นิพนธ์ต้นฉบับ • Original Article

การตรวจกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำลึงและบัวบก

พวงรัตน์ ภักดีโชติ[1], ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์[1], วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์[2]
[1]*ภาควิชาสรีรวิทยา,* [2]*ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002*

Screening for Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *Coccinia grandis* and *Centella asiatica.*

Poungrat Pakdeechote[1], Upa Kukongviriyapan[1], Veerapol Kukongviriyapan[2]
[1]*Department of Physiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002*
[2]*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002*

หลักการและเหตุผล: ตำลึงและบัวบกเป็นผักพื้นบ้านและมีสรรพคุณในตำรับยาไทยแผนโบราณเป็นยารักษาโรคหลายชนิด ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดแต่อาจจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์: เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผักตำลึงและบัวบก

วิธีการ: การตรวจหาฤทธิ์เข้าทำลายอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), การวัดปริมาณค่าต้านออกซิเดชันรวมโดยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และการกำจัดสารอนุมูลอิสระที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจโดยวิธี dichlorofluorescein (DCF)

ผลการศึกษา: สารสกัดตำลึงและบัวบกมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยค่า EC50 เท่ากับ 164.78 ± 5.63 และ 172.33 ± 9.13 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ โดยมีฤทธิ์น้อยกว่าวิตามินซีและ trolox ประมาณ 100 เท่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรวมของสารสกัดตำลึงหนัก 1 มก. มีค่าเท่ากับวิตามินซี 8.23 ± 0.64 ไมโครกรัม, $FeCl_2$ 11.9 ± 2.3 ไมโครกรัม และสารสกัดบัวบก 1 มก. มีฤทธิ์เท่ากับวิตามินซี 8.01 ± 1.57 ไมโครกรัม, $FeCl_2$ 11.4 ± 0.92 ไมโครกรัม นอกจากนี้สารสกัดตำลึงและบัวบกความเข้มข้น 100, 300 ไมโครกรัม/มล. และ tiron 10, 30 ไมโครกรัม/มล สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในเซลล์ แมกโครเฟจ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สรุป: ผลการศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้ว่าสารสกัดตำลึงและบัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างน้อยในแง่ของการเป็นสารรีดิวซ์ในหลอดทดลองแต่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในแบบจำลองของการกระตุ้นเซลล์ แมกโครเฟจ เป็นส่วนที่น่าสนใจและศึกษาต่อไป

Background: *Coccinia grandis* and *Centella asiatica* are tropical vegetables and acclaimed in Thai folk medicine for treatment of various diseases. The mechanisms responsible for their pharmacological effects remain uncertain. The antioxidant activities are proposed to play role in the mechanism of action.

Objectives: To investigate the antioxidant activities of *C.grandis* and *C.asiatica.*

Method: Free radical scavenging activity was assessed by 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Total antioxidant capacity was measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Intracellular oxygen radicals scavenging effect in rats peritoneal macrophages was evaluated by using fluorescent dichlorofluorescein probe.

Results: *C. grandis* and *C. asiatica* extracts showed ability to scavenge DPPH radical with EC50 values of 164.78 ± 5.63 and 172.33 ± 9.13 μg/ml, respectively. It appeared that their potency were about 100 folds less than that of ascorbic acid and trolox. Total antioxidant power of extracts, as assayed by FRAP method revealed that 1 mg of *C. grandis* extract had reducing power comparable to ascorbic acid 8.23 ± 0.64 μg or $FeCl_2$ 11.09 ± 2.3 μg, while that of *C. asiatica* extract was equivalent to ascorbic acid 8.01 ± 1.57 μg or $FeCl_2$ 11.4 ± 0.92 μg. In addition, both plant extracts at the concentration of 100, 300 μg/ml and tiron 10, 30 μg/ml significantly decreased the formation of oxygen radicals generated in rat peritoneal macrophages.

Conclusions: Although both extracts had relatively low reducing power in these in vitro assays, however, their antioxidant effects as shown in peritoneal macrophages may be of significance and worthwhile for further investigation.

ศรีนครินทร์เวชสาร 2546; 18(2), 78-84 • Srinagarind Med J 2003; 18(2), 78-84

บทนำ

สารอนุมูลอิสระมีบทบาทมากมายในเซลล์ ทั้งในภาวะร่างกายปกติ และในภาวะที่เกิดพยาธิสภาพขึ้น และสัณนิษฐานว่าสารอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นกลไกของการเกิดโรคที่สำคัญกลไกหนึ่งของโรคต่างๆ เช่น การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ การเกิดมะเร็ง การเกิดโรคภาวะเสื่อมต่างๆ และแม้แต่กระบวนการเข้าสู่ภาวะชราภาพ[1] แม้ร่างกายจะมีระบบป้องกันตนเองจากฤทธิ์ของอนุมูลอิสระเหล่านี้[2] โดยใช้เอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และสารจำพวก endogenous chelators ต่างๆ คือ uric acid, bilirubin, transferin เป็นต้น แต่ทว่าร่างกายก็ยังจำเป็นต้องได้รับสารที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidants) นี้จากภายนอกด้วย ปกติแล้วพืชผักต่างๆ จะมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์จำนวนมาก ในรูปของวิตามิน เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี และสาร polyphenol, flavonoid หรือ anthrocyanide โดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้จะแตกต่างกัน เช่น การเข้าไปกำจัดสารอนุมูลอิสระโดยตรงการกำจัดธาตุโลหะ หมู่ทรานซิชัน (transition metals) ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่รุนแรง เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) หรือกระตุ้นเอนไซม์ต้านออกซิเดชันให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้[3-4] ดังนั้นการบริโภคผักต่าง ๆ จึงมีประโยชน์ทั้งในด้านโภชนาการ การรักษาและการป้องกันโรค รวมทั้งการชะลอหรือการยับยั้งภาวะเสื่อมต่างๆ ของร่างกาย

ตำลึง (*Coccinia grandis* Voigt) พืชสมุนไพรวงศ์ Cucurbitaceae มีสรรพคุณเป็นยาพื้นบ้าน เช่นใช้รากต้มน้ำดื่มเป็นยาระบาย ฝนทาภายนอกแก้พิษ แก้อักเสบ ฝีต่างๆ แก้ปวดบวม ใบมีรสเย็น ดับพิษร้อน ถอนพิษ แก้อาการคันเจ็บตา ตาแดง ตำรายาไทยใช้ทั้งใบ ราก เถา ผล ยอด แก้ไข้ รักษาโรคผิวหนัง รักษาการอักเสบของหลอดลม แก้เบาหวาน[5-7] ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีการทำวิจัยคือฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบตำลึงทั้งในสัตว์ทดลองและในคน และคาดว่ามีกลไกการออกฤทธิ์โดยเพิ่มการคัดหลั่งอินซูลิน[8]

บัวบก (*Centellla asiatica* (L.) Urban.) พืชสมุนไพรวงศ์ Umbelliferae มีสรรพคุณโดยใช้ใบสดต้มน้ำรักษาอาการร้อนในแก้ช้ำใน กระหายน้ำ และโรคปากเปื่อย ใช้ทาภายนอกเพื่อรักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ช่วยให้แผลหายเร็ว และช่วยขับปัสสาวะ[9-10] สำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดบัวบกพบว่ามีฤทธิ์ในการสมานแผลทำให้แผลหายเร็ว และขนาดของแผลลดลง[11] มีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้[12-13] มีรายงานว่าสารสกัดจากบัวบกมีผลเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองโดยมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชันโดยพบว่าระดับของ malondialdehyde (MDA) ในสมองของสัตว์ทดลองลดลง ระดับของ GSH และเอนไซม์ catalase ในสมองเพิ่มขึ้น[14] และนอกจากนี้บัวบกยังสามารถลดความดันเลือดในหนูขาวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูงได้อีกด้วย[15]

แม้จะมีการศึกษาวิจัยถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั้งตำลึงและบัวบกว่าเป็นยาต่างๆ หลายประการ แต่ฤทธิ์ในแง่การต่อต้านภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ของเซลล์ในร่างกายนั้นยังมีข้อมูลน้อยมาก กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ในด้านนี้ และหากพบว่าพืชผักทั้งสองมีฤทธิ์ทางด้านนี้ ก็จะสามารถนำไปสู่การใช้ให้เกิดประโยชน์ในแง่ของการป้องกัน และการรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับภาวะเซลล์ร่างกายเกิดการบาดเจ็บต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเตรียมสารสกัดตำลึงและบัวบก

นำต้นตำลึงและบัวบกมาล้างน้ำ ผึ่งให้แห้งสนิทในที่ร่ม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และบดให้เป็นผง ได้ตำลึง 350 กรัม บัวบก 150 กรัม แช่ผงตำลึงและบัวบกใน 95% ethanol ให้ท่วม ทิ้งไว้ 3 วัน แล้วนำมากรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว นำน้ำสกัดที่กรองได้ไประเหยเอา ethanol ออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 60°C ความดัน 600 มม.ปรอท จนกระทั่ง ethanol ระเหยหมด นำส่วนที่เหลือคือสารสกัดหยาบไปทำการแช่แข็งแล้วระเหยแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer จะได้

สารสกัดตำลึงหนัก 12.16 กรัม และบัวบกหนัก 12.20 กรัม

การทดสอบฤทธิ์กำจัดสารอนุมูลอิสระ: การศึกษาใช้วิธีทดสอบฤทธิ์กำจัด DPPH[16-17]

นำสารสกัดตำลึงและบัวบกละลายใน ethanol (20-2000 ไมโครกรัม/มล.) มาทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka AG. Germany) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครโมล จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่สมุนไพร โดยมี trolox และวิตามินซีเป็นสารต้านออกซิเดชันอ้างอิง ถ้าหากสารที่ทดสอบมีฤทธิ์กำจัด DPPH ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะลดลง โดยผลการทดลองทั้งหมดจะนำมาคำนวณหาค่า mean effective concentration (EC50) โดยใช้ non-linear regression จากโปรแกรม Sigma plot

การหาค่าความสามารถการยับยั้งของสารต้านออกซิเดชันรวม: การศึกษาใช้วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)[18]

นำสารสกัดตำลึงและบัวบกความเข้มข้นสุทธิ 10-300 ไมโครกรัม/มล. มาทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent (acetate buffer 300 มิลลิโมล : 2, 4, 6 - tripyridyl-s-triazine 10 มิลลิโมล : $FeCL_3$ 20 มิลลิโมล = 10 : 1 : 1) เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปวัดค่า อัตราการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยมี ascorbic acid และ $FeCl_2$ เป็นสารต้านออกซิเดชันอ้างอิง ถ้าหากสารทดสอบมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะเพิ่มขึ้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันภายในเซลล์แมกโครเฟจ[19-20]

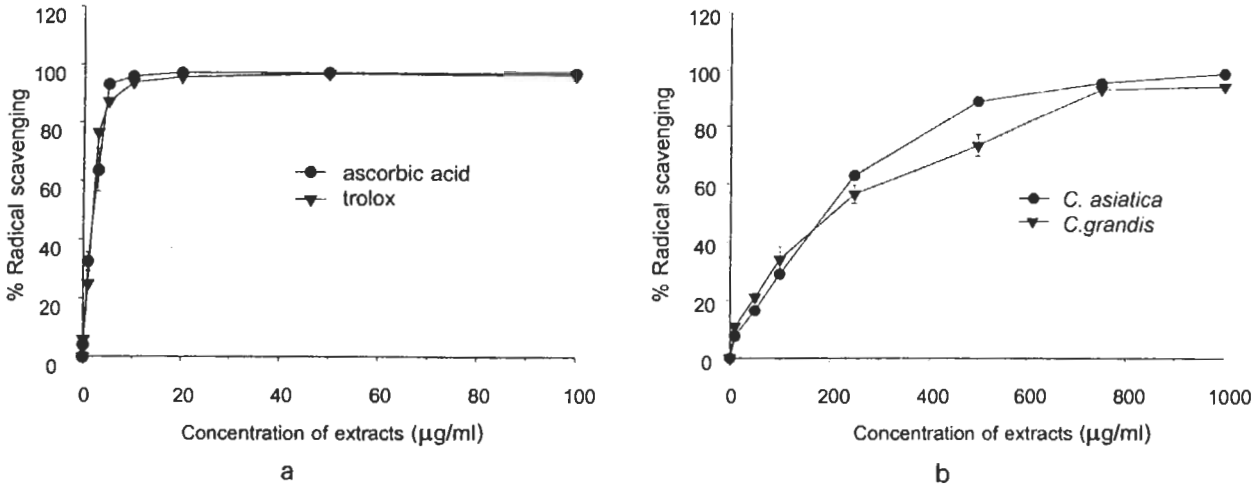
การทดลองใช้หนูขาวทดลองพันธุ์ Sprague Dawley น้ำหนัก 250 กรัม หลังจากสลบหนูทดลองด้วยการฉีด pentobarbital sodium ขนาด 60 มก./กก. เข้าทางกล้ามเนื้อแล้วทำการแยกเซลล์แมกโครเฟจจากช่องท้องหนูทดลอง นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ทำการนับจำนวนเซลล์และคำนวณร้อยละของเซลล์แมกโครเฟจที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะต้องมากกว่า 90% จึงจะนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อๆ ไป โดยนำเซลล์แมกโครเฟจความเข้มข้น $2x10^6$ เซลล์/มล. เติม catalase (20 unit/μl), dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (47.8 μM), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (3.4 μM) ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นให้เซลล์แมกโครเฟจสร้างสารอนุมูลอิสระ และสารสกัดตำลึง และสารสกัดบัวบกความเข้มข้นสุทธิ 10, 100 และ 300 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ สำหรับเซลล์ในกลุ่ม positive control จะเติมสารละลายทุกอย่างเหมือนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแต่เติมสาร tiron ซึ่งเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระที่สามารถเข้าเซลล์ได้และออกฤทธิ์ได้คล้ายกับ superoxide dismutase แทน โดยมีความเข้มข้นสุทธิ 1, 10 และ 30 ไมโครกรัม/มล. จากนั้นทำการ incubate ใน shaking water bath อุณหภูมิ 37°C นาน 70 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสง fluorescence ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer (Model 650-40 Hitachi, Japan) ที่ความยาวคลื่น excitation 485 nm และ emission 514 nm หากสารทดสอบมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้จริงค่าการดูดกลืนแสง ที่วัดได้จะลดลง ในขั้นตอนสุดท้ายของการทดลองนำสารละลายแต่ละกลุ่มการทดลองมาหาร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์แมกโครเฟจ

ผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำลึงและบัวบกกับ DPPH พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระเพิ่มตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำปฏิกิริยาและมีค่า EC50 ใกล้เคียงกัน ส่วนค่า EC50 ของวิตามินซีกับ trolox จะมีค่าน้อยกว่าประมาณ 100 เท่าแสดงว่าสารสกัดมี potency ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระน้อยกว่า positive control ประมาณ 100 เท่า (รูปที่ 1 และตารางที่ 1)

ในการทดสอบฤทธิ์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดตำลึงและบัวบกโดยวิธีการ FRAP assay พบว่าสารสกัดตำลึง 1 มิลลิกรัม มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับวิตามินซี 8.23 ± 0.64 ไมโครกรัม และสารสกัดบัวบก 1 มิลลิกรัม มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับวิตามินซี 8.01 ± 1.57 ไมโครกรัม ในทำนองเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับ $FeCl_2$ ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันตัวหนึ่งพบว่าสารสกัดตำลึง 1 มิลลิกรัมมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ $FeCl_2$ 11.09 ± 2.3 ไมโครกรัม และสารสกัดบัวบก 1 มิลลิกรัมมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ $FeCl_2$ 11.4 ± 0.92 ไมโครกรัม

ผลของสารสกัดตำลึงและบัวบกต่อสารอนุมูลอิสระที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจจากช่องท้องของหนูทดลอง พบว่า PMA (0.65 μM) สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมกโครเฟจ สร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นได้ และสารสกัดจากตำลึงขนาด 100 และ 300 ไมโครกรัม/มล. สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์แมกโครเฟจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 2 ในทำนองเดียวกันเมื่อให้สารสกัดบัวบกความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครกรัม/มล. ก็สามารถกำจัด

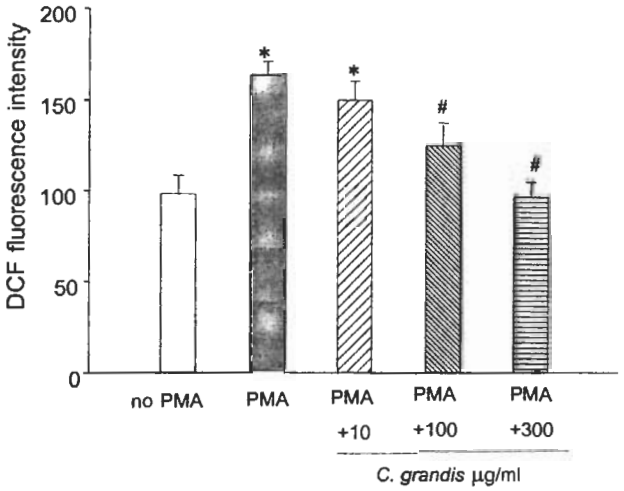


รูปที่ 1 ความสามารถของ วิตามินซีและ trolox (a) สารสกัดตำลึงและบัวบก (b) ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH

ตารางที่ 1 แสดงค่า EC50 ของสารต่างๆ เมื่อทำปฏิกิริยากับ DPPH

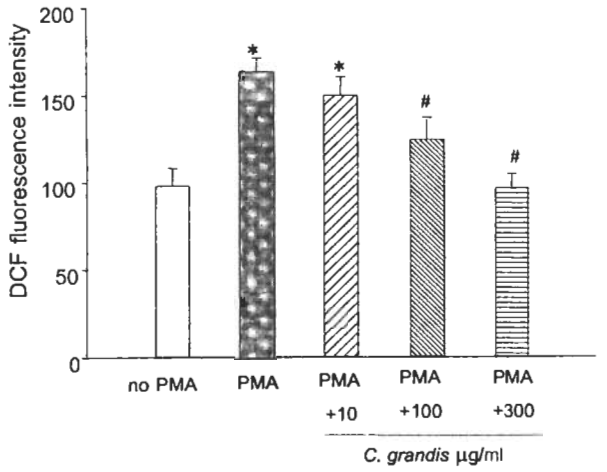
กลุ่มทดลอง	EC50 (ไมโครกรัม/มล.)
ตำลึง	164.78 ± 5.63
บัวบก	172.33 ± 9.13
วิตามินซี	1.71 ± 0.19
Trolox	1.63 ± 0.02

สารอนุมูลอิสระภายในเซลล์แมกโครเฟจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้เช่นกัน ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 3 สำหรับ tiron ซึ่งเป็นกลุ่ม positive control นั้นพบว่าที่ความเข้มข้น 10 และ 30 ไมโครกรัม/มล. จะสามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์แมกโครเฟจได้ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4 และเมื่อนำค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากเซลล์แมกโครเฟจในภาวะที่มี PMA และในภาวะที่มีสารสกัดตำลึงและบัวบกในความเข้มข้นต่างๆ มาคำนวณร้อยละของความสามารถของสารที่ใช้ทดสอบในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ โดยใช้เซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA เป็นกลุ่มเซลล์ปกติซึ่งใช้เป็นฐานในการคำนวณ พบว่าสารสกัดตำลึงและบัวบกมีร้อยละในการกำจัดสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลาย ดังแสดงในรูปที่ 5 และแม้ว่าที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มล. สารสกัดทั้งสองชนิดจะมีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระสูงกว่า 100 เปอร์เซนต์เล็กน้อยก็ตามแต่เมื่อทำการทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกับค่าที่วัดได้จากกลุ่มเซลล์ปกติ

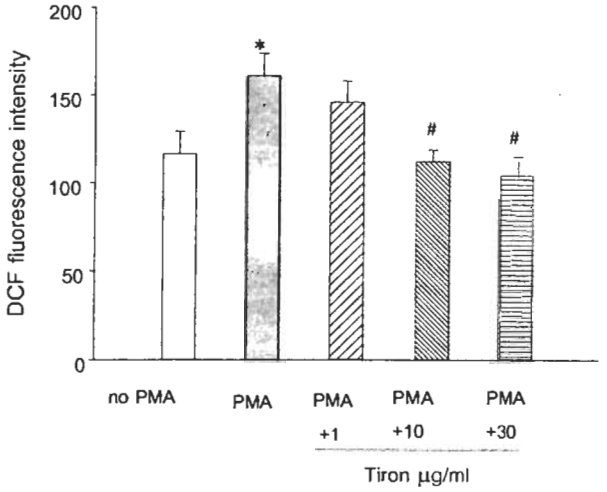


รูปที่ 2 ค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจ ในภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA และเมื่อเติมสารสกัดตำลึงความเข้มข้นสุทธิ 10, 100 และ 300 ไมโครกรัม/มล. * เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ($P < 0.05$) # เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ($P < 0.05$)

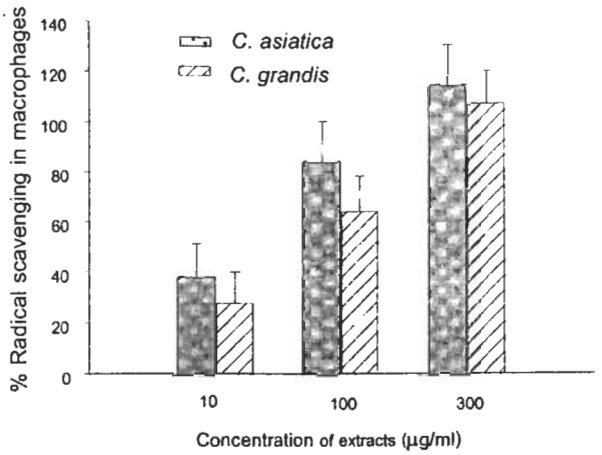
นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดตำลึงและบัวบกไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมกโครเฟจ โดยพบว่าร้อยละของเซลล์ แมกโครเฟจที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด และในกลุ่มที่มีสารสกัดตำลึง, บัวบก, tiron นั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน คือ 92.67 ± 1.78, 94.9 ± 2.5, 90.26 ± 3.37, 92.5 ± 3.04 ตามลำดับ



รูปที่ 3 ค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจในภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA และเมื่อเติมสารสกัดบัวบกความเข้มข้นสุทธิ 10, 100 และ 300 ไมโครกรัม/มล. * เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA (P< 0.05), # เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA (P< 0.05)



รูปที่ 4 ค่าความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจในภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA และเมื่อเติมสาร tiron ความเข้มข้นสุทธิ 1, 10 และ 30 ไมโครกรัม/มล. * เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA (P< 0.05), # เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA (P< 0.05)



รูปที่ 5 ร้อยละของความสามารถของสารสกัดตำลึงและบัวบกในการกำจัดสารอนุมูลอิสระที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นภายในเซลล์ แมกโครเฟจด้วยสาร PMA

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่ได้ตรวจกรองฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดตำลึงและบัวบกในแบบจำลองต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยจะเห็นว่าสารสกัดทั้งสองชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระแต่มีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซี ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็น scavenging antioxidant[20] และ trolox ซึ่งเป็นรูปหนึ่งของวิตามินอีที่สังเคราะห์ขึ้นและสามารถละลายน้ำได้และมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ไม่ต่างกับ α-tocopherol[21] และมีรายงานว่าสารสกัดบัวบกสามารถเพิ่มความจำในหนูทดลองโดยมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยพบว่าระดับของสาร malondialdehyde (MDA) ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะ lipid peroxidation ในสมองของหนูทดลองกลุ่มนี้ลดลง[22]

สำหรับบัวบกนั้นเป็นผักใบเขียวที่ได้รับการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในด้านต่างๆ โดยเฉพาะในเรื่องการหายของแผลโดยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของบัวบกดังที่พบในการทดลองครั้งนี้อาจสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในกระบวนการหายของแผลโดยทำให้แผลหายเร็วขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารต้านออกซิเดชันลดการอักเสบและช่วยส่งเสริมการหายของแผล[23] นอกจากนี้สารต้านออกซิเดชันในสารสกัดบัวบกยังสามารถยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารเนื่องจากการชักนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย

ethanol ได้ด้วย[24] จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัดบัวบกมีสาร asiaticoside ซึ่งเป็นตัวชักนำให้ระดับของสารต้านออกซิเดชันในแผลเพิ่มขึ้น และส่งผลทำให้แผลหายเร็ว[25] และเช่นเดียวกันสารสกัดจากตำลึงในการทดลองครั้งนี้ก็พบว่ามีความสามารถเป็นสารต้านออกซิเดชันในระดับที่ใกล้เคียงกับบัวบก โดยฤทธิ์ต้านกระบวนการออกซิเดชันนี้ก็อาจสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผลดังที่มีการใช้ตำลึงในการรักษาการอักเสบของฝี[5-7]

สำหรับการทดลองในแบบจำลองของเซลล์อิสระโดยการใช้เซลล์แมกโครเฟจ ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA เพื่อให้มีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจ[26] ซึ่งตัวที่สำคัญคือ H_2O_2[27-28] ในการทดลองครั้งนี้สารสกัดตำลึงและบัวบกที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครกรัม/มล. มีผลลดปริมาณ ROS ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจได้ โดยทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ลดลง[19] แสดงว่าสารสกัดทั้งสองชนิดน่าจะมีขนาดโมเลกุลที่เล็กเพียงพอที่สามารถจะเข้าไปออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แมกโครเฟจที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ได้ การทดลองในรูปแบบนี้บ่งชี้ได้ว่าสารสกัดทั้งสองชนิดสามารถออกฤทธิ์ในเซลล์ร่างกายได้

โดยสรุปผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันซึ่งมีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันอ้างอิงที่นิยมใช้ในปัจจุบัน โดยฤทธิ์ต้านกระบวนการออกซิเดชันของสารเหล่านี้อาจจะสัมพันธ์กับกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากตำลึงและบัวบก และที่น่าสนใจคือสารสกัดทั้งสองสามารถออกฤทธิ์ภายในเซลล์ได้ดีกว่าการทดลองในหลอดทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ขอขอบคุณหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ช่วยเหลืองานด้านสัตว์ทดลอง และขอขอบคุณ คุณรพีพร พรหมเกตุ ที่ได้ช่วยเหลืองานด้านการเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

บรรณานุกรม

1. Gutteridge JMC, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in ageing and disease: fact or fantacy. In: Gutteridge JMC, Halliwell B, eds. Antioxidants in nutrition, health and disease. New York: Oxford University Press, 1994; 111-35.
2. Inoue M. Protective mechanism against reactive oxygen species. In: Arias IM, ed. The liver: biology and pathobiology. 3rd ed. New York: Reven Press, 1994; 443-5.
3. มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ และคณะ. ผักพื้นบ้าน: ความหมายและภูมิปัญญาของสามัญชนไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก, 2538.
4. Zielinski H, Kozlowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. J Argic Food Chem 1992; 48: 2008-16.
5. Yu L. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. J Argic Food Chem 2001; 49: 3452-6.
6. วงศ์สถิตย์ ฉั่วสกุล และคณะ. สยามไภษชัยพฤกษ์: ภูมิปัญญาของชาติ. กรุงเทพฯ: บริษัทอัมรินทร์ พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด, 2538: 236.
7. พร้อมจิต ศรลัมพ์ และคณะ. สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ. กรุงเทพฯ: บริษัทอมรินทร์ พริ้นติ้ง กรุ๊พ จำกัด, 2535.
8. Platel K, Srinivasan K. Plant Foods in the management of diabetes millitus: vetgetables as potential hypoglycaemic agents. Nahrung1997; 41: 68-74.
9. พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. คู่มือการใช้สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: เมดิคัลมีเดีย, 2534: 152.
10. ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์. เอกลักษณ์สมุนไพร. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2538: 48-52.
11. Poizot A, Domez D. Modification of healing after iterative exeresis in the rat. Action of triterpenoid and its derivatives on the duration of healing. C R Hebd Seances Acad Sci Ser D 1978; 286(10): 789-92.
12. นันทวัน บุณยประภัศร. ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 1. กรุงเทพฯ: ธรรกมลการพิมพ์, 2532: 153-7.
13. Chatter TK, Chakraborty A, Pathak M, Sengupta GC. Effect of plant extract *Centella asiatica* (Linn.) on cold restraint stress ulcer in rat. Indian J Exp Biol 1992; 30(10): 889-91.
14. Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. J Ethno 2002; 79: 253-60.
15. Kukongviriyapan U, Laeudnakrob N, Kukongviriyapan V, Kanokmedhakul S. Antihypertensive effect of compounds from *Centella Asiatica* (L.) Urban. in renovascular hypertensive rats. Thai J Physiol Sci 1998; 11 (1): 70.
16. Blios MS. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature 1958; 181: 1199-200.
17. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of the free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol 1995; 28: 25-30.
18. Benzie IFF, Strain JJ. Oxidants and antioxidants Part A. In: Packer L, Diego S, eds. Methods in enzymology vol 299. San Diego: Academic Press, 1999; 15-27.

19. Fushiya S, Kishi Y, Hattori K, Batkhuu J, Takano F, Singab A.N.B, et al. Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages in vitro. Planta Medica 1999; 65: 404-7.
20. Vowells SJ, Sekhsaris S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. J of Immunol Methods 1995; 178: 89-97.
21. Maxwell SRJ. Review article: Prospects for the use of antioxidant therapies. Drugs 1995; 49: 345-61.
22. Choi H-S, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-Diphenyl-2-picryhydrazyl. J Argic Food Chem 2000; 48: 4156-61.
23. Mensah AY, Sampson J, Houghhton PJ. Effect of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. J Ethno 2001; 77: 219-26.
24. Cheng CL, Koo MW. Effects of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesion in rats. Life Sci 2000; 13; 67(21): 2647-53.
25. Shukla A, Rasik Am, Dhawan BN. Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. Phytother Res 1999; 13(1): 50-4.
26. Williams KM, Day RO, Breit SN. Biochemical actions and clinical pharmacology of anti-inflammation drugs. Adv Drus res 1993; 24: 123-98.
27. Shen H, Wiederhold MD, Ou DW. The suppression of macrophage secretion by calcium blockers and adenosine. Immunopharmacol Immunotoxicol 1995; 17(2): 301-9.
28. Weinberg JB, Misukonis MA. Phorbol diester-induced H_2O_2 production by peritoneal macrophages: Different H_2O_2 production by macrophages from normal and BCG-infected mice despite comparable phorbal diester recepters. Cell Immunol 1983; 80(2): 405-15.