัน หากในตัวอย่างมีปริมาณ PGE₂ ต่ำ จะทำให้ mouse monoclonal antibody (primary antibody) ซึ่งจับกับ PGE₂ conjugate เข้าไปจับ goat anti-mouse antibody ที่อยู่บนเพลทได้ ส่งผลให้หลุมที่มีความเข้มข้นของ PGE₂ ต่ำมีสีเข้มกว่าหลุมที่มีความเข้มข้นของ PGE₂ สูง สรุปได้ว่าความเข้มข้นของ PGE₂ ในตัวอย่างจะแปรผกผันกับความเข้มของสีที่เกิดขึ้น

วิธีการทดลองทำตามวิธีแนะนำที่มาพร้อมกับชุดตรวจวัด PGE₂ parameter assay (R&D systems Inc., USA) มีขั้นตอนในการทดลองมีดังนี้

- เตรียมเจือจาง PGE₂ standard ความเข้มข้น 2,500, 1,250, 625, 156, 78, และ 39 pg/mL ด้วย diluents RD5-39

- เตรียมเจือจางตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ (ที่ได้จากการทดลองฤทธิ์การต้านการอักเสบของ ยางโมก) โดยดูอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 μL ผสมให้เข้ากันกับ diluents RD5-39 ปริมาตร 400 μL (อัตราส่วน 1:3)
 - เติม diluents RD5-39 ปริมาตร 200 μL ลงใน NSB well
 - เติม diluents RD5-39 ปริมาตร 150 μL ลงใน zero standard well (B0)
 - เติม standard และ sample ปริมาตร 150 μL ลงในหลุมที่เหลือ
 - เติม primary antibody ปริมาตร 50 μL ลงทุกหลุม ยกเว้น NSB well
 - เติม PGE₂ conjugate ปริมาตร 50 μL ลงทุกหลุม ยกเว้น NSB well แล้วปิดด้วยแผ่น พลาสติก
 - วาง 96 well plate บนเครื่องเขย่าแบบ horizontal orbital microplate shaker นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
 - เติม substrate ปริมาตร 200 μL ลงทุกหลุม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเติม stop solution ปริมาตร 50 μL ลงทุกหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น
 - นำ 96 well plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm
- ในการทดลองนี้ตัวอย่างแต่ละกลุ่มทำซ้ำ 3 หลุม

12. การตรวจหาอนไซม์ COX-2 โดยวิธี western blotting analysis

เริ่มต้นการทดลองโดยการเตรียม 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นนำโปรตีนตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ปริมาณ 10 μg (ความเข้มข้นของ โปรตีนแต่ละตัวอย่างเท่ากับ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) เติมลงในหลุมด้านแผ่นเจล จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านเจล เพื่อผลักโปรตีนไปตามความยาวของแผ่นเจล เมื่อผ่านกระบวนการ SDS-PAGE จึงทำการถ่ายโปรตีน บนแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยอาศัยเทคนิค semi-dry western blotting analysis

หลังจากได้แผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีโปรตีนมาแล้ว นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปทำการย้อมด้วย เทคนิค immunofluorescence โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

- เติม 5% skim milk ใน TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) ลงไปให้ท่วมแผ่น ไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง เพื่อลดการเกิด non-specific product หลังจากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST 3 ครั้ง
- เติม COX-2 (murine) polyclonal antiserum (primary antibody) (Cayman chemical, USA) ซึ่งเจือจางใน 5% skim milk ใน TBST (อัตราส่วน 1: 1,000) ลงไปให้ท่วมแผ่นไนโตร เซลลูโลส ทิ้งไว้บนเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST 3 ครั้ง

- เติม Goat anti-rabbit IgG HRP (secondary antibody) (Cayman chemical, USA) ซึ่งเจือจางใน 5% skim milk ใน TBST (อัตราส่วน 1: 4,000) ลงไปให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลส ที่งัวบนเครื่องเข่านาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST 3 ครั้ง
- ขั้นตอนนี้ต้องทำในที่มืด เติม substrate ของเอนไซม์ horse radish peroxidase (HRP) ได้แก่ Pico stable peroxide solution และ Pico luminal/enhancer solution (Pierce biotechnology, USA) อัตราส่วน 1:1 ลงไปให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลสจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนเรืองแสง จากนั้นนำฟิล์ม x-ray มาประกอติดกับแผ่นไนโตรเซลลูโลส นาน 5-10 นาที เพื่อให้เกิดแถบของโปรตีนขึ้นบนฟิล์ม x-ray

13. วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS ในการหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม จะเลือกใช้ one-way ANOVA หากลักษณะการแจกแจงของข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ หากลักษณะการแจกแจงของข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ เลือกใช้ Kruskal Wallis one-way ANOVA

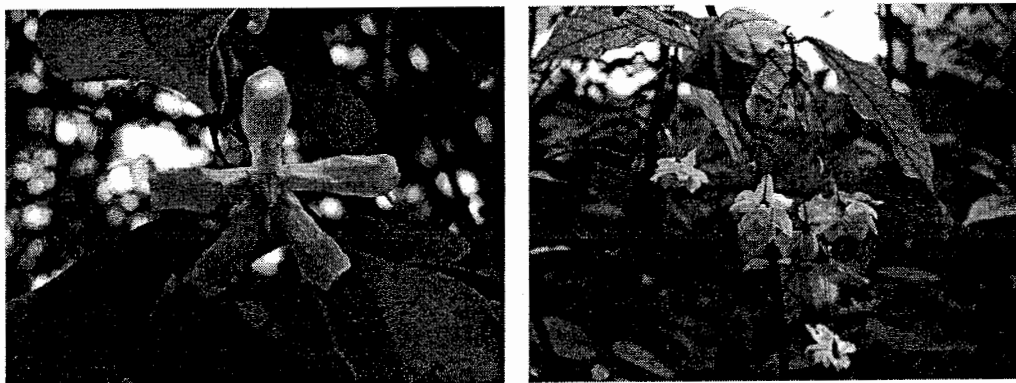
บทที่ 4

ผลการวิจัย

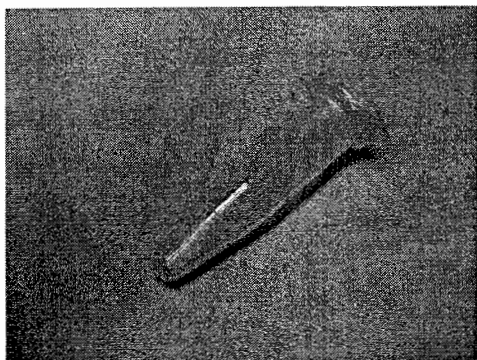
1. การเก็บและเตรียมยางโมกและโมกบ้านแห้ง

หลังจากการระบุชนิดของพืชโดยอาศัยข้อมูลจากหนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์, 2544) และคำแนะนำจากผู้ชำนาญด้านอนุกรมวิธานพืช ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างแห้งของโมก *W. pubescens* (รูปที่ 3A) และโมกบ้าน *W. religiosa* (รูปที่ 3B) ไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช (Herbarium) ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสตัวอย่างโมกคือ *Wrightia pubescens* J. Jitimanee 2 (KKU20827) และรหัสตัวอย่างโมกบ้านคือ *Wrightia religiosa* J. Jitimanee 1 (KKU20826)

ยางโมกซึ่งเก็บมาจากบริเวณลำต้นของโมกทั้ง 2 ชนิด ถูกนำมาทำให้แห้งได้ยางโมกแห้งออกมา (รูปที่ 4) ซึ่งจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C



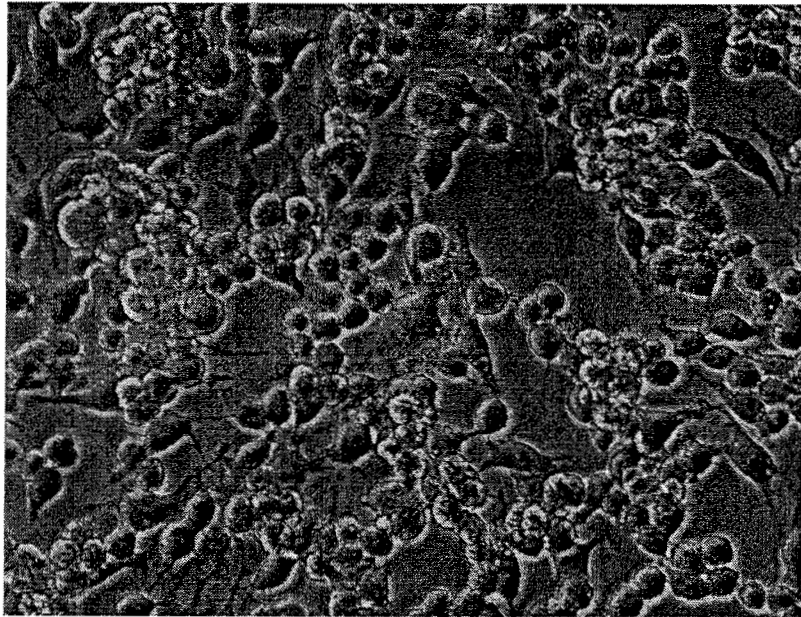
รูปที่ 3 แสดงลักษณะดอกของโมก *W. pubescens* (A) ดอกของโมกบ้าน *W. religiosa* (B)



รูปที่ 4 ยางโมกแห้ง

2. การเตรียม RAW 264.7 mouse macrophage ในการทดลอง

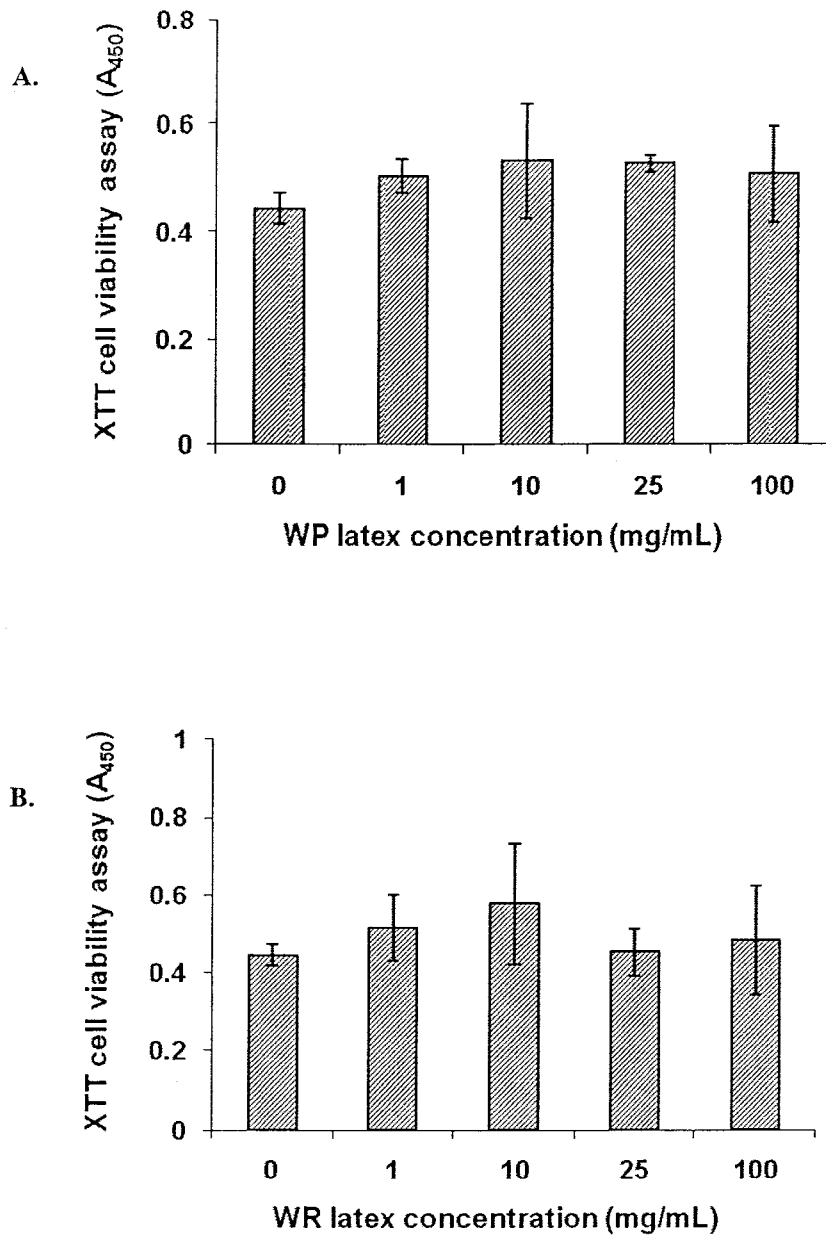
การทดลองนี้ใช้ RAW 264.7 mouse macrophage (ATCC) (รูปที่ 5) ดังนั้นจึงต้องมีการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นมา เซลล์ที่ได้มีความสมบูรณ์สามารถยึดติดกับภาชนะได้ดี บริเวณที่เซลล์อยู่กันหนาแน่นทำให้เซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลม แต่บริเวณที่เซลล์เบาบางจะพบ macrophage มีแขนยื่นออกมา



รูปที่ 5 RAW 264.7 mouse macrophage (กำลังขยาย 400 เท่า)

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของยางโมกและโมกบ้าน

ทำการทดสอบเป็นพิษต่อเซลล์ของยางโมกและโมกบ้าน โดยการเติมยางโมกที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 10, 25, และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ลงใน RAW 264.7 mouse macrophage หลังจากเลี้ยงเซลล์ไว้นาน 24 ชั่วโมง จึงทำการทดสอบ viability test เพื่อหาอัตราการมีชีวิตของเซลล์ โดยเติม XTT reagent นาน 4 ชั่วโมง แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดการเปลี่ยนแปลงสีของ XTT reagent ที่ความยาวคลื่น 450 nm ผลการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองกลุ่มต่างๆ ทั้งยางโมกและโมกบ้านไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน ซึ่งหมายความว่ายางโมกและโมกบ้านความเข้มข้นไม่เกิน 100 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ส่งผลทำให้ RAW 264.7 mouse macrophage ตาย



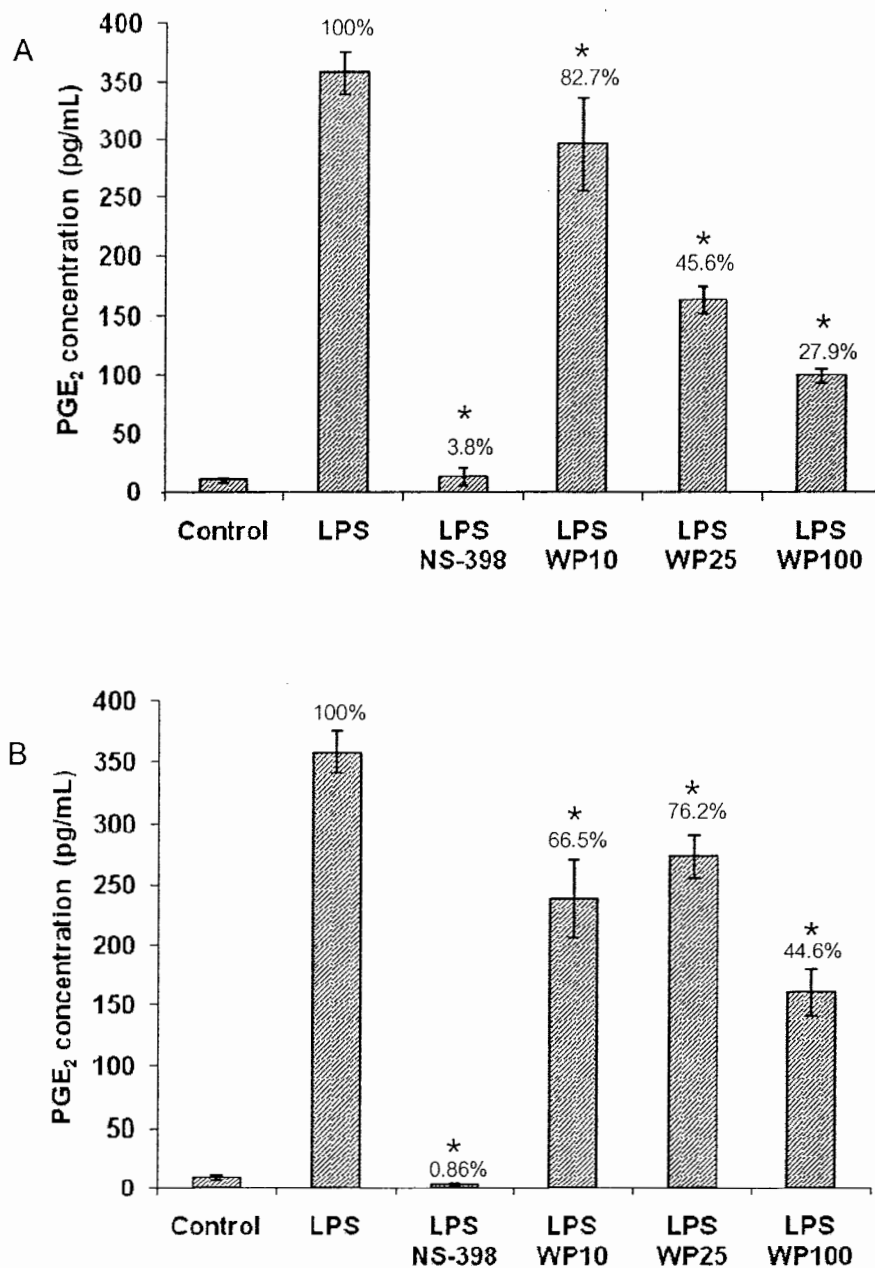
รูปที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจาก RAW 264.7 mouse macrophage ที่เติมยาง
โมก (WP) (A) และ โมกบ้าน (WR) (B) ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งทดสอบ โดยอาศัย XTT cell
viability assay

4. การตรวจวัดความเข้มข้นของ PGE₂

หลังจากนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของยาง โมก มาทดสอบหาปริมาณของ PGE₂ โดยอาศัย PGE₂ parameter assay ได้ผลการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ทดสอบฤทธิ์ของยาง โมก *W. pubescens* (WP) โดยเติมยาง โมกลงไปพร้อมกับการเติม LPS (รูปที่ 7A) พบว่า NS-398 ซึ่งมีบทบาทในการยับยั้งเอนไซม์ COX สามารถลดปริมาณ PGE₂ ได้มากกว่า 95% ในขณะที่ยาง โมกที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 100 µg/mL สามารถลดปริมาณ PGE₂ ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาง โมกที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 µg/mL ทำให้ความเข้มข้นของ PGE₂ ที่สร้างออกมาจากเซลล์ macrophage ลดลงถึง 72.1 % เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PGE₂ ระหว่างกลุ่ม WP10, WP25 และ WP100 พบว่าปริมาณ PGE₂ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของยาง โมกที่เพิ่มขึ้น

ส่วนกลุ่มที่ทดสอบกลุ่มที่ทดสอบฤทธิ์ของยาง โมกอีกกลุ่มซึ่งเติมยาง โมกลงไปหลังจากการเติม LPS 1 ชั่วโมง (รูปที่ 7B) ให้ผลใกล้เคียงกัน นั่นคือยาง โมกที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถลดปริมาณ PGE₂ ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS แต่อัตราการลดลงของ PGE₂ ต่ำกว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับยาง โมกทันทีพร้อมกับ LPS โดยเห็นได้ชัดเจนในกลุ่ม WP25 และ WP100 (รูปที่ 7A และ B) และปริมาณ PGE₂ ที่ลดลงไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของยาง โมกที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 7 ความเข้มข้นของ PGE₂ (pg/mL) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์ macrophage ด้วยยาง โมก (เมื่อ control หมายถึง กลุ่มที่ได้รับ PBS เท่านั้น)

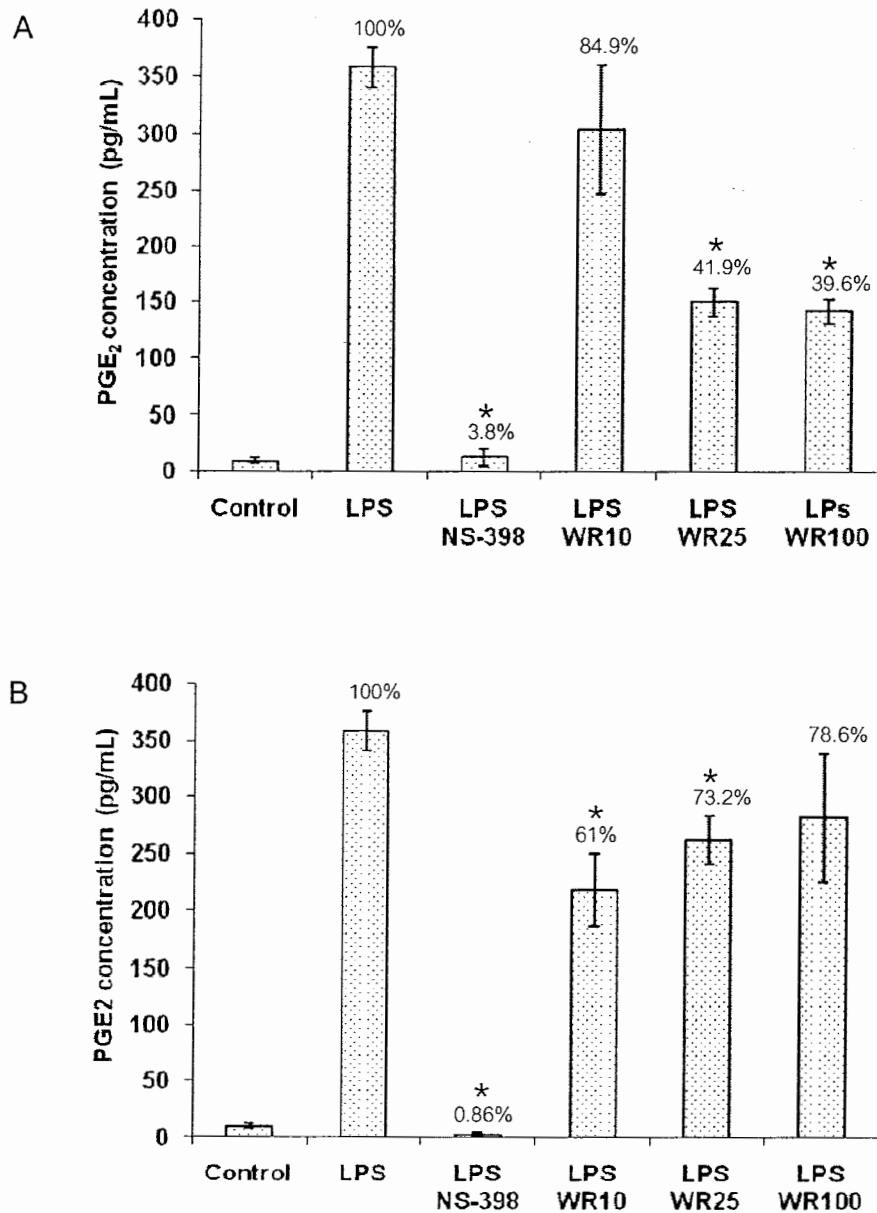
A) เซลล์ macrophage ได้รับ NS-398 และยาง โมก (WP) ความเข้มข้น 10 µg/mL (WP10), 25 µg/mL (WP25) และ 100 µg/mL (WP100) พร้อมกับ LPS

B) เซลล์ macrophage ได้รับ NS-398 และยาง โมก (WP) ความเข้มข้น 10 µg/mL (WP10), 25 µg/mL (WP25) และ 100 µg/mL (WP100) หลังจากเติม LPS 1 ชั่วโมง

* หมายถึงกลุ่มต่างๆ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม LPS

กลุ่มที่ทดสอบฤทธิ์ของยางโมกบ้าน *W. religiosa* (WR) โดยเติมยางโมกบ้านลงไปพร้อมกับ การเติม LPS (รูปที่ 8A) พบว่า NS-398 ซึ่งมีบทบาทในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 สามารถลดปริมาณ PGE₂ ได้มากกว่า 95% ในขณะที่ยางโมกบ้านที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL สามารถลดปริมาณ PGE₂ ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS อย่างไรก็ตามยางโมกบ้านที่ความเข้มข้น 10 µg/mL ไม่สามารถลดปริมาณของ PGE₂ ได้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PGE₂ ระหว่างกลุ่ม WR10 และ WR25 พบว่าปริมาณ PGE₂ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของยางโมกบ้านที่เพิ่มขึ้น

ส่วนกลุ่มที่ทดสอบกลุ่มที่ทดสอบฤทธิ์ของยางโมกบ้านอีกกลุ่มซึ่งเติมยางโมกลงไปหลังจาก การเติม LPS 1 ชั่วโมง (รูปที่ 8B) ให้ผลที่แตกต่างออกไป นั่นคือ ปริมาณ PGE₂ ที่ลดลงไม่สัมพันธ์กับ ความเข้มข้นของยางโมกบ้านที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่ายางโมกบ้านที่ความเข้มข้นสูงสุดไม่สามารถปริมาณ PGE₂ ได้ ในขณะที่ยางโมกบ้านกลุ่ม WR10 และ WR25 สามารถลดปริมาณ PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 8 ความเข้มข้นของ PGE₂ (pg/mL) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์ macrophage ด้วยยางโมกบ้าน (เมื่อ control หมายถึง กลุ่มที่ได้รับ PBS เท่านั้น)

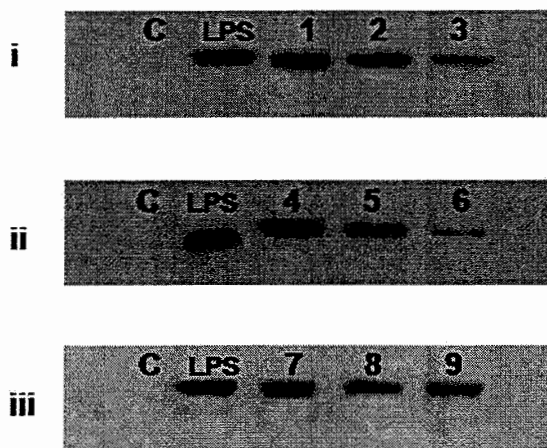
A) เซลล์ macrophage ได้รับ NS-398 และยาง โมกบ้าน (WR) ความเข้มข้น 10 µg/mL (WR10), 25 µg/mL (WR25) และ 100 µg/mL (WR100) พร้อมกับ LPS

B) เซลล์ macrophage ได้รับ NS-398 และยาง โมกบ้าน (WR) ความเข้มข้น 10 µg/mL (WR10), 25 µg/mL (WR25) และ 100 µg/mL (WR100) หลังจากเติม LPS 1 ชั่วโมง

* หมายถึงกลุ่มนั้นๆ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม LPS

5. ผลตรวจหาเอนไซม์ COX-2 ที่สกัดจากเซลล์

เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ macrophage กลุ่มต่างๆ มาตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ COX-2 โดยวิธี western blotting analysis พบว่ากลุ่ม LPS ปริมาณ COX-2 สูง ในขณะที่ไม่พบแถบ COX-2 ในกลุ่มควบคุม (C) เลย จากรูปที่ 9i ซึ่งเซลล์ได้รับยางโมกพร้อมกับ LPS แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับยางโมกที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีแถบ COX-2 เล็กลงอย่างชัดเจน (หมายเลข 3) ส่วนยางโมกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า ขนาดของแถบเอนไซม์ COX-2 มีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่ม LPS เมื่อมองตาเปล่า ซึ่งผลที่ดังกล่าวคล้ายกันกับกลุ่มที่ได้รับยางโมกหลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS 1 ชั่วโมง (รูปที่ 9ii) โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับยางโมกที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีแถบ COX-2 เล็กลงอย่างชัดเจน (หมายเลข 6) ส่วนเซลล์ macrophage ได้รับยางโมกบ้านพร้อม LPS พบว่ากลุ่มที่ได้รับยางโมกบ้านที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีแถบ COX-2 เล็กลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (หมายเลข 8 และ 9)



รูปที่ 9 แถบของเอนไซม์ COX-2 จากเซลล์กลุ่มต่างๆ ตรวจวัดโดยวิธี western blotting analysis

(เมื่อ C หมายถึง กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ PBS และ LPS หมายถึง กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ LPS)

- i) เซลล์ macrophage ที่ได้รับยางโมก (WP) ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2) และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3) พร้อมกับ LPS
- ii) เซลล์ macrophage ที่ได้รับยางโมก (WP) ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5) และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (6) หลังจากเติม LPS 1 ชั่วโมง
- iii) เซลล์ macrophage ที่ได้รับยางโมกบ้าน (WR) ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (7), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8) และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9) พร้อมกับ LPS

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

PGE₂ เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการปวด (Kobayashi et al, 2002) เมื่อมีสิ่งแปลกปลอม (pathogen) เข้าสู่ร่างกาย หรือร่างกายได้รับบาดเจ็บ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือการบาดเจ็บนั้น ทำให้เกิดอาการแสดงซึ่งมีลักษณะที่สำคัญ ได้แก่ ปวด บวม แดง ร้อน ตรงบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งในบริเวณนี้จะมีการสร้าง PGE₂ ขึ้นมาซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilator) เสริมฤทธิ์กับการทำงานของ histamin และ bradykinin ซึ่งเพิ่ม vascular permeability ของหลอดเลือด (Davies et al., 1984) PGE₂ เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในกลุ่ม prostanoic acid ในร่างกายมนุษย์ สร้างขึ้นมาจากเซลล์หลากหลายชนิด เช่น macrophage, leukocyte, fibroblast และ endothelium กลไกการสร้างอาศัยการทำงานของเอนไซม์ COX-2

การยับยั้งการหลั่ง PGE₂ ถือว่าเป็นกลยุทธ์ในการต่อต้านการอักเสบที่ถูกใช้มานานกว่า 100 ปี (Vane and Botting, 2003) ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษาฤทธิ์ของยางโมก (*W. pubescens*) และยางโมกบ้าน (*W. religiosa*) ในการยับยั้งการสร้าง COX-2 และ PGE₂ ในเซลล์ RAW 264.7 mouse macrophage การทดลองจะอาศัย LPS เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้าง COX-2 และ PGE₂ ผลการทดลองที่ได้พบว่า ยางโมก (*W. pubescens*) สามารถลดการสร้าง PGE₂ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว ฤทธิ์ในการยับยั้ง PGE₂ จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยางโมกขึ้น (รูปที่ 7A และ 7B) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการยับยั้ง PGE₂ ของยางโมกยังคงต่ำกว่า NS-398 ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็น selective COX-2 inhibitor (Meyer-Siegler, 2001) สามารถยับยั้งการสร้าง PGE₂ มากกว่า 95%

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง PGE₂ ของยางโมก นอกจากจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยางโมกดังที่กล่าวมาแล้ว ระยะเวลาระหว่างการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และการเติมยาง โมกลงไป ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง LPS ที่ถูกเติมลงไปสามารถกระตุ้น macrophage ให้สร้าง COX-2 และ PGE₂ ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถสร้าง PGE₂ ได้เต็มที่ในช่วง 1-2 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเติมยาง โมกลงไป จึงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง PGE₂ ต่ำกว่ากลุ่มที่เติมยาง โมกพร้อม LPS ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 7

ปริมาณ PGE₂ ที่ลดลงเป็นผลจากฤทธิ์ของยางโมกในการยับยั้งการสร้าง COX-2 (รูปที่ 9i และ 9ii) แต่ไม่ได้เป็นผลมาจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 โดยตรง ดังจะเห็นได้จากปริมาณ PGE₂ ในกลุ่มที่เติมยาง โมกหลังจาก LPS 1 ชั่วโมง มีปริมาณสูงกว่าในกลุ่มที่เติมยาง โมกพร้อม LPS ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ COX-2 ยังคงทำงานได้

ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้ง COX-2 และ PGE₂ ของยางโมกบ้าน พบว่ายางโมกบ้านมีฤทธิ์ในการยับยั้ง PGE₂ เช่นกัน (รูปที่ 8A) ยกเว้นในกลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ก่อนเติมยางโมกบ้าน ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยังไม่ชัดเจน (รูปที่ 8B) ในขณะที่ยางโมกบ้านก็สามารถยับยั้งการสร้าง COX-2 ได้เช่นเดียวกับยางโมก ถึงแม้ว่าปริมาณ COX-2 จะลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 9iii) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของยางทั้ง 2 ชนิด ยางโมกที่ฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง COX-2 และ PGE₂ ของ RAW 264.7 mouse macrophage สูงกว่ายางโมกบ้าน เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากัน

ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นฤทธิ์ในการยับยั้ง COX-2 และ PGE₂ ของยางโมกและโมกบ้านใน RAW 264.7 mouse macrophage โดยเฉพาะในยางโมกซึ่งสามารถลดปริมาณ COX-2 เอนไซม์ได้อย่างชัดเจน ดังที่กล่าวมาในข้างต้นว่า COX-2 และ PGE₂ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบและการปวด ดังนั้นยางโมกทั้ง 2 ชนิดนี้อาจมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบและการปวดได้ ซึ่งพืชในสกุล *Wrightia* ชนิดอื่นๆ เช่น *W. tinctoria* มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด (antinociception) ใช้ในการรักษาอาการปวดท้อง (Joshi et al., 1980) และการศึกษาในหนู mice พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวด (Reddy et al., 2002) สารสกัดจากเปลือกลำต้นและเปลือกรากของ *W. tomentosa* ในการรักษาพิษแมลงป่อง (Hutt and Houghton, 1997) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้ ยางโมกและโมกบ้านสามารถยับยั้งการสร้าง COX-2 และ PGE₂ แต่ในกระบวนการอักเสบนั้นมีโมเลกุลสื่อกลางหลายชนิด เช่น histamin, bradykinin, nitric oxide และเอนไซม์อีกหลากหลายชนิด (Kumar et al., 2006) เข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ของยางโมกและโมกบ้านที่มีต่อโมเลกุลเหล่านี้จะมีโยชน์ในการช่วยอธิบายกลไกการลดการอักเสบและลดอาการปวดได้

ปัญหาอุปสรรค

ปัญหาที่เกิดขึ้นเกิดจากคุณสมบัติของยางโมกที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวซึ่งอาจเกิดจาก polyisoprene ซึ่งพบทั่วไปในยางธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถนำยางโมกสดไปทดสอบกับเซลล์ได้โดยตรง จำเป็นต้องกำจัดส่วนที่เป็นยางเหนียวออกไป ซึ่งในขั้นตอนดังกล่าวอาจมีส่วนประกอบบางอย่างถูกกำจัดออกด้วย และอาจส่งผลให้ยางโมกมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากการใช้ในชีวิตจริง

ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษาฤทธิ์ของยางโมกและ โมกบ้าน โดยเพิ่มความหลากหลายของความเข้มข้นและระยะเวลาที่กระตุ้นเซลล์ด้วยยางโมกและ โมกบ้าน
2. ทำการศึกษาฤทธิ์ของยางโมกและ โมกบ้านต่อสาร โมเลกุลสื่อกลางในกระบวนการอักเสบชนิดอื่นๆ เช่น histamin, bradykinin, nitric oxide เพิ่มเติม เพื่อช่วยสนับสนุนฤทธิ์ในการลดการอักเสบของยางโมกและ โมกบ้าน

เอกสารอ้างอิง

- เต็ม สมิตินันท์. (2544). **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544**. กรุงเทพฯ: สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.
- วิทย์ เทียงบูรณธรรม. (2531). **พจนานุกรมสมุนไพรไทย**. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พรินติ้งเฮ้าส์.
- Batugal, P.A., Kanniah, J., Lee, S.Y., Oliver, J.T. (2004). **Medicinal plants research in asia, volume 1: The framework and project workplans**. International plant genetic resources institute-Regional office of Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO). Malaysia.
- Chakraborty, A., Devi, R.K.B., Rita, S., Sharatchandra, Kh., Singh, Th. I. (2004). Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, 36(3), 148-50.
- Correa, M.M., Sampio, S.V., Lopes, R.A., Mancuso, L.C., Cunha, O.A., Franco, J.J., et al. (1997). Biochemical and histopathological alterations induces in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-1. **Toxicon**, 35(7), 1053-67.
- Davies, P., Bailey, P.J., Goldenberg, M.M., Ford-Hutchinson, A.W. (1984). The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annual Review of Immunology**, 2, 335-57.
- Dinareello, C.A., Gatti, S., Bartfai, T. (1999). Fever: links with an ancient receptor. **Current Biology**, 9(4), 147-50.
- Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscazo, J. (2008). **Harrison's Principle of Internal Medicine**. 17th ed. USA: Mc Graw Hill.
- Glatt, M., Kalin, H., Wagner, K., Brune, K. (1977). Prostaglandin release from macrophages: an assay system for anti-inflammatory drugs *in vitro*. **Agents and action**, 7, 321-26.
- Hutt, M.J., & Houghton, P.J. (1998). A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. **Journal of Ethnopharmacology**, 60, 97-110.
- Joshi, M.C., Patel, M.B., Mehtha, P.J. (1980). Some folk medicines of drugs. **Bulletin of Medical Ethnobotanical Research**, 1, 8-24.
- Kim, D.W., Son, K.H., Chang, H.W., Bae, K., Kang, S.S., Kim, H.P. (2004). Anti-inflammatory activity of *Sedum Kamtschaticum*. **Journal of Ethnopharmacology**, 90(2-3), 409-14.
- Kobayashi, T., & Narumiya, S. (2002). Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, 68-69, 557-73.

- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. (2006). **Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease**. 7th ed. Pennsylvania, USA: Elsevier Saunders.
- Liu, X.H., Yao, S., Kirschenbaum, A., Levine, A.C. (1998). NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. **Cancer Research**, 58, 4245-9.
- Meyer-Siegler, K. (2001). COX-2 specific inhibitor, NS-398, increases macrophage migration inhibitory factor expression and induces neuroendocrine differentiation in C4-2b prostate cancer cells. **Molecular Medicine**, 7(12), 850–860.
- Neash, O. (2006). Back to the future: postoperative pain management beyond COX-2 inhibitors. **Journal of the New Zealand Medical Association**, 119 (1242).
- Rajesh, R., Shivaprasad, H.V., Gowda, C.D., Nataraju, A., Dhananjaya, B.L., Vishwanath, B.S. (2007). Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: a special emphasis on clot inducing and dissolving properties. **Planta Medica**, 73(10), 1061-7.
- Reddy, Y.S.R., Venkatesh, S., Ravichandran, T., Murugan, V., Suresh, B. (2002). Antinociceptive activity of *Wrightia tinctoria* bark. **Fitoterapia**, 73, 421-3.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., et al. (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 State of America**, 91, 12013-7.
- Suba, V., Murugesan, T., Kumaravelrajan, R., Mandal, S.C., Saha, B.P. (2005). Antiinflammatory, analgesic and antiperoxidative efficacy of *Barleria lupulina* Lindl. extract. **Phytotherapy Research**, 19(8), 695-9.
- Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, 231 (25), 232–5.
- Vane, J.R., & Botting, R.M. (2003). Mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Research**, 110, 255-8.
- Wanikiat, P., Panthong, A., Sujayanon, P., Yoosook, C., Rossi, A.G., Reutrakul, V. (2008). The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. **Ethnopharmacology**, 116(2), 234-44.

- Wu, L.C., Fan, N.C., Lin, M.H., Chu, I.R., Huang, S.J., Hu, C.Y., et al. (2008). Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2341-9.
- Zlotkin E, Miranda F, Rochat H. (1978). Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In: Bettini S, editor. **Handbook of Experimental Physiology**. Heidelberg: Springer.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

เตรียมสารละลาย PBS โดยชั่งสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

- NaCl	8.0	g
- KCl	0.2	g
- Na ₂ HPO ₄	1.44	g
- KH ₂ PO ₄	0.24	g

ละลายสารต่างๆ ในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 g จากนั้นนำสารละลายไปปรับจนได้ pH 7.4

และเติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 1000 mL

2. XTT reagent

ละลาย XTT powder 5 มิลลิกรัม ใน DMEM 5 mL อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 56 °C เพื่อช่วยให้ละลาย

3. Cell lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% tween 20, 1% sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 1x cocktail protease inhibitor (Roche))

เตรียม cell lysis buffer ปริมาตร 10 mL โดยชั่งตวงสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

- 5 M NaCl	0.3	mL
- 1 M Tris-HCl pH 7.4	0.5	mL
- Tween 20	0.1	mL
- 10 % SDS	0.1	mL
- Sodium deoxycholate	0.1	g
- 25x protease inhibitor	1	tablet
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	10	mL

4. SDS-PAGE reagent

4.1 30% acrylamide solution

- Acrylamide powder	30	g
- Bis-acrylamide	0.8	g
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	100	mL

4.2 Separating buffer pH 8.9

- Trisma-base	18.15	g
- น้ำกลั่น	60	mL

ปรับ pH จนกระทั่งได้ pH 8.9 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 mL

4.3 Stacking buffer pH 6.8

- Trisma-base	3.028	g
- น้ำกลั่น	35	mL

ปรับ pH จนกระทั่งได้ pH 6.8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 mL

4.4 10 % SDS

- Sodiium dodecyl sulfate (SDS)	10	g
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	100	mL

4.5 10% Ammonium persulfate

- Ammonium persulfate	0.1	g
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1	mL

4.6 10 % separating gel

- 30% acrylamide solution	3.33	mL
- Separating buffer pH 8.9	1.25	mL
- 10% SDS	0.1	mL
- TEMED	0.01	mL
- 10% Ammonium persulfate	0.05	mL
- น้ำกลั่น	5.26	mL

ปริมาตรทั้งหมด 10 mL

4.7 5% stacking gel

- 30% acrylamide solution	0.499	mL
- Separating buffer pH 6.8	0.75	mL
- 10% SDS	0.3	mL
- TEMED	0.006	mL
- 10% Ammonium persulfate	0.1	mL
- น้ำกลั่น	1.445	mL
ปริมาตรทั้งหมด	<u>3</u>	mL

4.8 5x sample buffer

- Trisma-base	1.89	g
- SDS	2.5	g
- 2-Mercaptoethanol	12.5	mL
- Glycerol	25	mL
- Bromophenol blue	0.0025	g

ปรับ pH จนกระทั่งได้ pH 8.6 และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 mL

4.9 10x Electrophoresis buffer

- Trisma-base	6.08	g
- Glycine	28.8	g
- SDS	2	g
- น้ำกลั่น	150	mL

ปรับ pH จนกระทั่งได้ pH 8.3 และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 mL

5. Western blotting

5.1 Semi-dry blotting buffer

- Trisma-base	2.32	g
- Glycine	1.16	g
- SDS	0.148	g
- Absolute methanol	80	mL (เติมก่อนใช้)
- น้ำกลั่น	250	mL

ปรับ pH จนกระทั่งได้ pH 8.3 และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 400 mL

5.2 TBST buffer (50 mM Tris.HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)

- Trisma-base	2.42	g
- NaCl	8	g
- Tween 20	1	mL
- น้ำกลั่น	800	mL

ปรับ pH จนกระทั่งได้ pH 7.6 และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 mL

5.3 5% skim milk in TBST buffer

- Skim milk powder	2.5	g
เติม TBST buffer จนกระทั่งได้ปริมาตร	50	mL

ภาคผนวก ข
ข้อมูลวิจัยและผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากการวัดความเข้มข้นของ PGE2 ในกลุ่ม macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาง
โมกพร้อมกับ LPS (WPO) โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าข้อมูลการแจกแจงแบบปกติ เลือกใช้ one-way ANOVA (Scheffe)

กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุม

กลุ่ม 2 คือ LPS

กลุ่ม 3 คือ LPS และ NS-398

กลุ่ม 4 คือ LPS และ ยาง โมก 10 µg/mL

กลุ่ม 5 คือ LPS และ ยาง โมก 25 µg/mL

กลุ่ม 6 คือ LPS และ ยาง โมก 100 µg/mL

Test of Homogeneity of Variances

WPO

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.609	5	12	.081

ANOVA

WPO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	315410.66	5	63082.133	177.492	.000
Within Groups	4264.901	12	355.408		
Total	319675.56	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WP0

	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Scheffe	1.00	2.00	-347.8033(*)	15.39282	.000	-408.4623	-287.1443	
		3.00	-3.4800	15.39282	1.000	-64.1390	57.1790	
		4.00	-285.9333(*)	15.39282	.000	-346.5923	-225.2743	
		5.00	-153.1900(*)	15.39282	.000	-213.8490	-92.5310	
		6.00	-89.8367(*)	15.39282	.003	-150.4957	-29.1777	
		2.00	1.00	347.8033(*)	15.39282	.000	287.1443	408.4623
	2.00	3.00	344.3233(*)	15.39282	.000	283.6643	404.9823	
		4.00	61.8700(*)	15.39282	.045	1.2110	122.5290	
		5.00	194.6133(*)	15.39282	.000	133.9543	255.2723	
		6.00	257.9667(*)	15.39282	.000	197.3077	318.6257	
		3.00	1.00	3.4800	15.39282	1.000	-57.1790	64.1390
		2.00	-344.3233(*)	15.39282	.000	-404.9823	-283.6643	
	3.00	4.00	-282.4533(*)	15.39282	.000	-343.1123	-221.7943	
		5.00	-149.7100(*)	15.39282	.000	-210.3690	-89.0510	
		6.00	-86.3567(*)	15.39282	.004	-147.0157	-25.6977	
		4.00	1.00	285.9333(*)	15.39282	.000	225.2743	346.5923
		2.00	-61.8700(*)	15.39282	.045	-122.5290	-1.2110	
		3.00	282.4533(*)	15.39282	.000	221.7943	343.1123	
	4.00	5.00	132.7433(*)	15.39282	.000	72.0843	193.4023	
		6.00	196.0967(*)	15.39282	.000	135.4377	256.7557	
		5.00	1.00	153.1900(*)	15.39282	.000	92.5310	213.8490
		2.00	-194.6133(*)	15.39282	.000	-255.2723	-133.9543	
		3.00	149.7100(*)	15.39282	.000	89.0510	210.3690	
		4.00	-132.7433(*)	15.39282	.000	-193.4023	-72.0843	
5.00	6.00	63.3533(*)	15.39282	.039	2.6943	124.0123		
	6.00	1.00	89.8367(*)	15.39282	.003	29.1777	150.4957	
	2.00	-257.9667(*)	15.39282	.000	-318.6257	-197.3077		
	3.00	86.3567(*)	15.39282	.004	25.6977	147.0157		
	4.00	-196.0967(*)	15.39282	.000	-256.7557	-135.4377		
	5.00	-63.3533(*)	15.39282	.039	-124.0123	-2.6943		
Dunnett C	1.00	2.00	-347.8033(*)	10.18744		-432.3327	-263.2740	
		3.00	-3.4800	4.59245		-41.5854	34.6254	
		4.00	-285.9333(*)	23.19699		-478.4082	-93.4585	
		5.00	-153.1900(*)	6.37698		-206.1024	-100.2776	
		6.00	-89.8367(*)	3.79801		-121.3503	-58.3231	
		2.00	1.00	347.8033(*)	10.18744		263.2740	432.3327

	3.00	344.3233(*)	11.01136	252.9576	435.6891
	4.00	61.8700	25.26381	-147.7541	271.4941
	5.00	194.6133(*)	11.86699	96.1481	293.0786
	6.00	257.9667(*)	10.70441	169.1478	346.7855
3.00	1.00	3.4800	4.59245	-34.6254	41.5854
	2.00	-344.3233(*)	11.01136	-435.6891	-252.9576
	4.00	-282.4533(*)	23.57046	-478.0270	-86.8797
	5.00	-149.7100(*)	7.62444	-212.9731	-86.4469
	6.00	-86.3567(*)	5.64722	-133.2139	-39.4994
4.00	1.00	285.9333(*)	23.19699	93.4585	478.4082
	2.00	-61.8700	25.26381	-271.4941	147.7541
	3.00	282.4533(*)	23.57046	86.8797	478.0270
	5.00	132.7433	23.98212	-66.2460	331.7327
	6.00	196.0967(*)	23.42863	1.6998	390.4935
5.00	1.00	153.1900(*)	6.37698	100.2776	206.1024
	2.00	-194.6133(*)	11.86699	-293.0786	-96.1481
	3.00	149.7100(*)	7.62444	86.4469	212.9731
	4.00	-132.7433	23.98212	-331.7327	66.2460
	6.00	63.3533(*)	7.17400	3.8277	122.8789
6.00	1.00	89.8367(*)	3.79801	58.3231	121.3503
	2.00	-257.9667(*)	10.70441	-346.7855	-169.1478
	3.00	86.3567(*)	5.64722	39.4994	133.2139
	4.00	-196.0967(*)	23.42863	-390.4935	-1.6998
	5.00	-63.3533(*)	7.17400	-122.8789	-3.8277

* The mean difference is significant at the .05 level.

2. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากการวัดความเข้มข้นของ PGE2 ในกลุ่ม macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาง
โมกหลังจาก LPS 1 ชั่วโมง (WP1) โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าข้อมูลการแจกแจงแบบปกติ เลือกใช้ one-way ANOVA (Dunnnett C)

กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุม

กลุ่ม 2 คือ LPS

กลุ่ม 3 คือ LPS และ NS-398

กลุ่ม 4 คือ LPS และ ยาง โมก 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

กลุ่ม 5 คือ LPS และ ยาง โมก 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

กลุ่ม 6 คือ LPS และ ยาง โมก 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Test of Homogeneity of Variances

WP1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.332	5	12	.041

ANOVA

WP1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	311790.24 9	5	62358.050	186.998	.000
Within Groups	4001.622	12	333.468		
Total	315791.87 0	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WP1

	(I) GROUP2	(J) GROUP2	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1.00	2.00	-347.8033(*)	14.91014	.000	-406.5602	-289.0464
		3.00	6.8900	14.91014	.999	-51.8669	65.6469
		4.00	-227.9400(*)	14.91014	.000	-286.6969	-169.1831
		5.00	-262.7667(*)	14.91014	.000	-321.5236	-204.0098
		6.00	-149.6800(*)	14.91014	.000	-208.4369	-90.9231
	2.00	1.00	347.8033(*)	14.91014	.000	289.0464	406.5602
		3.00	354.6933(*)	14.91014	.000	295.9364	413.4502
		4.00	119.8633(*)	14.91014	.000	61.1064	178.6202
		5.00	85.0367(*)	14.91014	.004	26.2798	143.7936
		6.00	198.1233(*)	14.91014	.000	139.3664	256.8802
	3.00	1.00	-6.8900	14.91014	.999	-65.6469	51.8669
		2.00	-354.6933(*)	14.91014	.000	-413.4502	-295.9364
		4.00	-234.8300(*)	14.91014	.000	-293.5869	-176.0731
		5.00	-269.6567(*)	14.91014	.000	-328.4136	-210.8998
		6.00	-156.5700(*)	14.91014	.000	-215.3269	-97.8131
	4.00	1.00	227.9400(*)	14.91014	.000	169.1831	286.6969
		2.00	-119.8633(*)	14.91014	.000	-178.6202	-61.1064
		3.00	234.8300(*)	14.91014	.000	176.0731	293.5869
		5.00	-34.8267	14.91014	.414	-93.5836	23.9302
		6.00	78.2600(*)	14.91014	.007	19.5031	137.0169
	5.00	1.00	262.7667(*)	14.91014	.000	204.0098	321.5236
		2.00	-85.0367(*)	14.91014	.004	-143.7936	-26.2798
		3.00	269.6567(*)	14.91014	.000	210.8998	328.4136
		4.00	34.8267	14.91014	.414	-23.9302	93.5836
6.00		113.0867(*)	14.91014	.000	54.3298	171.8436	
6.00	1.00	149.6800(*)	14.91014	.000	90.9231	208.4369	
	2.00	-198.1233(*)	14.91014	.000	-256.8802	-139.3664	
	3.00	156.5700(*)	14.91014	.000	97.8131	215.3269	
	4.00	-78.2600(*)	14.91014	.007	-137.0169	-19.5031	
	5.00	-113.0867(*)	14.91014	.000	-171.8436	-54.3298	
Dunnett C	1.00	2.00	-347.8033(*)	10.18744		-432.3327	-263.2740
		3.00	6.8900	1.54446		-5.9250	19.7050
		4.00	-227.9400(*)	18.40664		-380.6673	-75.2127
		5.00	-262.7667(*)	10.00591		-345.7898	-179.7436
		6.00	-149.6800(*)	11.36196		-243.9548	-55.4052

2.00	1.00	347.8033(*)	10.18744	263.2740	432.3327
	3.00	354.6933(*)	10.12645	270.6701	438.7166
	4.00	119.8633	20.95146	-53.9794	293.7061
	5.00	85.0367	14.15195	-32.3878	202.4612
	6.00	198.1233(*)	15.14112	72.4913	323.7554
	3.00	1.00	-6.8900	1.54446	-19.7050
2.00		-354.6933(*)	10.12645	-438.7166	-270.6701
4.00		-234.8300(*)	18.37295	-387.2778	-82.3822
5.00		-269.6567(*)	9.94380	-352.1644	-187.1489
6.00		-156.5700(*)	11.30730	-250.3912	-62.7488
4.00		1.00	227.9400(*)	18.40664	75.2127
	2.00	-119.8633	20.95146	-293.7061	53.9794
	3.00	234.8300(*)	18.37295	82.3822	387.2778
	5.00	-34.8267	20.86380	-207.9421	138.2887
	6.00	78.2600	21.54701	-100.5243	257.0443
	5.00	1.00	262.7667(*)	10.00591	179.7436
2.00		-85.0367	14.15195	-202.4612	32.3878
3.00		269.6567(*)	9.94380	187.1489	352.1644
4.00		34.8267	20.86380	-138.2887	207.9421
6.00		113.0867	15.01958	-11.5369	237.7102
6.00		1.00	149.6800(*)	11.36196	55.4052
	2.00	-198.1233(*)	15.14112	-323.7554	-72.4913
	3.00	156.5700(*)	11.30730	62.7488	250.3912
	4.00	-78.2600	21.54701	-257.0443	100.5243
	5.00	-113.0867	15.01958	-237.7102	11.5369

* The mean difference is significant at the .05 level.

3. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากการวัดความเข้มข้นของ PGE2 ในกลุ่ม macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาง
โมกบ้านพร้อมกับ LPS (WR0) โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าข้อมูลการแจกแจงแบบปกติ เลือกใช้ one-way ANOVA (Scheffe)

กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุม

กลุ่ม 2 คือ LPS

กลุ่ม 3 คือ LPS และ NS-398

กลุ่ม 4 คือ LPS และ ยางโมกบ้าน 10 µg/mL

กลุ่ม 5 คือ LPS และ ยางโมกบ้าน 25 µg/mL

กลุ่ม 6 คือ LPS และ ยางโมกบ้าน 100 µg/mL

Test of Homogeneity of Variances

WR0

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.522	5	12	.088

ANOVA

WR0

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	312435.81	5	62487.163	99.343	.000
Within Groups	7548.036	12	629.003		
Total	319983.85	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WR0

	(I) GROUP1	(J) GROUP1	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Scheffe	1.00	2.00	-347.8033(*)	20.47768	.000	-428.5004	-267.1063	
		3.00	-3.4800	20.47768	1.000	-84.1771	77.2171	
		4.00	-293.7333(*)	20.47768	.000	-374.4304	-213.0363	
		5.00	-139.8833(*)	20.47768	.001	-220.5804	-59.1863	
		6.00	-131.6900(*)	20.47768	.001	-212.3871	-50.9929	
		2.00	1.00	347.8033(*)	20.47768	.000	267.1063	428.5004
	2.00	3.00	344.3233(*)	20.47768	.000	263.6263	425.0204	
		4.00	54.0700	20.47768	.294	-26.6271	134.7671	
		5.00	207.9200(*)	20.47768	.000	127.2229	288.6171	
		6.00	216.1133(*)	20.47768	.000	135.4163	296.8104	
		3.00	1.00	3.4800	20.47768	1.000	-77.2171	84.1771
		2.00	-344.3233(*)	20.47768	.000	-425.0204	-263.6263	
	3.00	4.00	-290.2533(*)	20.47768	.000	-370.9504	-209.5563	
		5.00	-136.4033(*)	20.47768	.001	-217.1004	-55.7063	
		6.00	-128.2100(*)	20.47768	.002	-208.9071	-47.5129	
		4.00	1.00	293.7333(*)	20.47768	.000	213.0363	374.4304
		2.00	-54.0700	20.47768	.294	-134.7671	26.6271	
		3.00	290.2533(*)	20.47768	.000	209.5563	370.9504	
	4.00	5.00	153.8500(*)	20.47768	.000	73.1529	234.5471	
		6.00	162.0433(*)	20.47768	.000	81.3463	242.7404	
		5.00	1.00	139.8833(*)	20.47768	.001	59.1863	220.5804
		2.00	-207.9200(*)	20.47768	.000	-288.6171	-127.2229	
		3.00	136.4033(*)	20.47768	.001	55.7063	217.1004	
		4.00	-153.8500(*)	20.47768	.000	-234.5471	-73.1529	
5.00	6.00	8.1933	20.47768	.999	-72.5037	88.8904		
	6.00	1.00	131.6900(*)	20.47768	.001	50.9929	212.3871	
	2.00	-216.1133(*)	20.47768	.000	-296.8104	-135.4163		
	3.00	128.2100(*)	20.47768	.002	47.5129	208.9071		
	4.00	-162.0433(*)	20.47768	.000	-242.7404	-81.3463		
	5.00	-8.1933	20.47768	.999	-88.8904	72.5037		
6.00	2.00	-216.1133(*)	20.47768	.000	-296.8104	-135.4163		
	3.00	128.2100(*)	20.47768	.002	47.5129	208.9071		
	4.00	-162.0433(*)	20.47768	.000	-242.7404	-81.3463		
	5.00	-8.1933	20.47768	.999	-88.8904	72.5037		
	1.00	347.8033(*)	20.47768	.000	267.1063	428.5004		
	2.00	344.3233(*)	20.47768	.000	263.6263	425.0204		
Dunnett C	1.00	2.00	-347.8033(*)	10.18744		-432.3327	-263.2740	
		3.00	-3.4800	4.59245		-41.5854	34.6254	
		4.00	-293.7333(*)	32.34448		-562.1086	-25.3581	
		5.00	-139.8833(*)	7.46331		-201.8095	-77.9572	
		6.00	-131.6900(*)	6.20597		-183.1835	-80.1965	
		2.00	347.8033(*)	20.47768	.000	267.1063	428.5004	

2.00	1.00	347.8033(*)	10.18744	263.2740	432.3327
	3.00	344.3233(*)	11.01136	252.9576	435.6891
	4.00	54.0700	33.85742	-226.8587	334.9987
	5.00	207.9200(*)	12.48441	104.3318	311.5082
	6.00	216.1133(*)	11.77598	118.4033	313.8234
3.00	1.00	3.4800	4.59245	-34.6254	41.5854
	2.00	-344.3233(*)	11.01136	-435.6891	-252.9576
	4.00	-290.2533(*)	32.61336	-560.8596	-19.6470
	5.00	-136.4033(*)	8.55378	-207.3776	-65.4291
	6.00	-128.2100(*)	7.48200	-190.2912	-66.1288
4.00	1.00	293.7333(*)	32.34448	25.3581	562.1086
	2.00	-54.0700	33.85742	-334.9987	226.8587
	3.00	290.2533(*)	32.61336	19.6470	560.8596
	5.00	153.8500	33.13973	-121.1238	428.8238
	6.00	162.0433	32.87940	-110.7704	434.8570
5.00	1.00	139.8833(*)	7.46331	77.9572	201.8095
	2.00	-207.9200(*)	12.48441	-311.5082	-104.3318
	3.00	136.4033(*)	8.55378	65.4291	207.3776
	4.00	-153.8500	33.13973	-428.8238	121.1238
	6.00	8.1933	9.51791	-70.7807	87.1673
6.00	1.00	131.6900(*)	6.20597	80.1965	183.1835
	2.00	-216.1133(*)	11.77598	-313.8234	-118.4033
	3.00	128.2100(*)	7.48200	66.1288	190.2912
	4.00	-162.0433	32.87940	-434.8570	110.7704
	5.00	-8.1933	9.51791	-87.1673	70.7807

* The mean difference is significant at the .05 level.

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากการวัดความเข้มข้นของ PGE2 ในกลุ่ม macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาง
โมกบ้านหลังจาก LPS 1 ชั่วโมง (WR1) โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าข้อมูลการแจกแจงแบบปกติ เลือกใช้ one-way ANOVA (Dunnett

C)

กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุม

กลุ่ม 2 คือ LPS

กลุ่ม 3 คือ LPS และ NS-398

กลุ่ม 4 คือ LPS และ ยางโมกบ้าน 10 µg/mL

กลุ่ม 5 คือ LPS และ ยางโมกบ้าน 25 µg/mL

กลุ่ม 6 คือ LPS และ ยางโมกบ้าน 100 µg/mL

Test of Homogeneity of Variances

WR1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.853	5	12	.026

ANOVA

WR1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	329365.14	5	65873.028	80.299	.000
Within Groups	9844.208	12	820.351		
Total	339209.34	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WR1

	(I) GROUP3	(J) GROUP3	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1.00	2.00	-347.8033(*)	23.38590	.000	-439.9609	-255.6457
		3.00	6.8900	23.38590	1.000	-85.2676	99.0476
		4.00	-208.3100(*)	23.38590	.000	-300.4676	-116.1524
		5.00	-251.8100(*)	23.38590	.000	-343.9676	-159.6524
		6.00	-271.4000(*)	23.38590	.000	-363.5576	-179.2424
	2.00	1.00	347.8033(*)	23.38590	.000	255.6457	439.9609
		3.00	354.6933(*)	23.38590	.000	262.5357	446.8509
		4.00	139.4933(*)	23.38590	.003	47.3357	231.6509
		5.00	95.9933(*)	23.38590	.039	3.8357	188.1509
		6.00	76.4033	23.38590	.131	-15.7543	168.5609
	3.00	1.00	-6.8900	23.38590	1.000	-99.0476	85.2676
		2.00	-354.6933(*)	23.38590	.000	-446.8509	-262.5357
		4.00	-215.2000(*)	23.38590	.000	-307.3576	-123.0424
		5.00	-258.7000(*)	23.38590	.000	-350.8576	-166.5424
		6.00	-278.2900(*)	23.38590	.000	-370.4476	-186.1324
	4.00	1.00	208.3100(*)	23.38590	.000	116.1524	300.4676
		2.00	-139.4933(*)	23.38590	.003	-231.6509	-47.3357
		3.00	215.2000(*)	23.38590	.000	123.0424	307.3576
		5.00	-43.5000	23.38590	.639	-135.6576	48.6576
		6.00	-63.0900	23.38590	.274	-155.2476	29.0676
	5.00	1.00	251.8100(*)	23.38590	.000	159.6524	343.9676
		2.00	-95.9933(*)	23.38590	.039	-188.1509	-3.8357
		3.00	258.7000(*)	23.38590	.000	166.5424	350.8576
		4.00	43.5000	23.38590	.639	-48.6576	135.6576
		6.00	-19.5900	23.38590	.979	-111.7476	72.5676
	6.00	1.00	271.4000(*)	23.38590	.000	179.2424	363.5576
		2.00	-76.4033	23.38590	.131	-168.5609	15.7543
		3.00	278.2900(*)	23.38590	.000	186.1324	370.4476
		4.00	63.0900	23.38590	.274	-29.0676	155.2476
		5.00	19.5900	23.38590	.979	-72.5676	111.7476
Dunnett C	1.00	2.00	-347.8033(*)	10.18744		-432.3327	-263.2740
		3.00	6.8900	1.54446		-5.9250	19.7050
		4.00	-208.3100(*)	18.40982		-361.0638	-55.5562
		5.00	-251.8100(*)	12.15267		-352.6456	-150.9744
		6.00	-271.4000(*)	32.48341		-540.9280	-1.8720
	2.00	1.00	347.8033(*)	10.18744		263.2740	432.3327

	3.00	354.6933(*)	10.12645	270.6701	438.7166
	4.00	139.4933	20.95426	-34.3727	313.3594
	5.00	95.9933	15.74315	-34.6340	226.6207
	6.00	76.4033	33.99017	-205.6269	358.4335
3.00	1.00	-6.8900	1.54446	-19.7050	5.9250
	2.00	-354.6933(*)	10.12645	-438.7166	-270.6701
	4.00	-215.2000(*)	18.37614	-367.6743	-62.7257
	5.00	-258.7000(*)	12.10158	-359.1117	-158.2883
	6.00	-278.2900(*)	32.46433	-547.6597	-8.9203
4.00	1.00	208.3100(*)	18.40982	55.5562	361.0638
	2.00	-139.4933	20.95426	-313.3594	34.3727
	3.00	215.2000(*)	18.37614	62.7257	367.6743
	5.00	-43.5000	21.97691	-225.8513	138.8513
	6.00	-63.0900	37.28899	-372.4919	246.3119
5.00	1.00	251.8100(*)	12.15267	150.9744	352.6456
	2.00	-95.9933	15.74315	-226.6207	34.6340
	3.00	258.7000(*)	12.10158	158.2883	359.1117
	4.00	43.5000	21.97691	-138.8513	225.8513
	6.00	-19.5900	34.62997	-306.9289	267.7489
6.00	1.00	271.4000(*)	32.48341	1.8720	540.9280
	2.00	-76.4033	33.99017	-358.4335	205.6269
	3.00	278.2900(*)	32.46433	8.9203	547.6597
	4.00	63.0900	37.28899	-246.3119	372.4919
	5.00	19.5900	34.62997	-267.7489	306.9289

* The mean difference is significant at the .05 level.