

ผลของสารสกัดจากหัวปลีพลึงเขาต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารชักนำการอักเสบ

Modulatory Effect of Plab Plueng Khao (*Crinum wattii*) Bulb Extract on Antioxidant Activity and Pro-Inflammatory Mediators

ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์ บังอร ประจันบาล และ เอกรัฐ คำเจริญ*

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สระแก้ว 27160

Sirilak Kamonwannasit, Bung-on Prajanban and Agarat Kamcharoen*

Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus 27160

*Corresponding author: agarat.kam@gmail.com

Received: 10 January 2023/ Revised: 23 March 2023/ Accepted: 30 March 2023

บทคัดย่อ

การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากหัวปลีพลึงเขาด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า สารสกัดจากหัวปลีพลึงเขา (*Crinum wattii* Baker) มีสารพฤกษเคมีกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และซาโปนิน พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยเฉพาะส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ สารสกัดคลอโรฟอร์มและสารสกัดเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 มากกว่าสารสกัดอื่น ๆ สารสกัดคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ได้มากกว่าสารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ และสารสกัดเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ สารสกัดเอทานอลสามารถลดการแสดงออกของยีน iNOS ในภาวะที่มี LPS ชักนำได้ดี แต่เพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้ง TNF- α , IL-1 β , IL-6 และ COX-2 ในภาวะที่มี LPS ชักนำ ในขณะที่สารสกัดมีผลในการลดการแสดงออกของยีน COX-1 ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษของสารสกัด อาจจะเป็นผลของสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในหัวปลีพลึงเขาและสารสกัดที่ทดสอบนี้มีความเป็นพิษผ่านกลไกของการอักเสบ

คำสำคัญ: ปลีพลึงเขา ความเป็นพิษ การอักเสบ องค์ประกอบทางพฤกษเคมี

Abstract

Phytochemical screening and bioactivity of Plab Plueng Khao (*Crinum wattii* Baker) bulb extract with various solvents were studied. The results showed that alkaloids, flavonoids, tannins and saponins were consisted in the extracts. In addition, the extracts showed high antioxidant activity especially organic solvents. For cytotoxicity against RAW264.7 cells, the chloroform, and ethanol extracts had higher cytotoxic effect than the others. The chloroform extract could better suppress nitric oxide production than the ethanol, water, and ethyl acetate extracts. The ethanol extract suppressed the expression of the iNOS gene but increased the expression of inflammatory-related genes, including TNF- α , IL-1 β , IL-6, and COX-2 in the LPS-inducing condition. Moreover, the ethanol extract suppressed the expression of the COX-1 gene,



indicating the toxicity of the extract. These results indicated that the *C. wattii* extract might show cytotoxicity to the test cells due to the alkaloid content and inflammatory mechanism.

Keywords: *Crinum wattii* Baker, cytotoxicity, inflammation, phytochemical composition

บทนำ

พลับพลึงเขา (Plab Plueng Khao) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Crinum wattii* Baker เป็นพืชหายากอยู่ในวงศ์ Amaryllidaceae เป็นพืชล้มลุก มีหัวใต้ดิน มักขึ้นอยู่บนดิน ในน้ำ ซึ่งทั่วโลกมีพืชในวงศ์นี้ 59 สกุล 850 สายพันธุ์ โดยในประเทศไทยพบพืชในวงศ์พลับพลึงเพียง 12 สกุล 30 สายพันธุ์ [1] โดยเป็นสายพันธุ์พื้นเมือง 6 สายพันธุ์ได้แก่ พลับพลึงป่าหรือกระเทียมช้าง (*C. amoenum* Roxb. ex Ker-Gawl) พลับพลึงขาว (*C. asiaticum* L.) ว่านคอดแดงหรือว่านแรงคอดำ (*C. latifolium* L.) พลับพลึงธาร (*C. thaianum* J. Schulze) พลับพลึงน้ำหรือพลับพลึงแม่น้ำโขง (*C. viviparum* (Lam.) R. Ansari & V.J. Nair) และพลับพลึงเขาหรือบัวบก (*C. wattii* Baker) [2] โดยพลับพลึงธารขึ้นในลำธารน้ำใสสะอาดในพื้นที่จังหวัดระนองและพังงา ซึ่งเป็นพืชถิ่นเดียวของไทย [1, 3] พลับพลึงป่าหรือกระเทียมช้างพบทั่วประเทศไทย [4] พลับพลึงขาวและพลับพลึงน้ำพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ว่านคอดแดงพบในจังหวัดสตูล ส่วนพลับพลึงเขาพบในจังหวัดพิษณุโลก [3] และสระแก้ว [5] โดยอยู่ในป่าเต็งรังในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านพร้าว อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว ซึ่งเป็นพื้นที่ติดกับมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

พืชสกุลนี้เป็นพืชพิษ ไม่สามารถรับประทานได้โดยเฉพาะส่วนหัว และสารพิษส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ซึ่งมีมากกว่า 150 ชนิด [6] อย่างไรก็ตามพืชพิษอาจมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างซึ่งเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ แม้ส่วนหัวของพืชชนิดนี้มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบมาก [7] แต่มีรายงานว่ามีการใช้พืชสกุลนี้เป็นยาพื้นบ้านในพื้นที่แอฟริกา เอเชียตะวันออก และอเมริกาใต้ ในการรักษาอาการเจ็บป่วยหลายชนิด สารสกัดและสารสำคัญจากพืชชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ [8-11] ต้านการอักเสบ [12, 13] ต้านมะเร็ง [14-16] เป็นต้น

สารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการป้องกันตัวเอง เนื่องจากความเป็นพิษของสารแต่ความเป็นพิษนั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ปริมาณ ระยะเวลาในการได้รับ ความไวต่อสารพิษของผู้รับ ตำแหน่งของการออกฤทธิ์ ในขณะเดียวกันสารกลุ่มแอลคาลอยด์หลายชนิด เช่น morphine, strychnine, quinine, ephedrine และ nicotine มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ เช่น ใช้เป็นยาชาหรือยาสลบยาแก้ปวด มีฤทธิ์ปกป้องหัวใจและต้านการอักเสบ [17] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษและสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของพลับพลึงเขา ดังนั้นจึงต้องศึกษาวิจัยความเป็นพิษต่อเซลล์ของพืชเพื่อให้นำมาใช้ประโยชน์มีความปลอดภัยมากขึ้น

การอักเสบ (inflammation) เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อจัดการกับสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุก เช่น เชื้อก่อโรค เซลล์มะเร็ง โดยปกติการอักเสบเป็นการตอบสนองระยะสั้น เมื่อสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นเรียบร้อยแล้วการอักเสบนั้นจะถูกควบคุมให้ลดลงจนกลับเข้าสู่ความสมดุลตามปกติของร่างกาย ดังนั้น ร่างกายจะมีกลไกในการรักษาสมดุลของการสร้างและการทำงานของสารชักนำการอักเสบ (pro-inflammatory mediators) และสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory mediators) เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) โดยสภาวะปกติไนตริกออกไซด์จะมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ แต่ในขณะเดียวกันในสภาวะที่ผิดปกติที่มีการอักเสบ ไนตริกออกไซด์จะทำหน้าที่เป็นสารชักนำการอักเสบเพิ่มมากขึ้น [18] หากการควบคุมกระบวนการรักษาสมดุลนั้นผิดปกติ อาจทำให้เกิดการสร้างสารชักนำการอักเสบหลายชนิดมากเกินไปจนเป็นอันตรายและหากไม่สามารถลดระดับลงมาได้ จะส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะจนส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพแก่ร่างกายได้ เช่น การปวด บวม ร้อนและแดง ซึ่งเป็นผลมาจากสารชักนำการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ เป็นต้น [19]

นอกจากนี้ มีสารชักนำการอักเสบที่สำคัญ เช่น interleukin-1b (IL-1b), IL-6, tumor necrosis factor-a (TNF-a), interferon-g (IFN-g), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) สารชักนำการอักเสบเหล่านี้มีความสำคัญในการกำจัดเชื้อก่อโรคและเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม สารชักนำการอักเสบเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อได้เช่นกัน [20, 21] หากร่างกายถูกกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่งสารชักนำการอักเสบหรือไซโตไคน์ (cytokine) มากผิดปกติจะนำไปสู่กลุ่มอาการจากการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine release syndrome) ที่เรียกว่าภาวะร่างกายอักเสบอย่างรุนแรง หรือ cytokine storm ซึ่งเกิดจากร่างกายมีการหลั่งสารชักนำการอักเสบอย่างมากและไม่สามารถควบคุมได้ ไซโตไคน์เหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อและทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ อาจรุนแรงจนทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ [21, 22] ซึ่งการยับยั้งการทำงานของไนตริกออกไซด์ และสารชักนำการอักเสบที่เกี่ยวข้องจึงเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมและบรรเทาอาการอักเสบหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาพิษของเคมีเบื้องต้นฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากหัวปลับลิงเขา ซึ่งพบพืชชนิดนี้ในพื้นที่จังหวัดสระแก้วและยังไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นในการศึกษาต่อยอดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืชและสารสกัด

เก็บตัวอย่างหัวปลับลิงเขาในพื้นที่มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว โดยตัวอย่างพืชหมายเลข AgriTech-003 ได้รับการตรวจพิสูจน์โดยนักพฤกษศาสตร์ ดร. จักรพงษ์ รัตตะมณี นำส่วนหัวปลับลิงเขามาล้างทำความสะอาด ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด

สกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate extract) เอทานอล (ethanol) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และน้ำกลั่น โดยชั่งผงตัวอย่างอบแห้ง 20 กรัม เติมตัวทำละลายแต่ละชนิดปริมาตร 400 มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดคลอโรฟอร์ม (Chloroform extract หรือ CF) สารสกัดเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate extract หรือ EA) และสารสกัดเอทานอล (Ethanol extract หรือ ET) เตรียมโดยใช้ชุดสกัดซอกซ์เลต (Soxhlet apparatus) ขณะที่สารสกัดน้ำ (Water extract หรือ WT) เตรียมโดยการต้มในน้ำเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 xg เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และนำสารสกัดเข้มข้นทั้ง 4 ชนิด มาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer)

การศึกษาความเป็นพิษ การสร้างไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของยีน สารสกัดถูกนำมาละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาดเล็กสำหรับหลอดฉีดยา (syringe filter) ขนาด 0.4 ไมโครเมตร เพื่อใช้เป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ในการศึกษาต่อไป

2. การทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

การศึกษาสารพิษเคมีในสารสกัดเป็นวิธีการทดสอบเชิงคุณภาพ โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารสกัด และสารเคมีที่ใช้ทดสอบ เพื่อคัดกรองชนิดพิษเคมีเบื้องต้นที่มีในสารสกัด โดยทดสอบหาสารกลุ่มสำคัญต่างๆ กับสารเคมีดังนี้

การทดสอบแอลคาลอยด์ใช้การทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือเกิดตะกอนด้วยน้ำยาทดสอบ Wagner's reagent การทดสอบฟลาโวนอยด์ใช้ปฏิกิริยาไฮยานิดิน ให้สารละลายสีส้ม-แดง น้ำเงินหรือเขียว การทดสอบการเกิดฟองของซาโปนิน โดยนำสารสกัดมาเขย่ากับน้ำทำให้เกิดเป็นฟองโดยมีลักษณะคล้ายรังผึ้งและตั้งทิ้งไว้ ฟองจะมีความคงตัว 15-20 นาที [23]



การทดสอบแทนนินโดยใช้สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ซึ่งจะให้สารละลายสีน้ำเงินดำหรือเขียวดำ การทดสอบเทอร์พินอยด์ด้วยวิธี Salkowski's test บริเวณรอยต่อของสารละลายจะปรากฏสีน้ำตาล เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มขึ้น การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์โดยทดสอบส่วนสเตรอยด์นิวเคลียสด้วยวิธีของ Liebermann-Burchard โดยการเติมกรดอะซิติกและกรดซัลฟูริกเข้มข้น จะทำให้เกิดสีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินเขียว และการทดสอบส่วนน้ำตาลไดออกซีด้วยวิธี Keller-Kiliani's test โดยการเติมกรดอะซิติกเข้มข้น สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ และกรดซัลฟูริกเข้มข้น จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาล บริเวณรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟูริก [24]

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ 3 วิธี ดังนี้

3.1 ABTS radical cation scavenging activity assay

การทดสอบด้วยวิธี ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) ทำตามวิธีของ Re และคณะ [25] โดย ABTS radical cation ($ABTS^{+•}$) ถูกสร้างจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง ABTS 14 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 4.9 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ working solution ทำละลายสารสกัดด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย $ABTS^{+•}$ จำนวน 950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร การทดลองชุดควบคุม (positive control) ใช้กรดแทนนิก (tannic acid) แทนสารสกัด คำนวณค่า antioxidant activity โดยแสดงผลในค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ ได้ร้อยละ 50 (scavenging concentration, SC_{50}) โดยใช้กรดแทนนิก (สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน) แทนสารสกัดเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัด

3.2 DPPH radical scavenging activity assay

การทดสอบด้วยวิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ทำตามวิธีของ Bor และคณะ [26] โดยทำละลายสารสกัดด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ในเมทานอล 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 850 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร การทดลองชุดควบคุม (positive control) ใช้กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) แทนสารสกัด คำนวณค่า antioxidant activity โดยแสดงผลในค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{•}$ ได้ร้อยละ 50 (scavenging concentration, SC_{50}) โดยใช้กรดแอสคอบิก (สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน) แทนสารสกัดเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัด

3.3 Ferric reducing antioxidant power assay

การทดสอบด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay ตามวิธีของ Dordevic และคณะ [27] โดยทำการเตรียมสารละลาย FRAP ซึ่งประกอบด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 300 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.6 สารละลาย TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v) โดยทำละลายสารสกัดด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร และใช้เฟอร์รัสซัลเฟต

(FeSO₄) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณค่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอนโดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากสารสกัดกับกราฟมาตรฐานของ FeSO₄ และรายงานผลในรูปของไมโครโมลของเฟอร์ริกต่อกรัมสารสกัด ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg extract}$)

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

ทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% Fetal bovine serum และ 1% Antibiotic-Antimycotic solution ซึ่งประกอบด้วยเพนิซิลลิน (penicillin) 10,000 ยูนิต สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 10 มิลลิกรัม และแอมโฟเทอริซิน บี 25 ไมโครกรัม โดยเฉพาะเลี้ยงใน 96-well plate ประมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 วัน ทำการเจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมทิ้งแล้วเติมสารสกัดที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำความเข้มข้นละ 3 หลุม และทำ 3 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำเซลล์มาทดสอบความมีชีวิต (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay [28] ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร แล้วคำนวณการมีชีวิตของเซลล์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) แสดงผลการทดสอบด้วยค่า IC₅₀

5. การทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

ทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% Fetal bovine serum และ 1% Antibiotic-Antimycotic solution โดยเฉพาะเลี้ยงใน 96-well plate หลุมละประมาณ 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 วัน ทำการเจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้น ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมทิ้งแล้วเติมสารสกัดที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยใช้ความเข้มข้นในระดับที่ต่ำกว่าค่า IC₅₀ ของการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ และในสภาวะที่กระตุ้นให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ ทำการเติม *Escherichia coli* lipopolysaccharides (LPS) เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ส่วนหลุมที่ไม่ต้องการการกระตุ้นให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ ทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เปล่าปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แทน LPS ความเข้มข้นละ 3 หลุม และทำ 3 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเซลล์มา 50 ไมโครลิตร มาทำการทดสอบหาปริมาณไนตริกออกไซด์ โดยการทำปฏิกิริยากับ 50 ไมโครลิตร ของสารละลาย Griess reagent [29] ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วคำนวณการสร้างไนตริกออกไซด์ (nitric oxide production) แสดงผลการทดสอบด้วยค่า IC₅₀

6. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

สารสกัดเอทานอล (ET) ถูกเลือกมาใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง (real-time PCR) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 (2×10^5 cells/well) โดยใช้ 24-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% Fetal bovine serum และ 1% Antibiotic-Antimycotic solution แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางสารสกัด ET ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปสกัด whole cell RNA โดยใช้ E.Z.N.A.® Total RNA Kit (Omega Bio-tek, GA) โดยใช้ RNA (1 ไมโครกรัม) เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธีการทำ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction โดยใช้ Viva cDNA synthesis kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นนำ cDNA ต้นแบบ (10 ng/ μl) มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง โดยใช้เครื่อง CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Hot FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia) ไพโรเมอร์ที่ใช้ คือ iNOS, IL-1b, IL-6, TNF-a, COX-1, COX-2 และ b-actin (ตารางที่ 1) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง แสดงในตารางที่ 2 แล้ว



วิเคราะห์หาปริมาณการแสดงออกของยีนโดยคำนวณหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนจากสูตร 2^{-DDCT} ตามวิธีการของ Rahmati-Yamchi และคณะ [30]

$$2^{-DDCT} = 2^{-[Ct, \text{target (test)} - Ct, \text{target (calibrator)}] - [Ct, \text{ref (test)} - Ct, \text{ref (calibrator)}]}$$

เมื่อ $Ct, \text{target (test)}$ = ค่ารอบปฏิบัติการที่ตรวจพบยีน (Cycle threshold; Ct) บ่งบอกถึงยีนที่สนใจที่ใช้ทดสอบ
 $Ct, \text{target (calibrator)}$ = ค่ารอบปฏิบัติการที่ตรวจพบยีน (Cycle threshold; Ct) บ่งบอกถึงยีนที่สนใจที่เป็นชุดควบคุม
 $Ct, \text{ref (test)}$ = ค่ารอบปฏิบัติการที่ตรวจพบยีน (Cycle threshold; Ct) บ่งบอกถึงยีนพื้นฐาน (housekeeping gene) ที่ใช้ทดสอบ
 $Ct, \text{ref (calibrator)}$ = ค่ารอบปฏิบัติการที่ตรวจพบยีน (Cycle threshold; Ct) บ่งบอกถึงยีนพื้นฐาน (housekeeping gene) ที่เป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 1 ดีเอ็นเอตั้งต้น (Oligonucleotide primers) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง

Gene		Primer Sequence (5'-3')	References
TNF- α	Forward	ATGAGCACAGAAAGCATGATC	[31]
	Reverse	TACAGGCTTGTCACCTCGAATT	
iNOS	Forward	AATGGCAACATCAGGTCGGCCATCACT	[31]
	Reverse	GCTGTGTGTACACAGAAGTCTCGAACTC	
IL-1 β	Forward	CAGGATGAGGACATGAGCACC	[32]
	Reverse	CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC	
IL-6	Forward	CATCCAGTTGCCTTCTTGGA	[32]
	Reverse	GCATTGGAAATTGGGGTAGGAAG	
COX-2	Forward	GGAGAGACTATCAAGATAGT	[31]
	Reverse	ATGGTCAGTAGACTTTTACA	
COX-1	Forward	AGTGCGGTCCAACCTTATCC	[31]
	Reverse	CCGCAGGTGATACTGTCGTT	
b-actin	Forward	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT	[31]
	Reverse	CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG	



ตารางที่ 2 อุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initial activation	95°C	12 นาที	1
Denaturation	95°C	15 วินาที	
Annealing	54°C (TNF-a, IL-1b และ b-actin)	20 วินาที	40
	55°C (COX-1 และ b-actin)		
	60°C (COX-2, iNOS และ b-actin)		
	65°C (IL-6 และ b-actin)		
Elongation	72°C	20 วินาที	

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการศึกษานี้แสดงด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย One-Way ANOVA และ multiple comparison (LSD) ด้วยโปรแกรม SPSS โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า $P\text{-value} \leq 0.05$

ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพิษเคมีของสารสกัดพลับพลึงเขาด้วยวิธีการคัดกรองทางเคมีของสารพิษเคมีเบื้องต้น พบว่า สารสกัดเอทานอล สารสกัดเอทิลอะซิเตท และสารสกัดคลอโรฟอร์มมีสารกลุ่มแทนนิน ชาโปนิน แอลคาลอยด์ และ ฟลาโวนอยด์ เช่นเดียวกับสารสกัดน้ำ แต่สารสกัดน้ำไม่พบสารกลุ่มชาโปนิน นอกจากนี้ สารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่พบสารกลุ่ม เทอร์ปีนอยด์และคาร์ดิแอกกลัยโคไซด์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 พิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากหัวพลับพลึงเขา

สารสกัด	สารพิษเคมี					
	แอลคาลอยด์	ฟลาโวนอยด์	ชาโปนิน	แทนนิน	เทอร์ปีนอยด์	คาร์ดิแอกกลัยโคไซด์
สารสกัดคลอโรฟอร์ม	+	+	+	+	-	-
สารสกัดเอทิลอะซิเตท	+	+	+	+	-	-
สารสกัดเอทานอล	+	+	+	+	-	-
สารสกัดน้ำ	+	+	-	+	-	-

(+) = พบ, (-) ไม่พบ

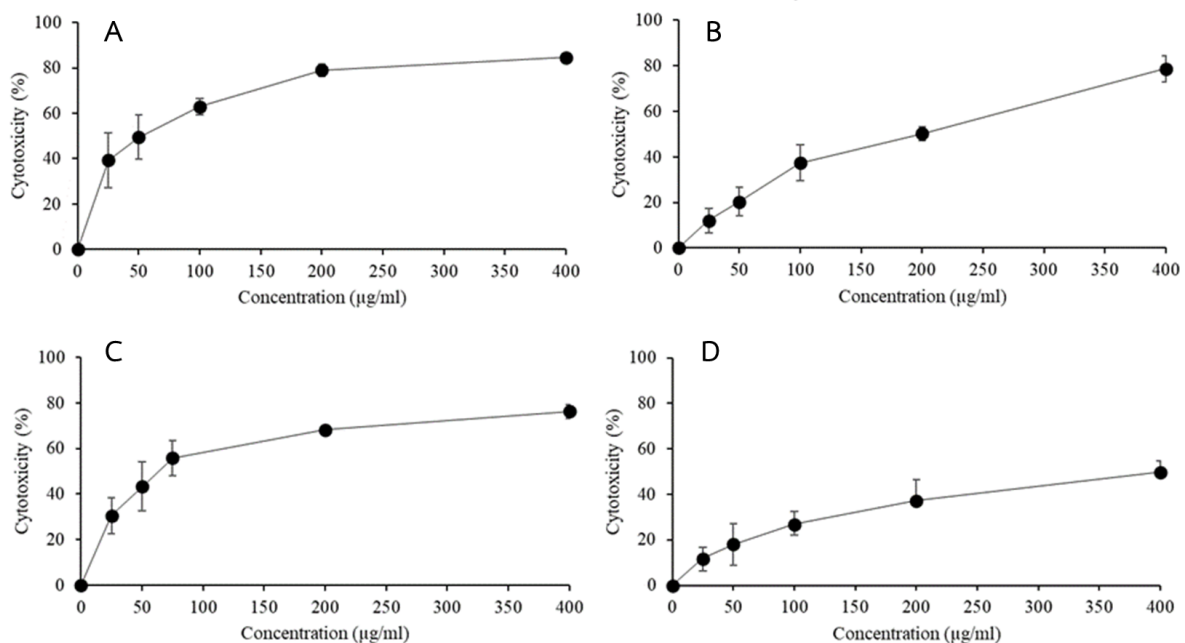
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากพลับพลึงเขาที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (ตารางที่ 4) โดยจากการศึกษาด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และจากการทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ส่วนสารสกัดน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด



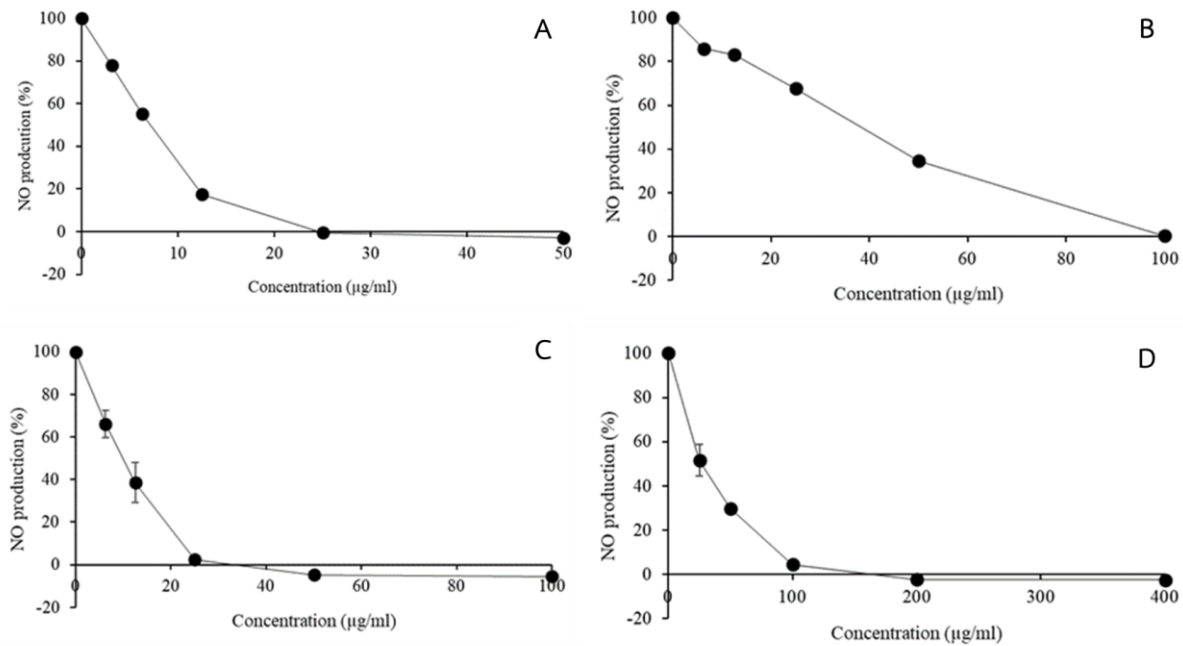
ตารางที่ 4ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากหัวปลีพลึงเขา

สารสกัด	สารมาตรฐาน	ABTS	DPPH	FRAP
		EC ₅₀ (μg/ml)	EC ₅₀ (μg/ml)	(μmol Fe ²⁺ /mg extract)
สารสกัดคลอโรฟอร์ม		35.74±2.01	1.47±2.02	142.60±2.83
สารสกัดเอทิลอะซิเตท		31.07±3.14	3.75±1.13	302.80±7.07
สารสกัดเอทานอล		28.64±2.94	1.35±1.09	87.40±5.66
สารสกัดน้ำ		36.96±3.06	5.06±1.59	49.40±0.57
	Tannic acid	2.21±0.04	-	-
	Ascorbic acid	-	0.40±1.49	-

เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 พบว่าสารสกัดเอทานอลและสารสกัดคลอโรฟอร์มมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบค่อนข้างสูงและมากกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทและสารสกัดน้ำ (ภาพที่ 1 และตารางที่ 5) และเมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดที่มีต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ถูกชักนำการสร้างด้วย LPS พบว่าสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ดีโดยสารสกัดคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งได้สูงกว่าสารสกัดเอทานอล สารสกัดน้ำ และสารสกัดเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ (ภาพที่ 2 และตารางที่ 5) โดยค่า IC₅₀ ของการทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มความเข้มข้นน้อยที่สุดคือ 7.43 ± 0.19 สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่มีต่อการเจริญของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 โดย A) สารสกัดคลอโรฟอร์ม (CF) B) สารสกัดเอทิลอะซิเตท (EA) C) สารสกัดเอทานอล (ET) และ D) สารสกัดน้ำ (WT)



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์แมโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกชักนำด้วย LPS โดย A) สารสกัดคลอโรฟอร์ม (CF) B) สารสกัดเอทิลอะซิเตท (EA) C) สารสกัดเอทานอล (ET) และ D) สารสกัดน้ำ (WT)

ตารางที่ 5 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดที่มีความเป็นพิษ และการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมโครฟาจ RAW264.7

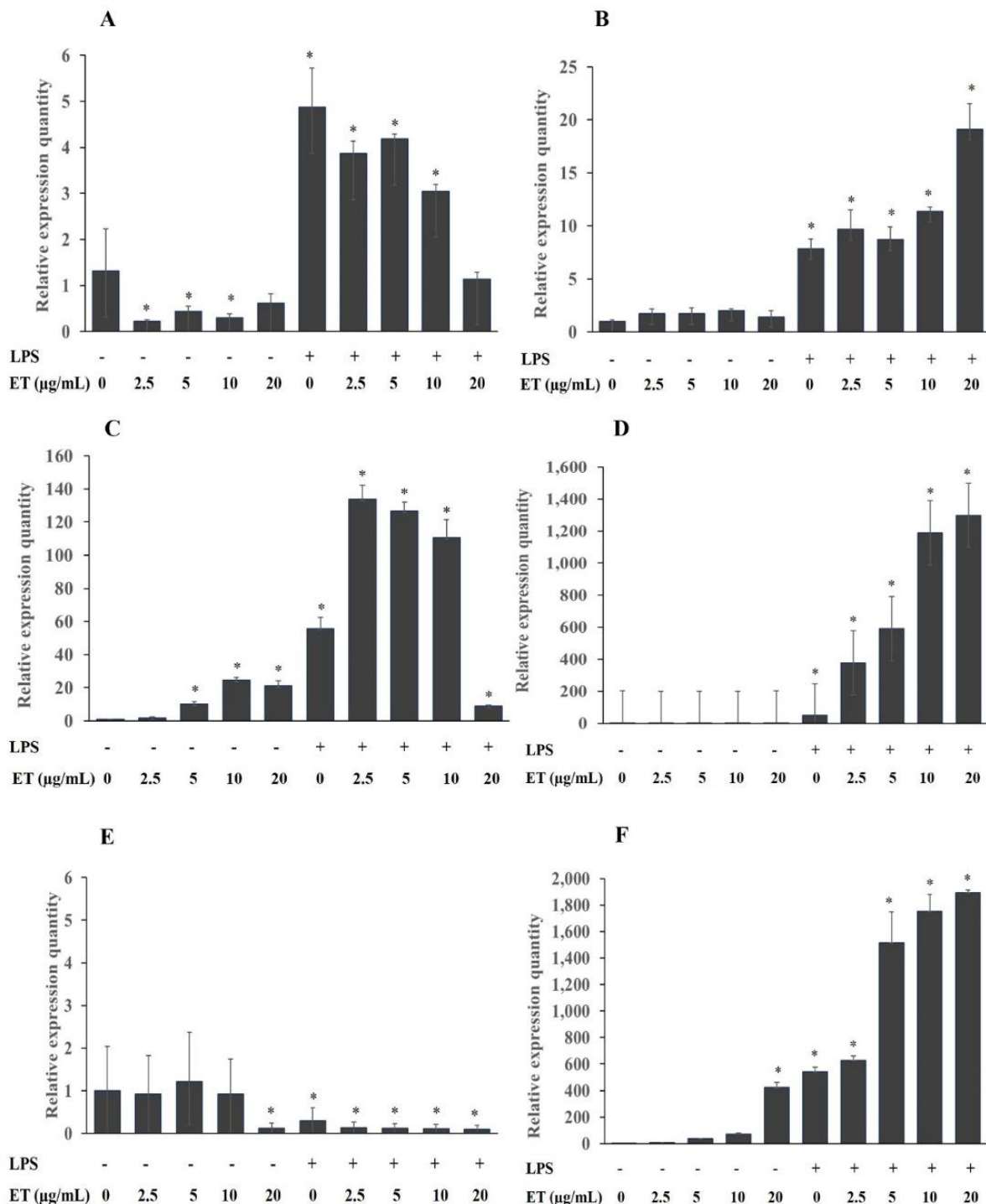
สารสกัด	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	
	การทดสอบความเป็นพิษ	การยับยั้งไนตริกออกไซด์
สารสกัดคลอโรฟอร์ม	68.01 ± 8.48 ^a	7.43 ± 0.19 ^a
สารสกัดเอทิลอะซิเตท	177.59 ± 21.98 ^b	38.16 ± 0.55 ^b
สารสกัดเอทานอล	63.03 ± 12.62 ^a	10.04 ± 1.88 ^c
สารสกัดน้ำ	≥ 400	33.11 ± 0.92 ^d

หมายเหตุ ^{a-d} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของสารสกัดในการทดสอบเดียวกัน ($P < 0.05$)

จากการศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ ยีน iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-1 และ COX-2 โดยเปรียบเทียบกับยีน b-actin ซึ่งผู้วิจัยทำการเลือกสารสกัดเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 0 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และผลการศึกษาในภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าสารสกัดไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-6 มีผลในการลดการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-1 แต่มีผลในการเพิ่มของยีน IL-1 β และ COX-2 (ภาพที่ 3) ส่วนภาวะที่มีการชักนำด้วย LPS ให้เกิดการแสดงออกของยีน พบว่ายีนทุกชนิดมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นยีน COX-1 และเมื่อทำการทดสอบโดยกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับสารสกัดเอทานอล (ET) แล้วเปรียบเทียบผลกับภาวะที่มี LPS กระตุ้นเพียงอย่างเดียว พบว่าสารสกัด ET สามารถลดการแสดงออกของยีน iNOS ได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ทำให้การแสดงออกของยีนลดลงในระดับเดียวกันกับชุดควบคุม (ภาพที่ 3A) ซึ่งสัมพันธ์กับผลของการสร้างไนตริกออกไซด์ (ภาพที่ 2C) นอกจากนี้สารสกัด ET ยังลดการแสดงออกของยีน COX-1 อีกด้วย (ภาพที่ 3E) ในทางตรงกันข้าม สารสกัด ET มี



ผลในการเพิ่มของยีน TNF-a, IL-1b, IL-6 และ COX-2 สูงขึ้นอย่างมาก แบบ dose dependent manner ในภาวะที่มี LPS ชักนำร่วมด้วย (ภาพที่ 3B, 3C, 3D และ 3F ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่มี LPS กระตุ้นเพียงอย่างเดียว ยกเว้น IL-1b ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งลดการแสดงออกของยีนลงต่ำกว่าภาวะที่มี LPS กระตุ้นเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3C) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่ทดสอบเสริมฤทธิ์ของ LPS ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน TNF-a, IL-1b, IL-6 และ COX-2 แต่ลดการแสดงออกของ COX-1 ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารสกัดที่ทดสอบ



ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดเอทานอลที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เมื่อ A) iNOS, B) TNF-a, C) IL-1b, D) IL-6, E) COX-1 และ F) COX-2 โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ ภาวะที่ไม่มีการเติม LPS และ ET ($P < 0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลการทดสอบสารพิษจากพืชสมุนไพรเบื้องต้นของสารสกัดจากหัวปลีพลิงเขาโดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน พบว่าสารสกัดจากหัวปลีพลิงเขาทุกชนิดมีสารพิษจากพืชในกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน เช่นเดียวกับที่พบในหัวปลีพลิงสายพันธุ์อื่น เช่น *C. ornatum* [8], *C. asiaticum*, *C. brachynema*, *C. malabaricum*, *C. pratense*, *C. solapurense*, *C. viviparum*, *C. woodrowii* [14], *C. latifolium* [11, 14], *C. jagus* [10, 14, 33], *Crinum x amabile* [34], และ *C. zeylanicum* [35] โดยแอลคาลอยด์มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ด้านเชื้อรา ฤทธิ์ด้านเบาหวาน ขณะที่ฟลาโวนอยด์และแทนนินมีฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมยา สารเคมี เครื่องสำอาง และอาหาร [7]

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหัวปลีพลิงเขา ด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP ซึ่งเป็นวิธีทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งมีความแตกต่างกันของกลไกการทดสอบและกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีสมบัติแตกต่างกัน ทำให้แต่ละวิธีมีผลการทดลองที่ได้แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH เป็นการทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอะตอมของสารต้านอนุมูลอิสระแก่อนุมูลของ DPPH ขณะที่วิธี ABTS เป็นการทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ [36] และวิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ [37] จากผลการศึกษาของสารสกัดหัวปลีพลิงเขาพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี สอดคล้องกับผลการทดสอบพิษจากพืชสมุนไพรเบื้องต้นของสารสกัดหัวปลีพลิงเขาที่พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวได้มีรายงานว่า เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [38]

จากผลการศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากหัวปลีพลิงเขาที่มีฤทธิ์ทำให้การสร้างสารชักนำการอักเสบหลายชนิด ได้แก่ IL-1b, IL-6, TNF-a และ COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเฉพาะเมื่อกระตุ้นร่วมกับ LPS ที่ชักนำให้เกิดการอักเสบ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากหัวปลีพลิงเขาสามารถทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงได้ สอดคล้องกับผลการทดสอบความเป็นพิษพบว่าสารสกัดจากหัวปลีพลิงเขามีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นผลของแอลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบและเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ทดสอบอาจจะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารชักนำการอักเสบออกมามากมายหรือเกิด inflammatory cytokine storm จนทำให้เซลล์ที่ทดสอบแตกและตายในที่สุด มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดและสารแอลคาลอยด์ที่แยกได้จากรากของ *Chelidonium majus* ที่มีต่อการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและความเป็นพิษพบว่าสาร berberine, chelidionine และ chelerythrine สามารถลดการหลั่ง TNF-a ได้ ส่วนสาร sanguinarine สามารถลดการหลั่ง IL-1b ได้ดี แต่มีผลในการเพิ่ม IL-8 และ TNF-a และมีความเป็นพิษสูง ส่วนสาร coptisine มีความเป็นพิษสูงเช่นกันแต่สามารถลดการหลั่งไซโตไคน์ต่าง ๆ ได้เล็กน้อย แม้ทดสอบสารแอลคาลอยด์เหล่านี้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.625–2.5 ไมโครโมลาร์) แต่ยังคงพบความเป็นพิษสำหรับสารสกัด *C. majus* ที่ความเข้มข้นต่ำ (1.25–12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถกระตุ้นให้เพิ่มการหลั่งไซโตไคน์ที่ทดสอบขึ้นและมีความเป็นพิษสูงขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น [39] การเกิด inflammatory cytokine storm เป็นภาวะของการอักเสบที่ไม่สามารถควบคุมได้ แล้วก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อร่างกายมีตั้งแต่อาการเบาจนถึงรุนแรง เช่น ไข้ ปวดหัว อาเจียน โลหิตจาง ตับม้ามโต ตับวาย ไตวาย เสียชีวิต เป็นต้น ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของไซโตไคน์ เช่น IL-1, IL-6, IL-18, IFN-g และ TNF-a [18, 38, 39] เป็นต้น ที่ถูกสร้างขึ้นมามากมายทำให้เกิดการตายของเซลล์อันเป็นผลจากการอักเสบ หรือเรียกว่า inflammatory cell death ซึ่งเซลล์จาก innate immune system เช่น macrophages dendritic cells เป็นต้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น เช่น เชื้อก่อโรค จะเกิดการสร้างไซโตไคน์เพื่อตอบสนองและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกนั้น แต่หากการสร้างไซโตไคน์เกิดการสูญเสียการควบคุมแล้ว อาจเกิดภาวะที่ไซโตไคน์นั้น โดยเฉพาะ IL-6, IFN-g และ TNF-a ย้อนกลับมากระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ดังกล่าวมากขึ้น ในลักษณะ positive feedback loop ในขณะที่การเกิด negative feedback ไม่สามารถเกิดขึ้นได้หรือเกิดขึ้นแต่ไม่เพียงพอในการควบคุมจึงสร้างไซโตไคน์ต่าง ๆ มากขึ้นเรื่อย ๆ จนเกิดภาวะ cytokine storm ไซโตไคน์เหล่านี้และอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นมามากมายจะทำให้เกิดการแตกของเซลล์โดยตรง ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะที่รุนแรงขึ้น [20-22, 40-42]



สารสกัดสามารถลดการแสดงออกของยีน COX-1 ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารที่ทดสอบ เนื่องจาก COX-1 เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเนื้อเยื่อทั่วร่างกายและมีบทบาทในการช่วยรักษาสมดุลการทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะ เช่น ช่วยปกป้องกระเพาะอาหารและลำไส้จากน้ำย่อย [43] ในขณะที่ COX-2 จะเป็นเอนไซม์ที่ต้องมีการกระตุ้นการสร้างจากสาร ชักนำการอักเสบ ซึ่งพบได้ในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบ [44] การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-1 นี้จะส่งผลให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นถูกทำลายได้ เช่น แผลในกระเพาะอาหารอันเป็นผลข้างเคียงของการใช้ยา กลุ่ม nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAID) ที่ยับยั้งการสร้าง COX-1 และ COX-2 อย่างไม่จำเพาะ ซึ่งการยับยั้ง COX-1 จะแสดงถึงความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร [45] ดังนั้นการที่สารสกัดจากหัวปลีพลึงเขายับยั้งการแสดงออกของยีน COX-1 นี้ อาจเป็นผลจากสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบและลดการสร้างเอนไซม์ COX-1 ได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการศึกษาค่าขององค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากหัวปลีพลึงเขา อาจเป็นไปได้ว่าแอลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดดังกล่าวเป็นสารที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบนี้ สอดคล้องกับ Mahomoodally และคณะ [15] ที่รายงานว่าพืชจีนัส *Crinum* มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์มากกว่า 118 ชนิด ที่แตกต่างกัน และมีความเป็นพิษโดยเฉพาะส่วนหัว แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการใช้พืชตระกูลนี้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรค เช่น ใช้ *C. asiaticum* L. ในการรักษาฝี พกข้าว อาการบวมแดง ใช้ กระดุกหัก อาการเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ไล่เลื้อน คางทูม โรคไขข้ออักเสบ ต่อมนทอนซิลอักเสบ ปัสสาวะลำบาก และอาเจียน [46] เป็นต้น และยังมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ด้านการอักเสบ [47] ฤทธิ์ด้านการปวด [48] เป็นต้น และแม้ว่าแอลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบอาจมีความเป็นพิษ แต่สารกลุ่มนี้ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นประโยชน์ เช่น ช่วยกระตุ้นให้น้ำหนักลดได้ มีฤทธิ์ระงับประสาท ฤทธิ์ด้านการปวด ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ [49, 50] เป็นต้น หากสามารถแยกสารสำคัญออกจากสารสกัดแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ได้ อาจทำให้พบสารที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ ในทำนองเดียวกันกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดหัวปลีพลึงเขามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของยีน iNOS ได้ดี โดยสัมพันธ์กับผลการศึกษาศักยภาพด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าไนตริกออกไซด์มีผลต่อไอโซฟอร์มของ COX ที่แตกต่างกัน โดยไนตริกออกไซด์จะกระตุ้นการทำงานของ COX-1 แต่ยับยั้งการทำงานของ COX-2 [51] ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากหัวปลีพลึงเขาที่ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของยีน iNOS ทำให้มีไนตริกออกไซด์น้อยลงทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน COX-1 ได้และส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน COX-2 เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของสารสกัดจากหัวปลีพลึงเขาเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจจะเป็นผลจากสารสำคัญชนิดอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบ จึงเป็นไปได้ว่าหัวปลีพลึงเขานี้จะมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นประโยชน์ ดังนั้นการแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์หรือแยกส่วนสกัดจะช่วยให้สามารถศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้อย่างชัดเจนมากขึ้นและทำให้สามารถแยกสารที่เป็นพิษออกไปได้

ผลจากการศึกษาครั้งนี้อาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า สารสกัดจากหัวปลีพลึงเขามีสารหลายกลุ่มที่องค์ประกอบทางพฤกษเคมีรวมทั้งสารกลุ่มแอลคาลอยด์ด้วย สารสกัดมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง และสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำมีฤทธิ์ในการเพิ่มการสร้างสาร ชักนำการอักเสบหลายชนิดซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ที่ทดสอบตายได้ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ดีและสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS ได้ดี ดังนั้นการศึกษาต่อไปควรมีการแยกสารบริสุทธิ์จากการสกัดดังกล่าวและศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและความเป็นพิษเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 งานประมาณด้านวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.) (เลขที่สัญญา ววน. 53/2565)



เอกสารอ้างอิง

1. ก่องกานดา ชยามฤต, นันทน์ภัส ภัทรหิรัญไตรสิน. ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้ 3. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2551.
2. Tanming W. *Crinum serrulatum* Baker (Amaryllidaceae), a new record for Thailand. ว. พฤษศาสตร์ไทย 2020;12(2):93-7.
3. ก่องกานดา ชยามฤต, ราชนย์ ภูมา, นันทน์ภัส ภัทรหิรัญไตรสิน. ทะเบียนรายชื่อพืชในประเทศไทย เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: เดอะ อินเทอร์เนต; 2557.
4. มานพ ผู้พัฒน์, ปรีชา การะเกตุ, ขวัญใจ คำมงคล, ศรีณย์ จิระกร. ป่าบุ่งป่าทาม ภาคอีสาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด; 2561.
5. พนม สุทธิศักดิ์โสภณ, จักรพงษ์ รัตตะมณี. ความหลากหลายของพืชพื้นล่างของป่าเต็งรังในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านพร้าว อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว. ว.มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 2562;11(22):104-18.
6. Fennell CW, Staden JV. *Crinum* species in traditional and modern medicine. J. Ethnopharmacology 2001; 78(1):15-26.
7. Araujo RL, Pinho CLC, Farias FO, Igarashi-Mafra L, Mafra MR. *Crinum* L. species as a potential source of alkaloids: Extraction methods and relevance for medicinal and pharmacological applications. S Afr J Bot 2022;151(2):720-34.
8. Udebunam S, Udegbonam R, Nnaji T, Anyanwu M, Kene R, Anika S. Antimicrobial and antioxidant effect of methanolic *Crinum jagus* bulb extract in wound healing. J Intercult Ethnopharmacol 2015;4(3):239-48.
9. Rahman MdA, Sharmin R, Uddin MdN, Rana MdS, Ahmed NU. Antibacterial, antioxidant and cytotoxic properties of *Crinum asiaticum* Bulb extract. Bangladesh J Microbiol 2011;28(1):1-5.
10. Salihu M, Batiha GES, Kasozi KI, Zouganelis GD, Sharkawi SMZ, Ahmed EI, et al. *Crinum jagus* (J. Thomps. Dandy): Antioxidant and protective properties as a medicinal plant on toluene-induced oxidative stress damages in liver and kidney of rats. Toxicol Rep 2022;9:699-712.
11. Kumar N, Mishra MK, Agrawal OP. In-vitro antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Crinum latifolium* using different method. IJHS 2022;6(S3):9475-81.
12. Doe P, Danquah CA, Ohemeng KA, Opare AE, Sharif A, Akua-Ahora D, et al. Analgesic, anti-inflammatory, and anti-pyretic activities of *Crinum pedunculatum* R.Br. bulb extracts. Pharmacogn Res 2021;14(1):24-9.
13. Rahman MdA, Sharmin R, Uddin MdN, Zaman MU, Rana S, Ahmed NU. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Crinum asiaticum* bulb extract. Asian J Pharm Clin Res 2011;4(3):34-7.
14. Ghane SG, Attar UA, Yadav PB, Lekhak MM. Antioxidant, anti-diabetic, acetylcholinesterase inhibitory potential and estimation of alkaloids (lycorine and galanthamine) from *Crinum* species: An important source of anticancer and anti-Alzheimer drug. Ind Crops Prod 2018;125:168-77.



15. Mahomoodally MF, Sadeer NB, Suroowan S, Jugreet S, Lobine D, Rengasamy KRR. Ethnomedicinal, phytochemistry, toxicity and pharmacological benefits of poison bulb – *Crinum asiaticum* L. S Afr J Bot 2021;136:16-29.
16. Refaat J, Kamel MS, Ramadan MA, Ali AA. *Crinum*; An endless source of bioactive principles: A review. Part V: biological profile. Int J Pharm Sci Res 2013;4(4):1239-52.
17. Kurek J. Alkaloids—Their Importance in Nature and Human Life. London: IntechOpen; 2019.
18. Sharma JN, Omran AA, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. Inflammopharmacology 2007;15(6):252-9.
19. Guzik TJ, Korbout R, Guzik TD. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation 2003;54(4):469-87.
20. Gupta KK, Khan MA, Singh SK. Constitutive inflammatory cytokine storm: A major threat to human health. J Interferon Cytokine Res 2020;40(1):19-23.
21. Karki R, Kanneganti TD. The ‘Cytokine Storm’: molecular mechanisms and therapeutic prospects. Trends Immunol 2021;42(8):681-705.
22. Chen P, Tang Y, He W, Yang R, Lan Z, Chen R, et al. Potential pathophysiological mechanisms underlying multiple organ dysfunction in cytokine release syndrome. Mediators Inflamm 2022;2022(1):1-17.
23. Yadav R, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. J Phytol 2011;3(12):10-4.
24. De S, Dey YN, Ghosh AK. Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorphaphallus paeoniifolius* (Araceae). Int J Pharm Biol Res 2010;1(5):150-7.
25. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, R-E C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999;26(9-10):1231-7.
26. Bor JY, Chen HY, Yen GC. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. J Agric Food Chem 2006;54(5):1680-6.
27. Dordevic TM, Marinkovic SSS, Brankovic SID. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. Food Chem 2010;119(3):957-63.
28. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65(1-2):55-63.
29. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. Sensors 2003;3(8):276-84.
30. Rahmati-Yamchi M, Ghareghomi S, Haddadchi G, Milani M, Aghazadeh M, Daroushnejad H. Fenugreek extract diosgenin and pure diosgenin inhibit the hTERT gene expression in A549 lung cancer cell line. Mol Biol Rep 2014;41(9):6247-52.

31. Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW. et al. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. Br J Pharmacol 2006;148(2):216-25.
32. Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. J Med Microbiol 2003;52(Pt 1):29-34.
33. Abubakar UD, Wakili FT. Phytochemical screening and elemental analysis of the *Crinum jagus* Bulb. J Chem Soc Nigeria 2017;42(2):53-5.
34. Diego V, Santiago P, Gisela P, Marlene G, Karen A, Susana A. In-vitro anti-inflammatory and cytotoxicity of *Crinum xamabile* grown in ecuador. Asian J Pharm Clin Res 2018;11(10):99-103.
35. Daben JM, Dashak DA, Lohdip AM. Quantitative evaluation of alkaloids, flavonoids, saponins, steroids and tannins contents from the successive solvent extracts of *Crinum zeylanicum* Bulb. J Chem Soc Nigeria 2021;46(5):0879-86.
36. บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2556;21(3):275-86.
37. สุชาติ มานอก, ปวีณา ลิ้มเจริญ. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรายาหอมเทพจิตร. วารสารก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ 2558;15(1):106-17.
38. ลือชัย บุตุคุป. สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2555;(31):443-55.
39. Zielinska S, Czerwinska ME, Dziagwa-Becker M, Drys A, Kucharski M, Jezierska-Domaradzka A. et al. Modulatory effect of *Chelidonium majus* extract and its alkaloids on LPS-stimulated cytokine secretion in human neutrophils. Molecules 2020;25(4):842.
40. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. Immunol Rev 2017;277(1):61-75.
41. Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. Chest 2000;118(2):503-8.
42. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P. et al. Synergism of TNF-a and IFN-g triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. Cell 2020;184(1):149-68.
43. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998;38:97-120.
44. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(25):12013-7.



45. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full *in vitro* analysis. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(13):7563-8.
46. Haque M, Jahan S, Rahmatullah M. Ethnomedicinal uses of *Crinum asiaticum*: a review. *World J Pharm Pharm Sci* 2014;3(9):119-28.
47. Samud AM, Asmawi MZ, Sharma JN, Yusof APM. Anti-inflammatory activity of *Crinum asiaticum* plant and its effect on bradykinin-induced contractions on isolated uterus. *Immunopharmacology* 1999;43(2):311-6.
48. Asmawi MZ, Arafat OM, Amirin S, Eldeen IM. *In vivo* antinociceptive activity of leaf extract of *Crinum asiaticum* and phytochemical analysis of the bioactive fractions. *Int J Pharmacol* 2011;7:125-9.
49. Jeong YJ, Sohn EH, Jung YH, Yoon WJ, Cho YM, Kim I. et al. Anti-obesity effect of *Crinum asiaticum* var. japonicum Baker extract in high fat diet-induced and monogenic obese mice. *Biomed Pharmacother* 2016;82:35-43.
50. Ratnasooriya WD, Deraniyagala SA, Bathige S, Hettiarachchi H. Leaf extract of *Crinum bulbispermum* has antinociceptive activity in rats. *J Ethnopharmacol* 2005;97(1):123-8.
51. Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol* 2000;165(3):1582-7.