อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2554B057

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว ต่อการสร้างสารไซโตคายด์ ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยแอลกอฮอล์

Effects of *Vernonia cinerea* Less extracts on cytokine productions in alcohol-induced hepatic cells

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 2 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 18762992
เลขเรียกหนังสือ ว RM 666 .H83 ก121ร 2557

คณะผู้วิจัย สังกัด
ผศ.ดร. สกลวรรณ ประพฤติบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่เกี่ยวข้องในโครงการวิจัยนี้จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และหน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินการไปได้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2554

บทคัดย่อ

โรคตับจากแอลกอฮอล์เป็นหนึ่งในโรคลำดับต้นของการเสียชีวิตประชากรไทย มีสาเหตุจากการได้รับแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงและต่อเนื่อง พยาธิสภาพของโรคมีความซับซ้อน เซลล์ตับสามารถถูกทำลายได้โดยตรงจากสารพิษที่เกิดในกระบวนการเปลี่ยนแปลงเอทานอลภายในตับ และการตอบสนองของกระบวนอักเสบ มีการสร้างสารก่อการอักเสบและไซโตคายด์ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) และ interleukin-1 (IL-1) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ส่งผลทำให้เกิดการอักเสบที่เรื้อรัง โดยเฉพาะ TNF-α มีความสำคัญและสัมพันธ์กับการทำลายเซลล์ตับ ในปัจจุบันไม่มียาที่ใช้ในการรักษาโรคตับจากแอลกอฮอล์ การรักษาโรคมีเพียงชะลอความรุนแรงของโรค หญ้าดอกขาว หรือ *Vernonia cinerea* (VE) Less. เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ และมีการนำหญ้าดอกขาวผงแห้งมาใช้ทางคลินิกในรูปแบบชาชงสำหรับการเลิกบุหรี่ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำต่อการสร้างไซโตคายด์ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล โดยใช้เซลล์ตับมนุษย์ HepG2 กระตุ้นด้วยเอทานอลด้วยที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน การทดสอบความเป็นพิษของเอทานอลต่อเซลล์ตับโดยตรงใช้การวัดร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability, MTT assay) พบว่าจำนวนเซลล์ตับที่ถูกทำลายด้วยเอทานอลแปรผันตรงต่อความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับเอทานอล (dose and time dependent responses) การทดสอบการกระตุ้นการสร้างไซโตคายในเซลล์ตับด้วยเอทานอล ใช้การวัดด้วยวิธี enzyme linked immunoassay (ELISA) เซลล์ตับ HepG2 สามารถถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลและสร้าง TNF-α ได้แบบแปรผันต่อความเข้มข้น อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าเซลล์ HepG2 ไม่มีการสร้าง IL-1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อเซลล์ตับพบว่า สารสกัดไม่มีพิษต่อเซลล์ตับ เมื่อทดสอบฤทธิ์สารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ (125, 250, 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ต่อการสร้าง TNF-α ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5.0 และ 7.5 % ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดการสร้าง TNF-α ได้ และที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการสร้าง TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการสร้างสารไซโตคายด์ TNF-α ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล หญ้าดอกขาวจึงเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นสารปกป้องตับ

Abstract

Alcoholic liver disease (ALD) is one prominent cause of mortality in Thai population. ALD is resulted from excessive and chronic alcohol consumption. The pathological progresses of ALD are complex. Hepatic cells could be damages directly from toxic metabolites of alcohol metabolism within the cells and inflammatory response, including productions of proinflammatory mediators and cytokines. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin-1 (IL-1) are two major cytokines involved in chronic inflammation. Especially, TNF-α is shown to be linked to liver injury. Nowadays, there is no drug proved to cure ALD and one effective option is to delay or prevent the disease progression. *Vernonia cinerea* (VE) Less is a herbal that possess anti-inflammatory properties. Dried powered VE has been used as drinking tea clinically for smoking cessation. This study aims to investigate the effect of VE water extract on cytokine productions in ethanol induced hepatic cells. The human hepatic cell lines, HepG2 were stimulated with various concentrations and time periods of ethanol. Direct toxic effect of ethanol to HepG cells was showed as the percentages of cell viability (% cell viability, MTT assay). The ethanol caused the hepatic cell damages in a dose and time dependent responses. Cytokine productions from HepG2 cells were determined with the enzyme linked immunoassay (ELISA). HepG2 cells treated with various concentration of ethanol produced TNF-α in a dose dependent manner. However, HepG2 cells in this study were not be able to produce IL-1 in normal and ethanol treated conditions. VE extract did not have toxic effect on the hepatic cells. The different concentrations of VE (125, 250, 500 microgram/milliliter) co-incubated with 5.0 or 7.5 % v/v ethanol stimulated showed that VE extracts at 250 and 500 microgram/milliliter attenuated TNF-α productions from the ethanol induced cells significantly. This study has confirmed the anti-inflammatory effect of VE extract by reducing cytokine TNF-α productions in ethanol stimulated hepatic cells. Therefore VE is one potential local herbal to develop as an hepatoprotective agent.

Exclusive summary

โรคโรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease, ALD) เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรไทยและมีแนวโน้มของอุบัติการณ์เพิ่มขึ้น โรคตับจากแอล์กอฮอล์เกิดจากการได้รับแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มสุราในปริมาณสูงอย่างต่อเนื่อง โรคตับจากแอลกอฮอล์กมีการดำเนินของโรคทางพยาธิสภาพที่หลากหลาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพชนิดต่างๆตามมา ได้แก่ ไขมันเกาะตับ (fatty liver), ตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis), ตับแข็ง (hepatic cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatic cancer) โรคตับจากแอล์กอฮอล์เป็นหนึ่งในโรคที่ยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษาให้หายขาดทางคลินิก การรักษาหลักคือ การลดปัจจัยเสี่ยงโดยงดดื่มแอล์กอฮอล์ การให้โภชนาการที่เหมาะสม การให้ยาหรือสมุนไพรช่วยชะลอความรุนแรงของโรคตามอาการ และ การเปลี่ยนปลูกถ่ายตับในผู้ป่วยที่เกิดภาวะตับล้มเหลว ในปัจจุบันจึงยังคงมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหายาหรือพืชสมุนไพรเพื่อพัฒนาเป็นสารปกป้อง (hepatoprotective agent) สำหรับผู้ป่วยโรคตับจากแอล์กอฮอล์ต่อไป

ผลของเอทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพโรคในร่างกายมีความซับซ้อนและมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องหลากหลาย พิษโดยตรงของเอทานอลต่อตับเกิดจากเอทานอลจะถูกเปลี่ยนแปลงที่เซลล์ตับ ได้สารกลุ่มอนุมูลอิสระ acetaldehyde และโมเลกุลที่เป็นพิษ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับและเซลล์อื่นๆ ไมโตคอนเดรียเป็นส่วนแรกๆที่ถูกทำลายและก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ มีผลทำให้สารก่อการอักเสบชนิดต่างๆถูกกระตุ้นและสร้างเพิ่มมากขึ้น สารก่อการอักเสบไซโตคายด์ที่สำคัญคือ tumor necrosis factor-α (TNF-α) สารชนิดนี้มีผลย้อนกลับไปทำให้เกิดการตอบสนองของการอักเสบเพิ่มขึ้น จึงมีผลต่อเนื่องให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับมากขึ้นเรื่อยๆจนเกิดการพัฒนาเป็น ALD การยับยั้งการสร้างหรือการทำงานของ TNF-α มีผลลดหรือชะลอการทำลายเซลล์ตับลง

หญ้าดอกขาว (ชื่ออื่นๆ อาทิ หญ้าละออง, หญ้าสามวัน, หญ้าหมอน้อย, ก้านธูป) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vernonia cinerea* Less. พืชในตระกูล Asteracea พบว่ามีสรรพคุณที่หลากหลาย รายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดจากหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดไข้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ดี ในปัจจุบันได้มีการนำหญ้าดอกขาวมาทำเป็นชาชงใช้สำหรับเลิกบุหรี่ การวิเคราะห์สารสกัดจากหญ้าดอกขาวเบื้องต้น พบว่า สารสำคัญที่พบมากและอาจเป็นสารที่ทำให้เกิดฤทธิ์เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene และ terpenoids อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในหญ้าดอกขาวยังไม่ชัดเจนและยังคงต้องมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง การนำสารสกัดหญ้าดอกขาวมาศึกษาผลต่อการลดการอักเสบในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลโดยการลดการสร้างสารก่อการอักเสบไซโตคายด์ จึงอาจนำไปสู่การพัฒนายาสมุนไพรไทยเพื่อชะลอภาวะ ALD ต่อไปและส่งเสริมการใช้สมุนไพรในท้องถิ่น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำต่อการสร้างไซโตคายด์ TNF- α ในเซลล์ตับมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล จากการทดสอบได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ตับมนุษย์ HepG2 สามารถถูกทำลายด้วยเอทานอลในแบบที่แปรผันตรงต่อความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับเอทานอล ซึ่งคล้ายคลึงกับพยาธิภาพของโรค ALD รวมทั้งเซลล์ตับสามารถถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลให้มีการสร้าง TNF-α ในแบบตอบสนองแปรผันตรงต่อความเข้มข้นของ

เอทานอล ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อเซลล์ตับพบว่า สารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีฤทธิ์ลดการสร้าง TNF-α ได้ดีในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นจากเอทานอล หญ้าดอกขาวจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถลดการอักเสบของเซลล์ตับได้

องค์ความรู้จากการศึกษานี้ เป็นส่วนหนึ่งที่จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในระดับสูง การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ชัดเจน อย่างไรก็ยังมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาทางด้านฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหญ้าดอกขาว และความเป็นพิษในสัตว์ทดลองต่อไป และผลการศึกษาที่ได้จะเป็นหลักฐานข้อมูลส่วนหนึ่งในการช่วยส่งเสริมการพัฒนาพืชสมุนไพรท้องถิ่นหญ้าดอกขาวเพื่อก้าวเป็นสมุนไพรมาตรฐานเพื่อใช้ในโรคตับจากแอลกอฮอล์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

เนื้อหาการวิจัย

บทนำ

โรคตับนับเป็นหนึ่งในสาเหตุต้นๆของการเสียชีวิตของประชากรไทย โดยเฉพาะโรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease) เป็นหนึ่งในโรคที่มีความรุนแรงและมีแนวโน้มของอุบัติการณ์เพิ่มขึ้น สาเหตุหลักมาจากการได้รับแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มสุราต่อเนื่องในปริมาณสูง รายงานสถานการณ์สุราประจำปี พ.ศ. 2549 โดยศูนย์วิจัยปัญหาสุราพบว่าอัตราการบริโภคแอล์กอฮอล์ต่อคนต่อปีของประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ และปี 2555 กองควมคุมโรคได้ประกาศว่าประชากรไทยมีการบริโภคแอลกอฮอล์เป็นลำดับที่สามของเอเชีย ในสถานการณ์ปัจจุบันโรคตับจากแอล์กอฮอล์เป็นหนึ่งในโรคที่ยังไม่มียารักษาให้หายขาดทางคลินิก การรักษาหลักคือการลดปัจจัยเสี่ยงโดยงดดื่มแอล์กอฮอล์ การให้โภชนาการที่เหมาะสม และการชะลอความรุนแรงของโรคตามอาการ โรคตับจากแอลกอฮอล์กมีการดำเนินของโรคทางพยาธิสภาพที่หลากหลาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพชนิดต่างๆตามมาได้แก่ ไขมันเกาะตับ (fatty liver), ตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis), ตับแข็ง (hepatic cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatic cancer) กลไกการออกฤทธิ์ของแอลกอฮอล์ที่มีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพเหล่านี้ของเซลล์ตับมีความซับซ้อนและยังคงอยู่ในการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง ผลของแอลกอฮอล์ต่อเซลล์ตับส่วนหนึ่งมาจากการเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ (free radicals) จำนวนมาก ซึ่งได้จากขบวนการเปลี่ยนแปลงสารในเซลล์ตับและระบบไมโครโซมอล (microsomal ethanol oxidizing system) สารอนุมูลอิสระและแอลกอฮอล์เองทำให้เกิดการอักเสบ และมีผลกระตุ้นการหลั่งสารก่อการอักเสบ เช่น tumor necrosis factor -α (TNF-α), interleukins และ prostaglandins จากเซลล์ตับ ทำให้เนื้อเยื่อตับเกิดการอักเสบต่อเนื่องและทำลายตับมากขึ้น ฉะนั้นการลดการหลั่งสารก่อการอักเสบจากเซลล์ตับจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยชะลอการทำลายเซลล์ตับที่ดี และนำไปสู่การชะลอภาวะของโรคตับจากแอลกอฮอล์

ประเทศไทยมีแหล่งทรัพยากรที่มีความหลากหลายทางพันธุ์พืช และมีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในทางการแพทย์เพื่อส่งเสริมพืชสมุนไพรในท้องถิ่นและนำไปสู่การพัฒนายาจากวัตถุดิบภายในประเทศ การศึกษาสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการช่วยชะลอและปกป้องตับจะนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายโรคตับจากแอลกอฮอล์ หญ้าดอกขาวเป็นพืชล้มลุก ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Vernonia cinerea* Linn. พบได้ทั่วไปในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชีย ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย อาทิ ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ต้านมาเลเรียและหนอนพยาธิ ต้านการอักเสบ ลดไข้ ลดปวด และขับปัสสาวะ นอกจากนี้ยังมีการนำหญ้าดอกขาวมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง รวมทั้งการนำหญ้าดอกขาวมาใช้ในการเลิกบุหรี่โดยพัฒนาเป็นชาชงเพื่อลดอาการถอนยา (withdrawal syndromes) จากการติดนิโคตินในบุหรี่ จากการศึกษาเบื้องต้นในสัตว์ทดลองและในการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และลดการสร้างสารก่อการอักเสบ (inflammatory mediators) ได้ หญ้าดอกขาวจึงเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรชนิดที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดสำหรับการนำไปใช้ในโรคตับจากแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นโรคที่มีพยาธิสภาพการดำเนินไปของโรคหลักๆ เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่อเนื่อง

งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อภาวะอักเสบจากแอลกอฮอล์ โดยมุ่งศึกษากลไกที่เกี่ยวกับการหลั่งสารก่อการอักเสบกลุ่มไซโตคายด์ (cytokines) tumor necrosis factor -α (TNF-α) และ interleukins ในเซลล์ตับกระตุ้นด้วยแอลกอฮอล์ เพื่อเป็นแนวทางนำไปสู่การพัฒนาการนำสารกัดหญ้าดอกขาวไปใช้เป็นยารักษาโรคตับจากแอลกอฮอล์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องตับของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less.) ดังนี้

1. ศึกษาผลของเอทานอลต่อการสร้างสารไซโตคายด์ tumor necrosis factor -α (TNF-α) และ interleukins (IL) ในเซลล์ตับเพื่อนำไปใช้เป็นรูปแบบการวิจัย (experimental model) ในการศึกษาฤทธิ์ต่อสารก่อการอักเสบจากพืชสมุนไพรอื่นๆ (screening test) ต่อไป
2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้าง TNF-α และ IL ชนิดต่างๆ ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับเซลล์ (cell culture) นำเซลล์ตับ Hep G2 มาใช้เป็นต้นแบบการศึกษาดูผลการตอบสนองของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากหญ้าดอกขาวต่อการสร้างไซโตคายด์ TNF-α และ IL จากเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล

การทบทวนวรรณกรรม

ตับ (liver) เป็นอวัยวะที่มีความสำคัญ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของร่างกายที่หลากหลาย ได้แก่ การสร้างและขับน้ำดี การเผาผลาญและสร้างเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตและไขมัน การกำจัดสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย การเปลี่ยนแปลง ฮอร์โมน วิตามิน และ ยาต่างๆ (Thapa and Walia, 2007) ตับจึงเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญมากต่อการทำงานปกติของร่างกายเมื่อตับได้รับอันตรายโดยเฉพาะกรณีที่ตับได้รับพิษติดต่อกันนานๆ เซลล์ตับเกิดภาวะอักเสบต่อเนื่อง เซลล์บางส่วนถูกทำลายกลายเป็นพังผืด (fibrosis) และเกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) เซลล์ตับส่วนที่กลายเป็นพังผืดจะไม่สามารถกลับมาทำงานได้เป็นปกติ สูญเสียการทำงานจนกระทั่งสภาพกาของร่างกายไม่สามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติและสุดท้ายผู้ป่วยจะทำให้เสียชีวิต (Heidelbaugh J, 2006)

โรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease, ALD) เป็นหนึ่งในโรคที่มีพบบ่อยในประเทศไทยและมีแนวโน้มจะมีอุบัติการณ์เกิดโรคมากขึ้น สาเหตุหลักมาจากการได้รับแอลกอฮอล์ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานและได้รับในปริมาณสูง และนำไปสู่การเกิดโรคตับอักเสบเรื้อรัง เมื่อได้รับแอลกอฮอล์ต่อเนื่องจะมีการพัฒนาพยาธิสภาพของโรคให้เกิดเป็นภาวะตับแข็ง (cirrhosis) มะเร็ง (hepatocellular carcinoma) และการเสียชีวิตของผู้ป่วยในที่สุด (O'Shea et al., 2010) จากการสำรวจอัตราการบริโภคแอลกอฮอล์ต่อคนต่อปีของประเทศไทยโดยศูนย์วิจัยปัญหาสุราพบว่า คนไทยมีอัตราการบริโภคสุราเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (ศูนย์วิจัยปัญหาสุรา, 2006) จึงอาจกล่าวได้ว่าอัตราการเกิดโรค

ตับแข็งจากแอลกอฮอล์ หรือ ALD จะมีอัตราส่วนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามไปด้วย อาการทางคลินิกของ ALD ขึ้นอยู่กับสภาพตับของผู้ป่วย ในระยะแรกเซลล์ตับส่วนใหญ่ยังอยู่ในสภาพดี ผู้ป่วยมักมีอาการไม่เด่นชัด เช่น อ่อนเพลียง่าย เบื่ออาหาร เมื่อการดำเนินของโรคมากขึ้นและไม่มีการป้องกันการทำลายเซลล์ตับ ทำให้เซลล์ตับที่ดีเหลือน้อยลงเรื่อยๆ ผู้ป่วยจะมีอาการทางคลินิกชัดเจนเนื่องจากการทำงานของตับเสียไป ได้แก่ ตัวเหลือง ตาเหลืองจากดีซ่าน (jaundice), ท้องมาน (ascites) ขาบวมเท้าบวม มีจ้ำเลือดเขียวตามตัวเนื่องจากเลือดออกง่าย การแข็งตัวเลือดผิดปกติ ผิวหนังมีสีคล้ำ ติดเชื้อง่ายเนื่องจากภูมิคุ้มกันลดลง มีอาการในระบบสมองส่วนกลาง (hepatic encephalopathy) มีการคั่งของของเสีย (urea) และสารพิษต่างๆในร่างกายสูงมากขึ้น เกิดภาวะความดันในหลอดเลือดดำที่ไปเลี้ยงตับสูง (portal hypertension) มีโอกาสทำให้หลอดเลือดดำที่ไปเลี้ยงตับและทางเดินอาหารแตกได้ ผู้ป่วยจะมีอาการอาเจียนเป็นเลือดหรือถ่ายดำ นอกจากนี้ผู้ป่วย ALD ในระยะตับแข็งจะเกิดภาวะแทรกซ้อนอื่นๆที่รุนแรง ได้ เช่น ผลต่อระบบไต (hepatorenal syndrome) และมะเร็งตับ (Gramenzi et al., 2006b; Heidelbaugh J, 2006) การรักษาทางคลินิกของผู้ป่วย ALD ที่ดีที่สุดคือการชะลอเซลล์ตับอักเสบและลดการสร้างสารก่อการอักเสบและอนุมูลอิสระต่างๆจากการทำงานเซลล์ตับจากการกระตุ้นด้วยแอลกอฮอล์และการรักษาตามอาการร่วมกับให้การดูแลทางด้านโภชนาการเป็นหลักเท่านั้น (Leoni S, 2006) ในปัจจุบันภาวะตับอักเสบนั้นยังไม่มียาที่ใช้รักษาโรคให้หายโดยตรง การพัฒนาและการนำสารสกัดสมุนไพรที่คาดว่ามีฤทธิ์ชะลอภาวะอักเสบเรื้อรังได้ดีจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรบการรักษาตับอักเสบ และ ALD ได้

การได้รับแอลกอฮอล์หรือเอทานอลขนาดสูงและต่อเนื่องก่อให้เกิดโรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease) ซึ่งลำดับพัฒนาการของโรคประกอบด้วย 4 โรคหลัก คือ ไขมันเกาะตับ (fatty liver), ตับอักเสบ (hepatitis), ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) (Arteel et al., 2003; Sougioultzis et al., 2005) ผลของเอทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพโรคในร่างกายมีความซับซ้อนและมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องหลากหลาย เอทานอลเป็นโมเลกุลขนาดเล็กและสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดี เมื่อได้รับเข้าไปในร่างกายจะให้พลังงานในปริมาณ 7.1 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม เป็นปริมาณพลังงานที่มากกว่าโปรตีนและคาร์โบไฮเดรท แต่เอทานอลไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ ถ้าร่างกายได้รับเอทานอลในระยะยาวเข้าไปแทนที่สารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานจะส่งผลให้ขาดสารอาหารที่จำเป็น รวมทั้งวิตามิน และเกลือแร่ ก่อให้เกิดภาวะขาดสารอาหาร (malnutrition) และมีผลทำลายตับและอวัยวะที่สำคัญอื่นๆ (Helmut et al., 2005; Lieber, 2004) พิษโดยตรงของเอทานอลต่อตับเกิดจากเอทานอลจะถูกเปลี่ยนแปลงที่เซลล์ตับด้วยปฏิกิริยา oxidation-reduction ด้วยเอนไซม์หลัก alcohol dehydrogenase ได้สาร acetaldehyde ที่เป็นพิษ (Motte et al., 2006) ที่ตับเอทานอลยังถูกเปลี่ยนแปลงด้วยระบบไมโครโซมอล (microsomal ethanol oxidizing system) ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ได้สารกลุ่มอนุมูลอิสระ เช่น nitric oxide, oxygen species เอทานอลสามารถเกิดปฏิกิริยารวมตัวกับกรดไขมันเป็น free acid ethyl ester (FAEE) โมเลกุลต่างๆเหล่านี้ โดยเฉพาะ acetaldehyde และอนุมูลอิสระต่างๆ มีผลต่อกรดนิวคลิอิค โปรตีน และไขมันต่างๆในเซลล์ตับ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับและเซลล์อื่นๆตามมา (Arteel et al., 2003; Helmut et al., 2005; Lieber, 2004) ไมโตคอนเดรียเป็นส่วนแรกๆที่ถูกทำลายและก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ มีผลทำให้สารก่อการอักเสบชนิดต่างๆถูกกระตุ้นและสร้างเพิ่มมากขึ้น สารก่อการอักเสบไซโตคายด์ที่สำคัญคือ tumor necrosis factor-α (TNF-α) และ interleukin-1 (IL-1) สารทั้งสองชนิดนี้มีผลย้อนกลับไปทำให้

ผนังเซลล์ไมโตคอนเตรียเสียหายมากมากขึ้นและทำลายการทำงาน จึงมีผลต่อเนื่องให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับมากขึ้นเรื่อยๆจนเกิดการพัฒนาเป็น ALD (Pastorino et al., 1999; Pastorino and Shulga, 2008) หลายการศึกษาได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเอทานอลกับ TNF-α พบว่า TNF-α มีผลให้เซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลเกิดภาวะไขมันเกาะตับ และทำให้เซลล์ตับตายโดยผ่านทางกลไกของ p38 MAPK (Pastorino and Shulga, 2008; Pastorino et al., 2003) การยับยั้งการทำงานของ TNF-α มีผลลดหรือชะลอการทำลายเซลล์ตับลง (Shulga et al., 2005)

การรักษา ALD ในปัจจุบันยังไม่มียาที่ใช้รักษา ALD ให้หายขาดได้ การรักษาจะมุ่งเน้นไม่ให้เกิดพัฒนาการของโรคไปสู่ขั้นที่รุนแรงมากขึ้นหรือเกิดช้าที่สุด โดยการปกป้องเซลล์ตับด้วยการลดกระบวนการอักเสบ ในทางคลินิกนั้นจะเริ่มต้นจากการให้ผู้ป่วย ลด ละ เลิกการดื่มแอลกอฮอล์ร่วมกับการให้โภชนการที่เหมาะสม ในผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบแล้วอาจได้รับยาที่ลดการอักเสบชนิดต่างๆ ได้แก่ กลุ่มสเตียรอยด์ (corticosteroid), pentoxifylline ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF-α, สารในกลุ่มต้านอนุมูลอิสระ เช่น S-adenoxylmethionine (SAMe), N-acetyl cysteine และ กลุ่มแอนติบอดีต้านสารก่อการอักเสบ (monoclonal antibody) อย่างไรก็ตามยากลุ่มต่างๆเหล่านี้ในผู้ป่วย ALD ทุกรายจะให้ผลการปกป้องตับไม่ชัดเจนและมีอาการไม่พึงประสงค์ที่ค่อนข้างรุนแรง (Day, 2007) การนำสมุนไพรและสารสกัดสมุนไพรที่คาดว่ามีฤทธิ์ชะลอภาวะอักเสบเรื้อรังได้ดีอาจสามารถป้องกันและชะลอการทำลายเซลล์ตับ พืชสมุนไพรหลายชนิดในประเทศไทยและต่างประเทศที่มีการนำมาศึกษาแนวโน้มในการเป็นสารปกป้องเซลล์ตับและชะลอการอักเสบ อาทิ Thumergia laurifolia Linn. (รางจืด) (Pramyothin et al., 2005), Phyllanthus emblica Linn. (มะขามป้อม) (Pramyothin et al., 2006), Artemisia capillaries (Koo et al., 2002)

หญ้าดอกขาว (ชื่ออื่นๆ อาทิ หญ้าละออง, หญ้าสามวัน, หญ้าหมอน้อย, ก้านธูป) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Vernonia cinerea* Less. พืชในตระกูล Asteracea เป็นพืชที่มีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรประกอบในตำรายาต่างๆในแถบเอเชีย อินเดีย จีน รวมทั้งในประเทศไทยมานาน พบว่ามีสรรพคุณที่หลากหลาย อาทิ ลำต้นมีฤทธิ์แก้ปวดท้อง รักษาแผลสด รักษากลากเกลื้อน รักษาดีซ่าน (Kirkitar, 1975) รายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดจากหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ สารสกัดเมทานอลจากใบหญ้าดอกขาวพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดไข้และลดปวดในหนูได้ดีใกล้เคียงกับยาต้านการอักเสบแอสไพริน (Iwalewa et al., 2003; Malaya Gupta, 2003) ในหนูที่ถูกกระตุ้นเป็นข้ออักเสบรูมาตอยด์ อาทรัยติส (rheumatoid arthritis) เมื่อได้รับสารสกัดจากดอกหญ้าดอกขาวสามารถลดอาการอักเสบ โดยลดอาการข้อบวมและลดระดับเอนไซม์ในพลาสมาที่สูงขึ้นจากภาวะอักเสบได้ดี (Latha et al., 1998) สารสกัดหญ้าดอกขาวยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อมาเลเรีย (Chea et al., 2006; Malaya Gupta, 2003) และในปัจจุบันได้มีการนำหญ้าดอกขาวมาทำเป็นชาชงใช้สำหรับเลิกบุหรี่ การวิเคราะห์สารสกัดจากหญ้าดอกขาวเบื้องต้น พบว่า สารสำคัญที่พบมากและอาจเป็นสารที่ทำให้เกิดฤทธิ์เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene (Kuo et al., 2003) และ terpenoids (Iwalewa et al., 2003) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในหญ้าดอกขาวยังไม่ชัดเจนและยังคงต้องมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง การนำสารสกัดหญ้าดอกขาวมาศึกษาผลต่อการลดการอักเสบในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลโดยการลดการสร้างสารก่อการอักเสบไซโตคายด์ จึงอาจนำไปสู่การพัฒนายาสมุนไพรไทยเพื่อชะลอภาวะ ALD ต่อไปและส่งเสริมการใช้สมุนไพรในท้องถิ่น

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สารสกัดหญ้าดอกขาว

ผงแห้งหญ้าดอกขาว (โรงพยาบาลบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก) มาจากส่วนลำต้นและดอกของหญ้าดอกขาวถูกนำมาทำให้สะอาด อบให้แห้งและย่อยมีขนาดเล็ก ผงแห้งหญ้าดอกขาวนำมาสกัดด้วยน้ำ (water extract) โดยใช้เครื่องสกัดสารแบบซอกเล็ท (Soxhlet extraction) โดยหมักไว้ระยะเวลา 16 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำสองครั้ง เก็บรวบรวมสารสกัดที่ได้ทั้งหมดนำมากรองและทำให้แห้งในภาวะเยือกแข็งแห้ง (freeze dry) สารสกัดแห้ง (crude extract) ที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้การทดสอบต่อไป

การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับมนุษย์ (human hepatocyte cell lines, HepG2)

เซลล์ตับ HepG2 (American Type Culture Collection, Virginia USA) ถูกเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum (FBS) 10 % และ penicillin – streptomycin 1% ในถาดเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนเซลล์แบ่งตัวหนาแน่นเต็มที่ หลังจากนี้เซลล์จะถูกเปลี่ยนมาเพาะเลี้ยงในถาดหลุม (24-well หรือ 96-well plates) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การกระตุ้นเซลล์ตับด้วยเอทานอล

เซลล์ตับจะถูกแยกมาเลี้ยงในถาดหลุม (96-well plates) โดยมีการนับจำนวนเซลล์ตับ เฉลี่ย 5×10^4/well ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่มีส่วนผสมของเอทานอลที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.00 % v/v (dose dependent responses) และที่ไม่มีส่วนผสมเอทานอลใช้เป็นกลุ่มควบคุม เซลล์ตับถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลเป็นเวลา 4, 8, 16, 24, 48, 72 ชั่วโมง (time dependent responses) จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลและกลุ่มควบคุมไปวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) และการสร้างสารก่อการอักเสบ TNF-α และ IL-1

เซลล์ตับ Hep G2 จะแบ่งกลุ่มทดสอบดังนี้

กลุ่มที่1	กลุ่มควบคุม (ไม่มีส่วนผสมเอทานอลและสารสกัด)
กลุ่มที่ 2	เซลล์ตับที่มีสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 ug/ml
กลุ่มที่ 3	เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นเหมาะสม
กลุ่มที่ 4	เซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นเหมาะสม และเติมสารสกัดหญ้าดอกขาวในความเข้มข้นต่างๆ

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability)

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้ 3,4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) หลักการคือเอนไซม์ mitrochondial dehydrogenase จะเปลี่ยน MTT เป็นสารสีม่วงจับติดเซลล์ที่ไม่ละลาย ในขณะเซลล์ที่ตายจะไม่ทำปฏิกิริยากับ MTT เซลล์ตับ Hep G2 ที่ต้องการวัด MTT นำมาล้างด้วยสารละลายบัพเฟอร์ (Phosephate Buffer Saline, PBS) จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ใน PBS ปริมาณ 100 ul ลงไปบ่มใน incubation ที่ 37 °C

เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาสารละลาย MTT ส่วนเกินออกก่อนเติมสารละลาย Tris-DMSO (1:1 % v/v) ลงไปแล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 20 นาทีก่อนแล้วนำไปอ่านผลการทดลองโดยอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์สารก่อการอักเสบ

สารก่อการอักเสบ TNF-α และ IL-1 ที่ถูกสร้างและหลั่งออกจากเซลล์ HepG2 วัดโดยวิธีการ modified enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เซลล์ตับเลี้ยงในถาดหลุม 96-well plates จำนวน $5x10^4$ เซลล์/หลุม เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 % v/v) และ/หรือถูกบ่มด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว (62.5, 125, 250, 500 μg/ml) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สารก่อการอักเสบที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกวัดด้วย ELISA โดยนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องกับแอนติบอดี (human monoclonal antibody) ที่เฉพาะเจาะจงกับ TNF-α และ IL-1 ที่ถูกยึดไว้กับถาดหลุมที่เตรียมไว้แล้ว หลังจากนั้นถูกล้างด้วย 20% tween-PBS สองครั้ง เติม polyclonal antibody ที่เฉพาะเจาะจงกับ TNF-α และ IL-1 แล้วเติมสารละลายตั้งต้นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี ABTS ที่มี 30% H_2O_2 ลงไปเป็นเวลา 10 นาที และนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสีเข้มที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 450 nm

วิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลจากการทดลองโดยการนำผลการทดลองทุกตัวอย่างทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม ทดสอบที่ได้รับ ผลจากการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD)

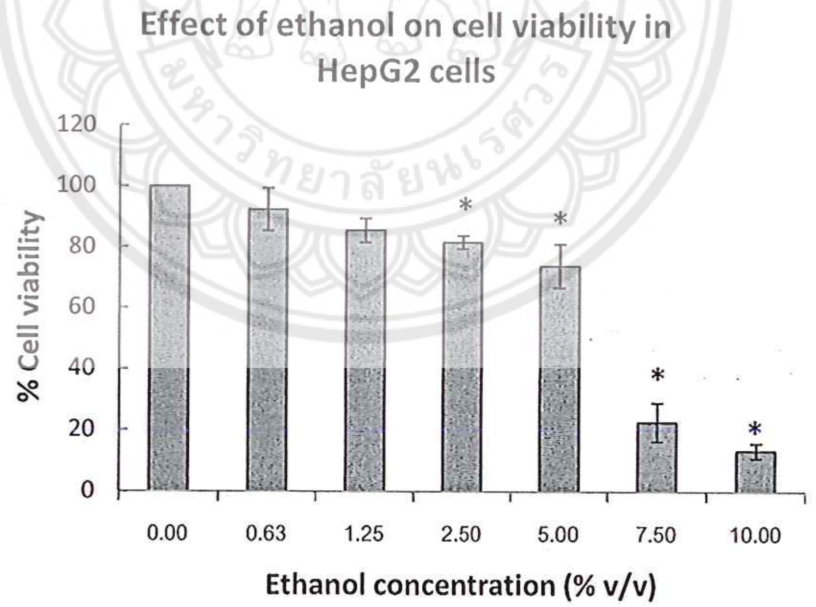
การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยใช้ student t-test ($P < 0.05$) ในกรณีที่มีการเปรียบเทียบกลุ่มทดสอบหลายกลุ่มกับกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์ทาง สถิติจะใช้ ANOVA ($P < 0.05$)

ผลการศึกษาวิจัย

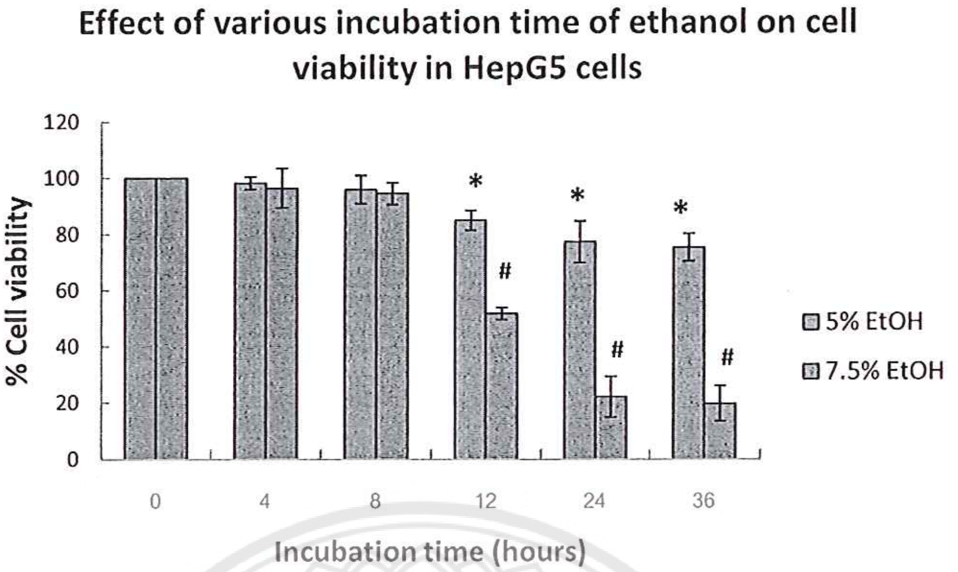
ผลของเอทานอลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ของเซลล์ HepG2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เซลล์ตับ HepG2 จะได้รับเอทานอลผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ความเข้มข้นระดับต่ำถึงสูง (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, และ 10.0 % v/v) เพื่อศึกษาความเป็นพิษโดยตรงของเอทานอลต่อเซลล์ตับโดยบ่มนาน 24 ชั่วโมง และวัดผลของเอทานอลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay พบว่า เอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ HepG2 อย่างชัดเจน โดยมีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (dose - dependent response) และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 % v/v มีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1)

เมื่อทดสอบผลของเอทานอลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 4, 8, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่กำหนดคือ 5.0 หรือ 7.5 % v/v พบว่าความเป็นพิษของเอทานอลขึ้นอยู่กับระยะที่เซลล์ตับสัมผัสกับเอทานอลอย่างชัดเจน (time dependent responses) เมื่อเซลล์ถูกบ่มกับเอทานอลที่ความเข้มข้น 5.0 หรือ 7.5 % v/v ในระยะเวลาน้อยกว่า 12 ชั่วโมงพบว่าเอทานอลเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เล็กน้อย โดยเซลล์ตับที่บ่มกับเอทานอลมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเซลล์ตับบ่มร่วมกับเอทานลนานกว่า 24 ชั่วโมง พบว่าเอทานอลมีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเอทานอล ((รูปที่ 2)



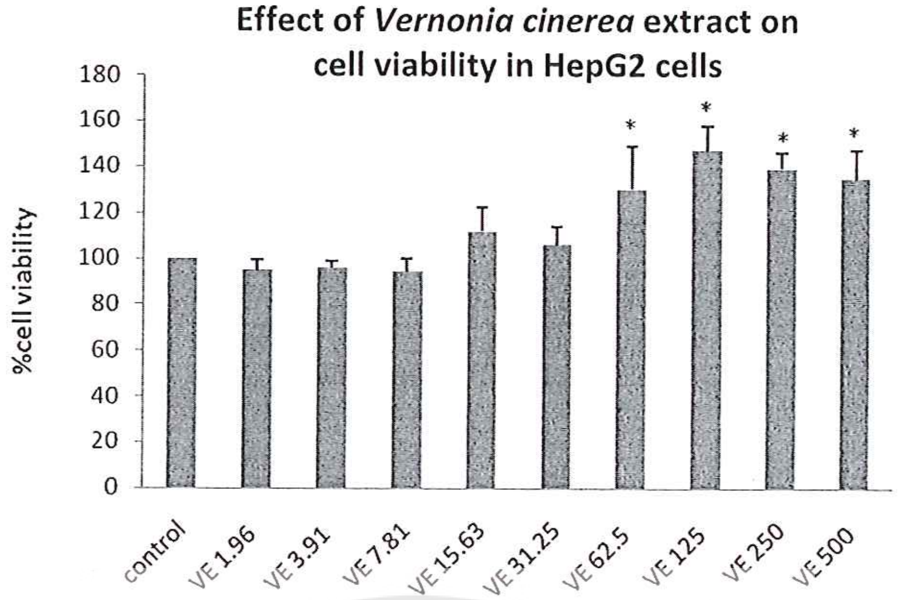
รูปที่ 1. ผลของเอทานอลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง ผลของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0, 0.625, 1.25, 2.50, 5.0, 7.5, 10.0 % v/v) ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยการวัดด้วย MTT assay ผลการศึกษาแสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=3), * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย ANOVA ($p < 0.5$),



รูปที่ 2. ผลของเอทานอลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ตับ HepG2 ที่ความเข้มข้น 5 หรือ 7% v/v ณ เวลาต่างๆ ผลของการกระตุ้นเซลล์ตับด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 5.0 หรือ 7.0 % v/v ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ณ เวลา 4, 8, 12, 24 หรือ 36 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย MTT assay ผลการศึกษาแสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=3), *, # แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย student t-test (p <0.5),

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวโดยตรงต่อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ในเซลล์ตับ

การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นโดยตรงสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำ (*Vernonia cinerea* water extract, VE) ต่อเซลล์ตับ โดยบ่มสารสกัดหญ้าดอกขาวกับเซลล์ตับ HepG2 ที่ความเข้มข้นต่ำถึงสูง ตั้งแต่ 1.96. 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 μg/ml ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ไม่ลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มที่จะเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ตับที่ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 62.50 – 500 μg/ml ดังแสดง รูปที่ 3

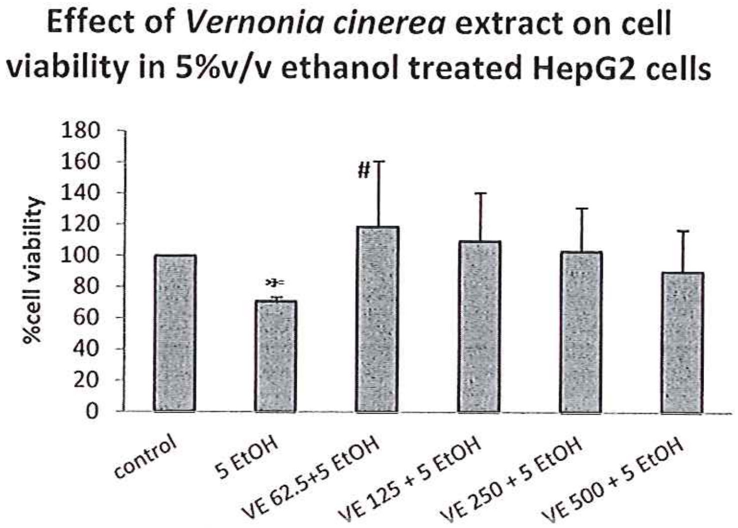


รูปที่ 3. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง ผลความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย MTT assay ผลการศึกษาแสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=3), *,แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย ANOVA ($p <0.5$),

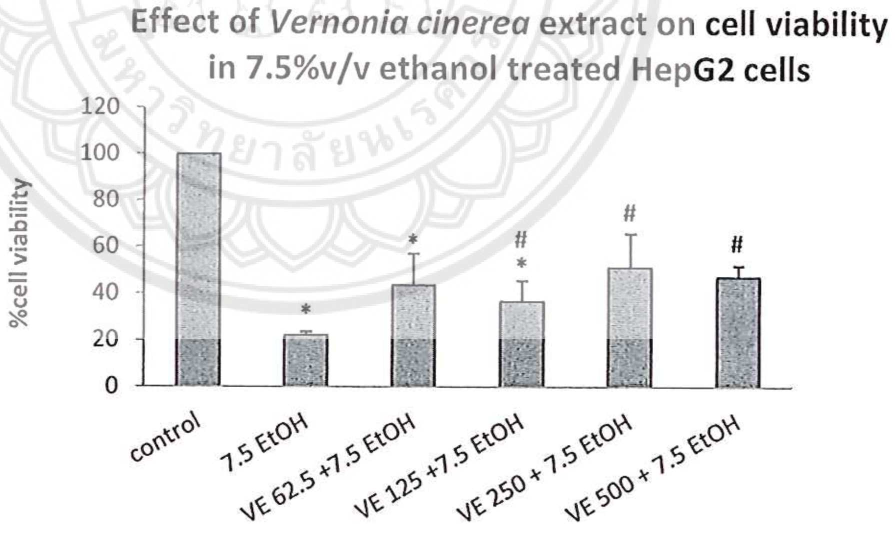
VE : สารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำ มีหน่วยความเข้มข้นเป็น μg/ml

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ตับ HepG2 ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 2.5 – 10.0 %v/v มีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (เซลล์ตับที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล) ผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้นเอทานอล ที่ 5.0 % v/v ซึ่งมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงคิดเป็น 73.93 % ± 7.21 และ ที่ความเข้มข้มของเอทานอล 7.5 % v/v ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง คิดเป็น 22.66 % ± 6.25 เอทานอลทั้งสองความเข้มข้นมีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมดังปรากฏในรูปที่ 1 และ 2 เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำ (*Vernonia cinerea* water extracts, VE) โดยบ่มสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5, 125, 250, 500 μg/ml ร่วมกับเอทานอลในระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มช่วยป้องกันการลดลงของจำนวนเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลได้เมื่อทดสอบร่วมกับเอทานอลความเข้มข้น 5% v/v และเมื่อทดสอบที่เอทานอลความเข้มข้นสูง 7.5 %v/v พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 125, 250, 500 μg/ml สามารถป้องกันการลดลงของเซลล์ตับที่มีชีวิตได้ย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับที่ได้รับเฉพาะเอทานอล ดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ



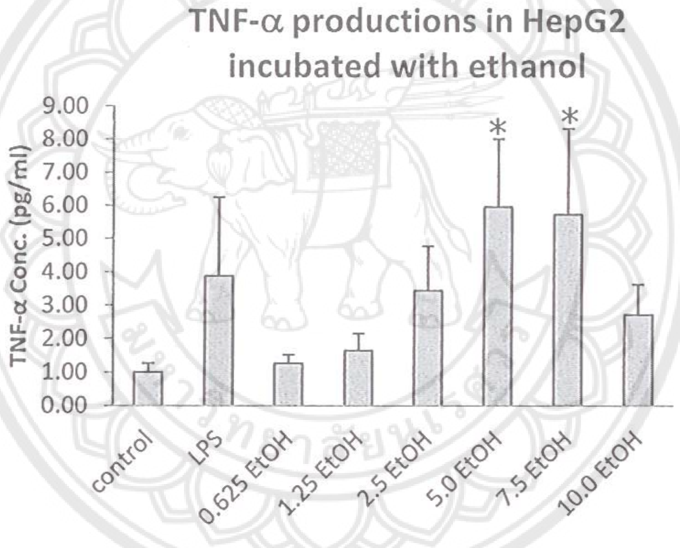
รูปที่ 4. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ตับถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล เซลล์ตับ HepG2 ได้รับเอทานอลที่ความเข้มข้น (5 %v/v) ร่วมกับสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ (62.5, 125, 250, 500 μg/ml) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยการวัดด้วย MTT assay ผลการศึกษาแสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) (mean ± SD) จากการทดสอบ.3 ครั้ง (n=3), *, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม และ #, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลเท่านั้น ทดสอบทางสถิติด้วย student t-test (p <0.5),
EtOH = ethanol, VE = *Vernonia cinerea* water extract



รูปที่ 4. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ตับถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล เซลล์ตับ HepG2 ได้รับเอทานอลที่ความเข้มข้น (7.5 %v/v) ร่วมกับสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ (62.5, 125, 250, 500 μg/ml) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยการวัดด้วย MTT assay ผลการศึกษาแสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) (mean ± SD) จากการทดสอบ.3 ครั้ง (n=3), *, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม และ #, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลเท่านั้น ทดสอบทางสถิติด้วย student t-test (p <0.5),
EtOH = ethanol, VE = *Vernonia cinerea* water extract

ผลของเอทานอลโดยตรงต่อการกระตุ้นการสร้างไซโตคายด์ในเซลล์ตับ HepG2

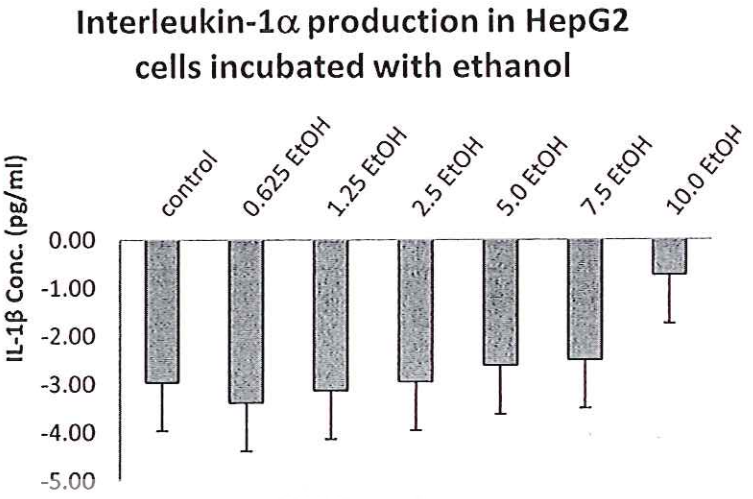
เซลล์ตับ HepG2 ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.625, 1.25. 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 % v/v เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทดสอบผลของเอทานอลต่อการกระตุ้นการหลั่งสารก่อการอักเสบไซโตคายด์สองชนิด tumor necrosis factor (TNF-α) และ interleukin-1β (IL-1β) พบว่าเอทานอลสามารถกระตุ้นเซลล์ตับ HepG 2 ให้สร้างและหลั่ง TNF-α ออกมา ลักษณะเป็น dose dependent response และเอทานอลที่ความเข้มข้น 5.0, 7.5 % v/v สามารถกระตุ้นเซลล์ตับให้สร้างไซโตคายด์ TNF-α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเอทานอลที่ความเข้มข้น 10.0 %v/v กลับมีการหลั่ง TNF-α ได้ลดลง ในการศึกษานี้ใช้สาร lypopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็น endotoxin ของเชื้อแบคทีเรีย เป็นสารทดสอบการการตอบสนองของเซลล์ตับต่อการสารสารไซโตคายด์ (positive control) ดังแสดงในรูปที่ 5 สำหรับผลการตอบสนองของเซลล์ตับเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลต่อการสร้างไซโตคายด์ IL-1β พบว่าเซลล์ HepG2 ไม่มีการสร้างและหลั่ง IL-1β และไม่สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสาร IL-1β ออกมา ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5. ผลของเอทานอลต่อการหลั่งสารไซโตคายด์ tumor necrosis factor (TNF-α) ในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง

ผลของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0, 0.625, 1.25, 2.50, 5.0, 7.5, 10.0 % v/v) ต่อการหลั่งสาร TNF-α โดยวิธี ELISA assay ผลการศึกษาแสดงความเข้มข้นของสารที่ถูกหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อหน่วย (pg/ml) เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=3), * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย ANOVA (p <0.5),

LPS = 1 μg/ml lipopolysaccharide, EtOH = ethanol



รูปที่ 6. ผลของเอทานอลต่อการหลั่งสารไซโตคายด์ interleukin 1-β (IL-1β) ในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง

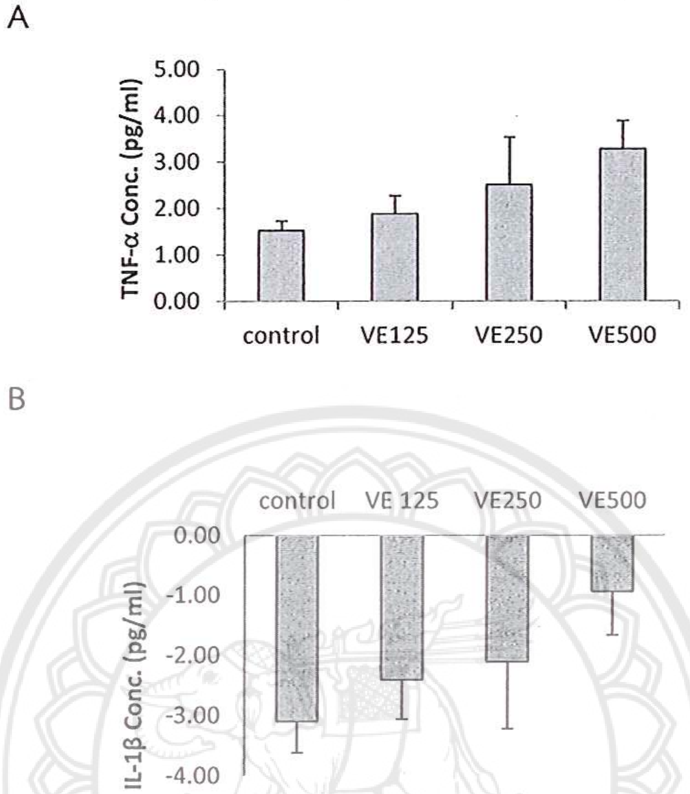
ผลของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0, 0.625, 1.25, 2.50, 5.0, 7.5, 10.0 % v/v) ต่อการหลั่งสาร IL-1β โดยวิธี ELISA assay ผลการศึกษาแสดงความเข้มข้นของสารที่ถูกหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ หน่วย (pg/ml) เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean ± SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=3), * แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย ANOVA ($p < 0.5$),

EtOH = ethanol

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวโดยตรงต่อการสร้างไซโตคายด์ในเซลล์ตับ HepG2 ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำ (VE) ต่อการสร้างไซโตคายด์โดยตรงในเซลล์ตับ โดยบ่มสารสกัดหญ้าดอกขาวกับเซลล์ตับ HepG2 ที่ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 μg/ml ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวไม่มีผลต่อการสร้าง TNF- α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามมี VE ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นอาจจะมีแนวโน้มกระตุ้นการหลั่งสารเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบ VE ต่อการสร้างและหลั่งสาร IL-1β พบว่า HepG2 ไม่มีการสร้าง IL-β ออกมาและ VE ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างสารนี้ ดังแสดงในรูปที่ 7 (A และ B)

Effect of *Vernonia cinerea* extract on cytokines productions in HepG2 cells



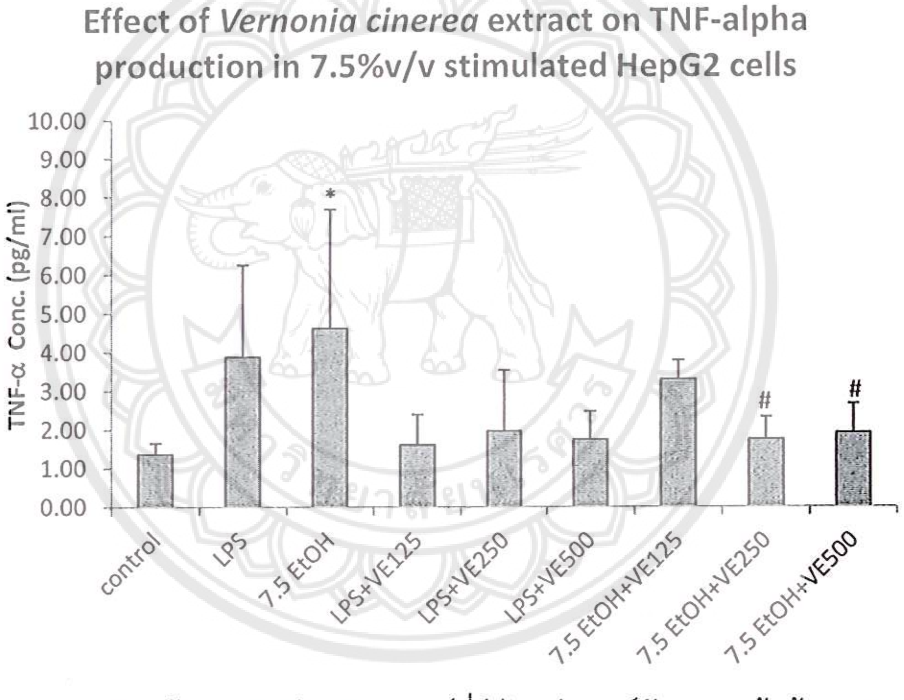
รูปที่ 7. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำต่อการสร้างไซโตคายด์ TNF- α และ IL -1β ในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างไซโตคายด์ในเซลล์ตับ HepG2 ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยการวัดด้วย ELISA assay ผลแสดงความเข้มข้นของสารที่ถูกหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ หน่วย pg/ml เทียบกับกลุ่มควบคุม (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 3 ครั้ง (n=3), *,แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วย ANOVA ($p < 0.5$),

VE : สารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำ มีหน่วยความเข้มข้นเป็น μg/ml

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้างไซโตคายด์ในเซลล์ตับ HepG2 ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำต่อเซลล์ตับ HepG2 ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลความเข้มข้น 7.5% v/v ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เอทานอลสามารถกระตุ้นและเพิ่มการหลั่งไซโตคายด์ TNF-α จากเซลล์ตับได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้สารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำในความเข้มข้นต่างๆ 125, 250, 500 μg/ml ร่วมกับการให้เอทานอล ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มช่วยลดการสร้างและหลั่ง TNF-α ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล ในการศึกษานี้ยังพบว่าเมื่อทดสอบผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำร่วมกับการกระตุ้นด้วย LPS นั้น สารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดการสร้าง TNF-α ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ ดังแสดงรูปที่ 8



รูปที่ 8. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ต่อเซลล์ตับถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล (7.5% v/v) ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์ตับ HepG2 ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ (62.5, 125, 250, 500 μg/ml) ร่วมกับเอทานอลที่ความเข้มข้น (7.5 %v/v) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยการวัดด้วย MTT assay ผลการศึกษาแสดงร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) (mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ.3 ครั้ง (n=3), *, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม และ #, แสดงนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลเท่านั้น ทดสอบทางสถิติด้วย student t-test ($p < 0.5$), EtOH = ethanol, VE = *Vernonia cinerea* water extract

อภิปรายผลการศึกษา

เอทานอลมีผลในการทำลายเซลล์ตับได้หลายกลไก ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม รวมทั้งส่งผลการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในเนื้อเยื่อตับและทำให้เกิดการตอบสนองในขบวนการอักเสบอย่างต่อเนื่องและนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ตับ ตั้งแต่เซลล์ตับเสียหาย (hepatocellular injury), ไขมันสะสมในตับ (steatosis), พังผืดในตับและตับแข็ง (fibrosis and liver cirrhosis) และสุดท้ายคือมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) (O'Shea et al., 2010) กลไกหลักๆของเอทานอลที่ส่งผลทำลายเซลล์ตับนั้นเกิดจาก เอทานอลสามารถถูกเปลี่ยนแปลงที่เซลล์ตับ ทำให้เกิดการสร้างและปลดปล่อยสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ออกมา ได้แก่ acetaldehyde, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide ซึ่งสารเหล่านี้สามารถไปทำลายเซลล์ต่างๆ รวมทั้งกลับมาทำลายเซลล์ตับ (Cederbaum et al., 2009) นอกจากนี้ สารพิษเหล่านี้ยังส่งผลทางอ้อมในการทำลายเซลล์ตับและทำให้พยาธิภาพของโรคตับจากแอลกอฮอล์ (alcoholic liver disease, ALD) แย่ลง โดยไปกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันใน Kuffer cells และเซลล์ตับโดยตรง ให้สร้างสารก่อการอักเสบและไซโตคายด์ออกมามากมาย อาทิ tumor necrosis factor (TNF), interleukins (ILs) (Beier et al., 2011; Gramenzi et al., 2006a) ซึ่งส่งผลให้เกิดกระบวนการอักเสบและนำไปสู่ภาวะตับอักเสบ นอกจากนี้การเกิดภาวะอักเสบเรื้อรังเนื่องจากได้รับแอลกอฮอล์อย่างต่อเนื่อง ยังมีผลทำทำให้เซลล์ของผนังลำไส้เล็กมีการรั่วมากขึ้น (permeability) และส่งผลให้มีสารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย (endotoxin: lipopolysaccharide, LPS) ซึ่งอยู่ภายในทางเดินอาหารสามารถเข้าสู่ร่างกาย ทำให้มี endotoxin เพิ่มสูงขึ้นได้ โดยเฉพาะในหลอดเลือดตรงจากลำไส้เล็กไปยังตับ (portal circulation) ส่งผลทำให้เกิดอักเสบในเซลล์ตับเพิ่มขึ้นไปเรื่อยๆ เป็นวงจรของการอักเสบต่อเนื่อง (Mandrekar and Szabo, 2009)

ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบผลของเอทานอลโดยตรงต่อเซลล์ตับมนุษย์ โดยใช้เซลล์ตับ HepG2 เป็น cell lines ที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบการทำงานของเซลล์ตับในการเปลี่ยนแปลงสารและผลของสารพิษต่างๆ ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับเนื่องจากคุณลักษณะและคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ตับมนุษย์ (Castaneda and Kinne, 2000; Van den Hof et al., 2014) ในการศึกษานี้จึงนำ HepG2 มาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาเพื่อหาสภาวะเบื้องต้นที่คล้ายคลึงกับสภาวะโรค ALD ซึ่งเซลล์ตับจะได้รับการกระตุ้นด้วยเอทานอลความเข้มข้นสูงต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ผลของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (% cell viability) ในเซลล์ตับ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลทำให้จำนวนเซลล์ตับที่มีชีวิตลดลง ซึ่งหมายถึงมีการทำลายเซลล์ตับมากขึ้น ในลักษณะ dose dependent response และเมื่อทดสอบผลของระยะเวลาต่างๆ ต่อ % cell viability ในเซลล์ตับที่ได้รับเอทานอลต่อเนื่อง โดยผู้วิจัยได้เลือกทดสอบโดยใช้เอทานอลเฉพาะที่ความเข้มข้น 5.0 และ 7.5 % v/v เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นของเอทานอลที่เห็นผลทำลายเซลล์ตับที่ค่อนข้างชัดเจน ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าว่าระยะเวลาที่เซลล์ตับได้รับเอทานอลนานขึ้น ทำให้เซลล์ตับถูกทำลายมากขึ้นในลักษณะ time dependent response ในกรณีทดสอบความเป็นพิษของเอทานอลที่ความเข้มข้นเอทานอลสูง 10 %v/v ซึ่งมีผลทำให้จำนวนเซลล์ตับที่มีชีวิตลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 10 (รูปที่ 1) ผู้วิจัยพิจารณาว่าการใช้เอทานอลที่เข้มข้นระดับนี้ ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในลักษณะการทำลายเซลล์ตับจำนวนมาก ซึ่งแตกต่างจากพยาธิสภาพของการดำเนินของโรค ALD ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงในลักษณะไม่รุนแรง แต่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากการทดสอบเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตับ HepG2 ที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลความเข้มข้น ระหว่าง 5 หรือ 7.5 %v/v ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เหมาะสมสำหรับนำมาเป็นโมเดลในการศึกษาทดสอบสภาวะที่คล้ายกับโรค ALD

จากหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ โดยมีฤทธิ์ลดการสร้าง reactive oxygen species และ nitric oxide ในเซลล์มะเร็ง และสามารถลดการสร้างไซโตคายด์ในหนูที่กระตุ้นให้เกิดภาวะอักเสบ (Leelarungrayub et al., 2010; Pratheesh Kumar and Kuttan, 2009; Pratheeshkumar and Kuttan, 2011; Youn et al., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำ ซึ่งคาดว่าองค์ประกอบของสารที่สกัดได้จะมีสารคล้ายกับองค์ประกอบที่ออกมาในชาชงหญ้าดอกขาวที่ถูกนำมาใช้ในทางคลินิก เมื่อนำสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำทดสอบความเป็นพิษ พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆไม่มีผลลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไม่ความเป็นพิษโดยตรงต่อเซลล์ตับ จากการศึกษานี้กลับพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีแนวโน้มที่จะเพิ่มจำนวนเซลล์ HepG2 มากขึ้น เนื่องจากสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำมีอาจจะมีองค์ประกอบของสารสำคัญหลายชนิดซึ่งอาจจะมีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ ในบางการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในกลุ่ม vernolides ในหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์เป็น immunomodulator โดยสามารถเพิ่มการทำงานและเพิ่มจำนวนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ (Pratheeshkumar and Kuttan, 2012) เมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลความเข้มข้น 5% v/v หรือ 7.5% v/v ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำมีแนวโน้มที่จะช่วยป้องกันการทำลายเซลล์ตับจากเอทานอลได้ โดยเฉพาะเมื่อให้สารสกัดหญ้าดอกขาวร่วมกับเอทานอล 7.5 %v/v พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหญ้าดอกขาวตั้งแต่ 125, 250, 500 μg/ml สามารถป้องกันการทำลายเซลล์ตับได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับเฉพาะเอทานอล

พยาธิภาพที่สำคัญของ ALD คือเซลล์ตับและเนื้อเยื่อตับเกิดการอักเสบเรื้อรัง และมีการสร้างและหลั่งสารก่อการอักเสบและสารไซโตคายด์ออกมาในการเริ่มกระบวนการอักเสบ (Kawaratani et al., 2013) ในการศึกษานี้ได้ทดสอบผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวเมื่อเซลล์ตับถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลทำให้เพิ่มการสร้าสารไซโตคายด์ในที่นี้มุ่งเน้นที่ไซโตคายหลัก 2 ชนิด คือ TNF-α และ IL-1β ผลการศึกษาแสดงให้เห็นชัดเจนว่า เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถกระตุ้นเซลล์ตับ HepG2 ให้สร้างและหลั่ง TNF-α เพิ่มมากขึ้นในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแบบ dose-dependent response และที่ความเข้มข้นสูง 5.0 และ 7.5 %v/v สามารถเพิ่มการสร้าง TNF-α อย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่สูง 10.0 %v/v พบว่าปริมาณการสร้าง TNF-α กลับลดลง ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากในภาวะนี้จำนวนเซลล์ตับที่มีชีวิตลดจำนวนลงมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการวัดร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อเซลล์ตับที่มีชีวิตเหลืออยู่น้อย และก็จะมีเซลล์ที่สามารถสร้างไซโตคายด์ออกมาน้อย ในกรณีนี้การคำนวณหาปริมาณ TNF-α ที่ถูกสร้างออกมาควรจะมีการนำมาเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เหลืออยู่ในรูปของการหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่เหลืออยู่จริงในแต่ละกลุ่ม การทดสอบผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการสร้าง TNF-α ในเซลล์ตับโดยตรงพบว่า สารสกัดหญาดอกขาวในน้ำมีแนวโน้มเพิ่มการสร้างไซโตคายด์ชนิดนี้ได้เล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ได้ และเมื่อศึกษาผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำต่อเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 7.5 %v/v พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดการสร้าง TNF-α ได้ดี ที่ความเข้มข้น 250 และ 200 μg/ml สามารถลดการสร้าง TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ใช้ LPS ซึ่งเป็น endotoxin ที่มีบทบาทในภาวะ ALD และเป็นสารหลักที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างไซโตคายด์ TNF-α ในเซลล์ต่างๆ (positive control) และเมื่อทดสอบสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำในเซลล์ตับที่ถูก

กระตุ้นด้วย LPS ยังพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวสามารถลดการสร้าง TNF-α ได้ดีเช่นกัน ในหลายการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่า TNF-α เป็นสารก่อการอักเสบสำคัญและสัมพันธ์กับการเกิดภาวะตับอักเสบในโรค ALD และในผู้ป่วย ที่มีระดับของ TNF-α ในพลาสมาเพิ่มขึ้นมีโอกาสที่โรคจะมีความรุนแรงมากขึ้นและเสียชีวิตได้ (Kawaratani et al., 2013; Pastorino and Shulga, 2008; Pastorino et al., 2003) ส่วนผลการทดสอบของเอทานอลต่อการกระตุ้นการสร้าง IL-1β กลับพบว่า HepG2 ไม่มีการสร้างไซโตคายด์ชนิดนี้ออกมาทั้งในภาวะปกติและในภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอล ซึ่งอาจเกิดจาก HepG2 เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่สามารถการสร้างไซโตคายด์ชนิดนี้ อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าดอกขาวต่อการสร้างไซโตคายด์ชนิดอื่นๆ ที่บทบาทต่อกระบวนการอักเสบเพิ่มเติม เช่น interleukin-6 และ interleukin 10 รวมทั้งการทดสอบผลต่อโมเลกกุลอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบนี้

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ตับ HepG2 (cell line) สามารถถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลและเกิดตอบสนองในแบบที่ตอบสนองแปรผันตรงต่อความเข้มข้น และระยะเวลาในการได้รับเอทานอล ซึ่งคลายคลึงกับพยาธิสภาพบางส่วนของเซลล์ตับในภาวะโรคตับจากแอลกอฮอล์ รวมทั้งเซลล์ตับสามารถถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลให้สร้างและหลั่งสารไซโตคายด์ TNF-α ได้ ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวในน้ำต่อเซลล์ตับ HepG2 ในเบื้องต้นพบว่าสารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีฤทธิ์ลดการสร้าง TNF-α ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นจากทั้งเอทานอลหรือ LPS ได้ดี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในกลไกการเกิดการอักเสบเรื้อรัง หญ้าดอกขาวจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถลดการอักเสบของเซลล์ตับได้ในเบื้องต้น เพื่อพัฒนาเป็นสารปกป้องเซลล์ตับอักเสบ (hepatoprotective agents) ผลจากการศึกษานี้เป็นผลที่ได้จากในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงเท่านั้น จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ปกป้องตับในสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดโรคตับจากแอล์กอฮอล์ รวมทั้งควรมีศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลับและพิษเรื้อรังของสารสกัดหญ้าดอกขาวในสัตว์ทดลองต่อไป

ว RM 666 .H33 ศ1213 2557

16962992

- 2 มี.ย. 2558

สำนักหอสมุด

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Arteel, G., L. Marsano, C. Mendez, F. Bentley, and C.J. McClain. 2003. Advances in alcoholic liver disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 17:625-647.

Beier, J., G. Arteel, and C. McClain. 2011. Advances in alcoholic liver disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 13:56-64.

Castaneda, F., and R.K. Kinne. 2000. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*. 126:503-510.

Cederbaum, A., Y. Lu, and D. Wu. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol*. 83:519 - 548.

Chea, A., S. Hout, C. Long, L. Marcourt, R. Faure, N. Azas, and R. Elias. 2006. Antimalarial Activity of Sesquiterpene Lactones from Vernonia cinerea. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 54:1437-1439.

Day, C.P. 2007. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transplantation*. 13:S69-S75.

Gramenzi, A., F. Caputo, M. Biselli, F. Kuria, E. Loggi, P. Andreone, and M. Bernardi. 2006a. Review article: alcoholic liver disease--pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther*. 24:1151-1161.

Gramenzi, A., F. Caputo, M. Biselli, F. Kuria, E. Loggi, P. Andreone, and M. Bernardi. 2006b. Review article: alcoholic liver disease; pathophysiological aspects and risk factors. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 24:1151-1161.

Heidelbaugh J, B.M. 2006. Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation. *American Family Physician*. 74:756-762.

Helmut, K.S., S.L. Charles, S. Felix, S. Mikko, S. Hans-Peter, and H. Yoshimori. 2005. Alcoholic Liver Disease: From Pathophysiology to Therapy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 29:1276-1281.

Iwalewa, E.O., O.J. Iwalewa, and J.O. Adeboye. 2003. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of Vernonia cinerea less leaf. *Journal of Ethnopharmacology*. 86:229-234.

Kawaratani, H., T. Tsujimoto, A. Douhara, H. Takaya, K. Moriya, T. Namisaki, R. Noguchi, H. Yoshiji, M. Fujimoto, and H. Fukui. 2013. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm*. 495156:9.

Kirkitar, K.R. 1975. Indian Medicinal Plant.

Koo, H.-N., S.-H. Hong, H.-J. Jeong, E.-H. Lee, N.-G. Kim, S.-D. Choi, K.-W. Ra, K.-S. Kim, B.-K. Kang, J.-J. Kim, J.G. Oh, and H.-M. Kim. 2002. INHIBITORY EFFECT OF ARTEMISIA CAPILLARIS ON ETHANOL-INDUCED CYTOKINES (TNF-ฮฑ, IL-1ฮฑ) SECRETION IN HEP G2 CELLS. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 24:441.

Kuo, Y.-H., Y.-J. Kuo, A.-S. Yu, M.-D. Wu, C.-W. Ong, L.-M. Yang Kuo, J.-T. Huang, C.-F. Chen, and S.-Y. Li. 2003. Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxi vernolide-A and-B, from *Vernonia cinerea*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 51:425-426.

Latha, R.M., T. Geetha, and P. Varalakshmi. 1998. Effect of Vernonia cinerea Less Flower Extract in Adjuvant-Induced Arthritis. *General Pharmacology*. 31:601-606.

Leelarungrayub, D., S. Pratanaphon, P. Pothongsunun, T. Sriboonreung, A. Yankai, and R. Bloomer. 2010. Vernonia cinerea Less. supplementation and strenuous exercise reduce smoking rate: relation to oxidative stress status and beta-endorphin release in active smokers. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 7:21.

Leoni S, P.F., Righini R, Bolondi L. 2006. Management of small hepatocellular carcinoma. *Acta Gastroenterol Belg*. 69(2):230-235.

Lieber, C.S. 2004. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. 34:9-19.

Malaya Gupta, U.K.M.L.M.S.B.P.K.H.S.R. 2003. Evaluation of antipyretic potential of <I>Vernonia cinerea</I> extract in rats. *Phytotherapy Research*. 17:804-806.

Mandrekar, P., and G. Szabo. 2009. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol*. 50:1258-1266.

Motte, S., K. McEntee, and R. Naeije. 2006. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacology & Therapeutics*. 110:386-414.

O'Shea, R.S., S. Dasarathy, and A.J. McCullough. 2010. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 51:307-328.

Pastorino, J.G., A. Marcineviciute, A. Cahill, and J.B. Hoek. 1999. Potentiation by Chronic Ethanol Treatment of the Mitochondrial Permeability Transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 265:405-409.

Pastorino, J.G., and N. Shulga. 2008. Tumor Necrosis Factor-{alpha} Can Provoke Cleavage and Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein in Ethanol-exposed Cells via a Caspase-dependent Pathway That Is Cholesterol Insensitive. *J. Biol. Chem.* 283:25638-25649.

Pastorino, J.G., N. Shulga, and J.B. Hoek. 2003. TNF-{alpha}-induced cell death in ethanol-exposed cells depends on p38 MAPK signaling but is independent of Bid and caspase-8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 285:G503-516.

Pramyothin, P., H. Chirdchupunsare, A. Rungsipipat, and C. Chaichantipyuth. 2005. Hepatoprotective activity of Thunbergia laurifolia Linn extract in rats treated with ethanol: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 102:408-411.

Pramyothin, P., P. Samosorn, S. Poungshompoo, and C. Chaichantipyuth. 2006. The protective effects of Phyllanthus emblica Linn. extract on ethanol induced rat hepatic injury. *Journal of Ethnopharmacology*. 107:361-364.

Pratheesh Kumar, P., and G. Kuttan. 2009. Vernonia cinerea L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 31:94-102.

Pratheeshkumar, P., and G. Kuttan. 2011. Vernolide-A, a sesquiterpene lactone from Vernonia cinerea, induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by modulating p53 and caspase-3 gene expressions and regulating NF-κB-mediated bcl-2 activation. *Drug and Chemical Toxicology*. 34:261-270.

Pratheeshkumar, P., and G. Kuttan. 2012. Modulation of cytotoxic T lymphocyte, natural killer cell, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity by Vernonia cinerea L. and vernolide-A in BALB/c mice via enhanced production of cytokines IL-2 and IFN-γ. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 34:46-55.

Shulga, N., J.B. Hoek, and J.G. Pastorino. 2005. Elevated PTEN Levels Account for the Increased Sensitivity of Ethanol-exposed Cells to Tumor Necrosis Factor-induced Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 280:9416-9424.

Sougioultzis, S., E. Dalakas, P.C. Hayes, and J.N. Plevris. 2005. Alcoholic hepatitis: from pathogenesis to treatment. *Current Medical Research and Opinion*. 21:1337.

Van den Hof, W.F., M.L. Coonen, M. van Herwijnen, K. Brauers, W.K. Wodzig, J.H. van Delft, and J.C. Kleinjans. 2014. Classification of hepatotoxicants using HepG2 cells: A proof of principle study. *Chem Res Toxicol*. 27:433-442.

Youn, U.J., E.-J. Park, T.P. Kondratyuk, C.J. Simmons, R.P. Borris, P. Tanamatayarat, S. Wongwiwatthananukit, O. Toyama, T. Songsak, J.M. Pezzuto, and L.C. Chang. 2012. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of Vernonia cinerea. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22:5559-5562.

ศูนย์วิจัยปัญหาสุรา. 2006. อัตราการบริโภคแอลกอฮอล์ของคนไทย ปี 2504-2547.

ผลสำเร็จที่ได้จากโครงการ

ผลสำเร็จเบื้องต้น จากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* Less ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในภาวะตับอักเสบจากพิษของแอลกอฮอล์

ผลสำเร็จกึ่งกลาง การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยน้ำ (water crude extract) มีฤทธิ์ลดการสร้างสารก่อการอักเสบ ไซโตคายด์ชนิด tumor necrosis factor - α ได้ในเซลล์ตับที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทานอลในปริมาณสูงและเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง ซึ่งคล้ายกับพยาธิสภาพของโรคตับจากแอลกอฮอล์ ถือว่าเป็นองค์ความรู้เบื้องต้นสำหรับการศึกษาด้านเภสัชพลศาสตร์ในเซลล์เพราะเลี้ยง เพื่อนำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าดอกขาวในสัตว์ทดลอง และมุ่งไปสู่การพัฒนาเป็นยาสมุนไพรมาตรฐานสำหรับโรคตับจากแอลกอฮอล์ต่อไป

ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

การนำเสนอผลการวิจัย ในรูปแบบโปสเตอร์และปากเปล่าในการสัมมนาระดับบัณฑิตศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ เพื่อถ่ายทอดความรู้ที่ได้จากผลการวิจัยแก่คณาจารย์ เภสัชกร นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาของคณะฯ

มหาวิทยาลัยนเรศวร