อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2561B003

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการแสดงออกของสารสื่อกลางอักเสบและเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอสในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

(Inhibitory effects of mulberry stem extract on the expression of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases in human chondrocytes)

รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนา พิทักษ์สุธีพงศ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 30 ก.ค. 2564
เลขทะเบียน 1041064
เลขเรียกหนังสือ ว QK 495 .M73 ท3635 2561

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร (แบบปกติ)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

// กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการแสดงออกของสารสื่อกลางอักเสบและเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอสในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ (Inhibitory effects of mulberry stem extract on the expression of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases in human chondrocytes) เป็นโครงการที่จัดทำขึ้นโดยได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยที่อนุมัติงบประมาณเป็นค่าใช้จ่ายของโครงการวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวธิดารัตน์ วงศ์วัฒน์ และนางสาวกัลยรัตน์ ศรีหะพล นิสิตปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดร. วรวรรณ บุญโญ วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก และ ดร.เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ในการดำเนินการวิจัยนี้ให้เสร็จสิ้นไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณท่านคณบดี ผู้บริหาร และเจ้าหน้าที่ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้สนับสนุน และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สถานที่และสาธารณูปโภคจนกระทั่งโครงการฯได้ดำเนินการเสร็จสิ้นลง

ทัศนา พิทักษ์สุธีพงศ์

ผู้วิจัย

มีนาคม 2561

แบบสรุปผู้บริหาร
(Executive summary)

สัญญาเลขที่ R2561B003

ชื่อโครงการ ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการแสดงออกของสารสื่อกลางอักเสบและ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอสในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

(Inhibitory effects of mulberry stem extract on the expression of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases in human chondrocytes)

หัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. ทัศนา พิทักษ์สุธีพงศ์

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โทรศัพท์ 055-961877 โทรสาร 055-963731 อีเมล์ tasanap@nu.ac.th

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในสภาวะปกติเซลล์กระดูกอ่อนจะมีการสร้างสารชีวเคมีต่างๆทดแทนกับส่วนที่ถูกสลายไป ทำให้กระดูกอ่อนสามารถคงสภาพ และทำงานได้อย่างปกติ แต่หากมีปัจจัยมารบกวนสมดุลระหว่างกระบวนการสังเคราะห์และการทำลายของสารชีวโมเลกุลต่างๆเหล่านี้จะส่งผลให้เซลล์กระดูกอ่อนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ นั่นคือ จะมีการสร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่สลายกระดูกอ่อนมากกว่าการสังเคราะห์ รวมทั้งยังหลั่ง cytokines เช่น TNF-α และ IL-1β มาช่วยเร่งกระบวนการสร้างเอนไซม์ที่ไปช่วยทำลายหรือย่อยสลายกระดูกอ่อนมากขึ้น เช่น MMP-1, MMP-3 และ MMP-13 นอกจากนี้ cytokines เหล่านี้ยังกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนผลิตสารสื่ออักเสบ เช่น nitric oxide และ PGE_2 ผ่านการควบคุมของยีน iNOS และ COX-2 ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อค่อยๆเสื่อมสภาพอย่างช้าๆนำไปสู่การเกิดโรคข้อเสื่อม (Wajanavisit et al., 2011; Shen et al., 2012) เมื่อมีการเคลื่อนไหวทำให้กระดูกบริเวณข้อต่อเกิดการเสียดสีกัน เกิดอาการบวมและปวดข้อ ข้อฝืดแข็ง ทำให้เกิดความยากลำบากในการเคลื่อนไหว ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ได้แก่ อายุ น้ำหนักตัว เพศ การนั่งยองๆ หรือนั่งพับเพียบนานๆ เป็นต้น ปัจจุบันมีวิธีการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมหลายวิธี เช่น การรักษาที่ไม่ใช้ยาจะเป็นการรักษาขั้นเริ่มต้น โดยการให้ความรู้เกี่ยวกับการดูแลตัวเองและการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม เช่น การลดน้ำหนัก การออกกำลังกาย การใช้ข้ออย่างถูกต้อง เป็นต้น ส่วนการรักษาด้วยวิธีการใช้ยา จะเป็นการบรรเทาอาการปวด ทำให้ผู้ป่วยสามารถเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น ซึ่งยาบรรเทาปวดที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น paracetamol และ codeine นอกจากนี้ยาต้านอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น diclofenac และ naproxen ซึ่งเป็นยาที่ใช้บ่อยที่สุดในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม แต่ยาเหล่านี้เมื่อใช้นานๆจะพบอาการข้างเคียง เช่น การระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ลำไส้ มึนศีรษะ ผื่นแดง หรือลมพิษ เป็นต้น ดังนั้นจึงมียากลุ่ม selective COX-2 inhibitor ซึ่งให้ประสิทธิภาพเท่ากับ nonselective NSAIDs และสามารถลดภาวะแทรกซ้อนด้านทางเดินระบบอาหารได้ดี แต่มีราคาแพงและอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนในระบบหลอดเลือดและหัวใจมากกว่า nonselective NSAIDs หากรักษาด้วยวิธีข้างต้นไม่ได้ผลก็จะรักษาโดย

การผ่าตัด (พิพัฒน์ เพิ่มพูน, 2553) ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรจากธรรมชาติที่หาได้ในประเทศ และมีความปลอดภัยสูง น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งของการบรรเทาอาการข้ออักเสบได้

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดโคนต้นหม่อนใน RAW 264.7 macrophage cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) และพบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide และยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และเอนไซม์ COX-2 ได้ (Soonthornsit, 2015) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาฤทธิ์ลดอาการปวดของสารสกัดโคนต้นหม่อนในแบบจำลองโรคเข่าเสื่อมในหนู ซึ่งชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเส้นเอ็นที่เข่าที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACL) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ โดยขึ้นกับขนาด (dose) ของสารสกัด และที่ขนาด (dose) สารสกัด 560 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดข้อเข่าได้ดีกว่ากลูโคซามีนที่ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Khunakornvichaya et al., 2012; Khunakornvichaya et al., 2016) จากผลการศึกษาขั้นต้น ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า "สารสกัดโคนต้นหม่อนมีศักยภาพในการนำมาใช้ในโรคข้อเสื่อมได้" ดังนั้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงศักยภาพของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการนำมาใช้ในโรคข้อเสื่อม โดยการประเมินจากฤทธิ์ของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการยับยั้งการแสดงออกของสารสื่อกลางอักเสบ คือ nitric oxide, iNOS, COX-2, PGE_2 และ ฤทธิ์การลดการสร้างเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอส โดยศึกษาในแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

<u>วัตถุประสงค์ของโครงการ</u>

วัตถุประสงค์หลัก

- เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการแสดงออกของสารสื่อกลางอักเสบและเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอสในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

วัตถุประสงค์จำเพาะ

- ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางอักเสบ คือ nitric oxide, iNOS, COX-2, PGE_2 ของสารสกัดโคนต้นหม่อน
- ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง enzyme matrix metalloproteinases ของสารสกัดโคนต้น

<u>ผลการวิจัย</u>

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อน (ความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซิจิเนส-2 ได้ร้อยละ 17.22 -65.02 และการผลิตสารสื่ออักเสบพรอสตาแกลนดินอี 2 ได้ร้อยละ 44.36 – 92.64 หากแต่ การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตสและไนตริกออกไซด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ไม่สามารถตอบสนองต่อการผลิตโปรตีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตส และไนตริกออกไซด์ได้ แต่อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 และพบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ นอกจากฤทธิ์ต้านอักเสบแล้ว การศึกษานี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์การปกป้องกระดูกอ่อนผิว

ข้อซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการผลิตเอ็มเอ็มพี-13 ได้ร้อยละ 13.57-57.29

<u>ผลสำเร็จของโครงการที่ได้รับ</u>

1. **โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยของนิสิตมหาบัณฑิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง และได้ผลิตมหาบัณฑิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง จำนวน 1 ท่าน**
2. **นำเสนอในงานประชุม** (Poster presentation)

   <u>Thidarat Wongwat</u>, Tasana Pitaksuteepong (2018) Effects of *Morus alba* L. stem extract and its marker on the inhibition of PGE_2 and MMP-13 production. The 2018 International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress X), Jomtien Palm Beach, Pattaya, Chonburi, Thailand. July 4-7, 2018.

3. **ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ** (International Journal)

   Thidarat Wongwat, Kanyarat Srihaphon, Chetsadaporn Pitaksutheepong, Worawan Boonyo and Tasana Pitaksuteepong (2019) Suppression of inflammatory mediators and matrix metalloproteinase (MMP)-13 by *Morus alba* stem extract and oxyresveratrol in RAW 264.7 cells and C28/I2 human chondrocytes. Journal of Traditional and Complementary Medicine (Accepted for publication).

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์การปกป้องกระดูกอ่อนผิวข้อของสารสกัดโคนต้นหม่อนในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า สารสกัดโคนต้นหม่อน เตรียมโดยวิธีแช่หมัก วิเคราะห์ปริมาณออกซีเรสเวอราทรอลซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ทดสอบโดยวิธีเอ็มทีที ฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดประเมินจากผลในการยับยั้งการสร้างพรอสตาแกลนดินอี 2 และไนตริกออกไซด์โดยวิธี อีไลซ่า และ Griess ตามลำดับ นอกจากนี้ ผลของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซิจิเนส-2 และ อินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตส ถูกประเมินด้วยเทคนิค western blot ส่วนฤทธิ์ปกป้องกระดูกอ่อนผิวข้อของสารสกัดโคนต้นหม่อนประเมินจากการยับยั้งเอนไซม์แมททริกซ์เมททอลโลโปรติเนส (เอ็มเอ็มพี)-13 โดยวิธี อีไลซ่า ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากโคนต้นหม่อนที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม และมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับร้อยละ 4.08 โดยน้ำหนักเทียบกับน้ำหนักเนื้อไม้แห้ง ปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอทรอลในสารสกัดพบร้อยละ 15.06 โดยน้ำหนักเทียบกับน้ำหนักสารสกัดแห้ง เซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีชีวิตรอดมากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้น จึงคัดเลือกสารสกัดที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อน (ความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซิจิเนส-2 ได้ร้อยละ 17.22 -65.02 และการผลิตสารสื่ออักเสบพรอสตาแกลนดินอี 2 ได้ร้อยละ 44.36 – 92.64 หากแต่ การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตสและไนตริกออกไซด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ไม่สามารถตอบสนองต่อการผลิตโปรตีนอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเตส และไนตริกออกไซด์ได้ แต่อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 และพบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ นอกจากฤทธิ์ต้านอักเสบแล้ว การศึกษานี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์การปกป้องกระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการผลิตเอ็มเอ็มพี-13 ได้ร้อยละ 13.57-57.29 กล่าวโดยสรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการยับยั้งการผลิตโปรตีนไซโคลออกซิจิเนส-2 และพรอสตาแกลนดินอี 2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า และพบผลของสารสกัดในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาแรก ที่ค้นพบฤทธิ์การปกป้องกระดูกอ่อนผิวข้อของสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยการยับยั้งการสร้างเอ็มเอ็มพี-13 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย

อินเตอร์ลิวคินวันเบต้า จึงสรุปได้ว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนมีศักยภาพในการลดการอักเสบ และชะลอการสลายกระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือยาสมุนไพรสำหรับโรคข้อเสื่อม แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาในขั้นต่อไปควรศึกษาถึงกลไกที่ชัดเจนขึ้น

คำสำคัญ: หม่อน, โรคข้ออักเสบ, ไนตริกออกไซด์, ไซโคลออกซิจิเนส-2, แมททริกซ์เมททอลโลโปรติเนส, เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

Abstract

The present study aimed to investigate anti-inflammatory and chondroprotective activities of *Morus alba* stem extract in IL-1β-induced C28/I2 human chondrocytes. *M. alba* stem extract was prepared by maceration technique. The content of oxyresveratrol, a bioactive compound, in the extract was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The effects *M. alba* stem extract at various concentrations on cell viability were measured by MTT assay. For anti-inflammatory activity, prostaglandin (PG)-E_2 and nitric oxide (NO) production were measured using ELISA and Griess assay, respectively. Also, cyclooxygenase (COX)-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) proteins expression were evaluated by using western blotting analysis. For chondroprotective effect, matrix metalloproteinase (MMP)-13 production was measured using ELISA assay. The results showed that the crude extract was dark brown color and the percentage yield was 4.08%w/w based on dry weight of the stem wood. The content of oxyresveratrol in the extract was 15.06%w/w based on dry weight of *M. alba* stem extract. *M. alba* stem extract at concentrations of 10 to 100 μg/ml yielded the cell viability of C28/I2 human chondrocytes higher than 80%. The extract at concentrations of 5, 25, 50 and 100 μg/ml were chosen for subsequent tests. It was observed that *M. alba* stem extract (5-100 μg/ml) suppressed the expression of COX-2 protein by 17.22-65.02% and inhibited the production of PGE_2 by 44.36-92.64%. Unfortunately, it was found that the immortalized C28/I2 human chondrocyte cells did not express detectable iNOS protein and NO, even in IL-1β-induced cell group. However, these effects were confirmed with the above results in RAW 264.7 macrophages. Apart from inflammation, the degradation of collagen in articular cartilage is one of key feature involving in osteoarthritis. *M. alba* stem extract at concentration of 5-100 μg/ml also showed the chondroprotective effect through inhibition of MMP-13 production by 13.57-57.29%. In conclusion, this study clearly demonstrates the effects of *M. alba* stem extract on the suppression of both COX-2 protein and PGE_2 production in IL-1β-induced C28/I2 human chondrocytes. The inhibition of NO production of *M. alba* stem extract is also shown in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. In addition, the chondroprotective effect of *M. alba* stem extract by inhibiting MMP-13 production in IL-1β-induced C28/I2 human chondrocytes is first proved in this study. Therefore, it can be concluded that *M. alba* stem extract shows promising potential

for relieving inflammation and slowing down cartilage breakdown which may be beneficial as dietary supplements or herbal medicines for osteoarthritis. However, further investigations are required to determine the exact mechanisms

Keywords: *Morus alba* L. , Osteoarthritis, Nitric oxide, Cyclooxygenase- 2, Matrix metalloproteinases, Human chondrocytes

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	i
บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	ii
บทคัดย่อ (ไทย)	v
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	vii
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	viii
สารบัญตาราง (List of Tables)	xi
สารบัญภาพ (List of Figures)	xii
บทที่ 1 บทนำ (Introduction)	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม (Literature review)	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย (Research methodology)	
สารเคมี และเครื่องมือ (Materials and Equipments)	7
วิธีการดำเนินการศึกษา (Methods)	10
พืชทดสอบ	10
การเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน	10
การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอราทรอลโดยใช้เทคนิค HPLC	10
การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์	11
การเตรียมสารทดสอบ	11
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay	11
การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide	12
การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน inducible nitric oxide synthase	13
การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน cyclooxygenase-2	13

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง Prostaglandin E_2	14
การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง Matrix metalloproteinase 13 (MMP-13)	14
การวิเคราะห์ทางสถิติ	15
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา (Results and Discussion)	
สารสกัดโคนต้นหม่อน	16
การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอราทรอลในสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยเทคนิค HPLC	16
ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์	16
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์	17
ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง NO	18
ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS	20
ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2	21
ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง PGE_2	22
ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง MMP-13	23
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา (Conclusion)	24
เอกสารอ้างอิง (References)	25
ภาคผนวก	
ผลสำเร็จของโครงการ (Research output)	28
ตารางแสดงรายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการเปรียบเทียบกับที่ตั้งไว้	29

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้า
ตารางที่ 4-1	ความเข้มข้นของสารไนไตรท์ (NO_2^-) ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ได้รับสารตัวอย่างและถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	18
ตารางที่ 4-2	ความเข้มข้นของสารไนไตรท์ (NO_2^-) ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ได้รับสารตัวอย่างและถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	19
ตารางที่ 4-3	ความเข้มข้นของสารไนไตรท์ (NO_2^-) ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 5, 10 และ 15 ng/ml เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	19

สารบัญภาพ (List of Figures)

		หน้า
รูปที่ 2-1	ร้อยละการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 ซึ่งกระตุ้นด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ โดยบ่มเซลล์ (1.875 x 10^5 cells/mL) กับสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้น 20ม 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือออกซีเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 5, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือไดโคฟีแนค 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์โดย Griess assay	5
รูปที่ 2-2	ภาพแสดงตำแหน่งของเอ็นไขว้หน้าของข้อเข่า (Anterior cruciate ligament; ACL)	5
รูปที่ 2-3	ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อน (5.6, 56 and 560 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลงในการลงน้ำหนักที่เท้าหนูที่มีการตัดเอ็นข้อเข่าเพื่อให้เกิดอาการคล้ายอาการของโรคข้อเข่าอักเสบ โดยใช้กลูโคซามีนที่ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นสารควบคุม	6
รูปที่ 4-1	สารสกัดจากโคนต้นหม่อน	16
รูปที่ 4-2	เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ (C28/I2 human chondrocyte cell line)	16
รูปที่ 4-3	ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์	17
รูปที่ 4-4	ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control (แท่ง 2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01	20
รูปที่ 4-5	ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control (แท่ง 2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01	21

สารบัญภาพ (List of Figures) (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 4-6	ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการสร้างสารสื่ออักเสบ PGE_2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control (แท่ง 2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01	22
รูปที่ 4-7	ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง MMP-13 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ * และ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และ 0.01	23

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

ในสภาวะปกติเซลล์กระดูกอ่อนจะมีการสร้างสารชีวเคมีต่างๆทดแทนกับส่วนที่ถูกสลายไป ทำให้กระดูกอ่อนสามารถคงสภาพ และทำงานได้อย่างปกติ แต่หากมีปัจจัยมารบกวนสมดุลระหว่างกระบวนการสังเคราะห์และการทำลายของสารชีวโมเลกุลต่างๆเหล่านี้จะส่งผลให้เซลล์กระดูกอ่อนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ นั่นคือ จะมีการสร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่สลายกระดูกอ่อนมากกว่าการสังเคราะห์ รวมทั้งยังหลั่ง cytokines เช่น TNF-α และ IL-1β มาช่วยเร่งกระบวนการสร้างเอนไซม์ที่ไปช่วยทำลายหรือย่อยสลายกระดูกอ่อนมากขึ้น เช่น MMP-1, MMP-3 และ MMP-13 นอกจากนี้ cytokines เหล่านี้ยังกระตุ้นให้เซลล์กระดูกอ่อนผลิตสารสื่ออักเสบ เช่น nitric oxide และ PGE_2 ผ่านการควบคุมของยีน iNOS และ COX-2 ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อค่อยๆเสื่อมสภาพอย่างช้าๆนำไปสู่การเกิดโรคข้อเสื่อม (Wajanavisit et al., 2011; Shen et al., 2012) เมื่อมีการเคลื่อนไหวทำให้กระดูกบริเวณข้อต่อเกิดการเสียดสีกัน เกิดอาการบวมและปวดข้อ ข้อฝืดแข็ง ทำให้เกิดความยากลำบากในการเคลื่อนไหว ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ได้แก่ อายุ น้ำหนักตัว เพศ การนั่งยองๆ หรือนั่งพับเพียบนานๆ เป็นต้น ปัจจุบันมีวิธีการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมหลายวิธี เช่น การรักษาที่ไม่ใช้ยาจะเป็นการรักษาขั้นเริ่มต้น โดยการให้ความรู้เกี่ยวกับการดูแลตัวเองและการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม เช่น การลดน้ำหนัก การออกกำลังกาย การใช้ข้ออย่างถูกต้อง เป็นต้น ส่วนการรักษาด้วยวิธีการใช้ยา จะเป็นการบรรเทาอาการปวด ทำให้ผู้ป่วยสามารถเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น ซึ่งยาบรรเทาปวดที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น paracetamol และ codeine นอกจากนี้ยาต้านอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น diclofenac และ naproxen ซึ่งเป็นยาที่ใช้บ่อยที่สุดในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม แต่ยาเหล่านี้เมื่อใช้นานๆจะพบอาการข้างเคียง เช่น การระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ลำไส้ มึนศีรษะ ผื่นแดง หรือลมพิษ เป็นต้น ดังนั้นจึงมียากลุ่ม selective COX-2 inhibitor ซึ่งให้ประสิทธิภาพเท่ากับ nonselective NSAIDs และสามารถลดภาวะแทรกซ้อนด้านทางเดินระบบอาหารได้ดี แต่มีราคาแพงและอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนในระบบหลอดเลือดและหัวใจมากกว่า nonselective NSAIDs หากรักษาด้วยวิธีข้างต้นไม่ได้ผลก็จะรักษาโดยการผ่าตัด (พิพัฒน์ เพิ่มพูน, 2553) ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรจากธรรมชาติที่หาได้ในประเทศ และมีความปลอดภัยสูง น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งของการบรรเทาอาการข้ออักเสบได้

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดโคนต้นหม่อนใน RAW 264.7 macrophage cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) และพบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide และยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และเอนไซม์ COX-2 ได้ (Soonthornsit, 2015) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาฤทธิ์ลดอาการปวดของสารสกัดโคนต้นหม่อนในแบบจำลองโรคเข่าเสื่อมในหนู ซึ่งชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเส้นเอ็นที่เข่าที่มีชื่อว่า anterior

cruciate ligament (ACL) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ โดยขึ้นกับขนาด (dose) ของสารสกัด และที่ขนาด (dose) สารสกัด 560 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดข้อเข่าได้ดีกว่ากลูโคซามีนที่ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Khunakornvichaya et al., 2012; Khunakornvichaya et al., 2016) จากผลการศึกษาขั้นต้น ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า “สารสกัดโคนต้นหม่อนมีศักยภาพในการนำมาใช้ในโรคข้อเสื่อมได้” ดังนั้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงศักยภาพของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการนำมาใช้ในโรคข้อเสื่อม โดยการประเมินจากฤทธิ์ของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการยับยั้งการแสดงออกของสารสื่อกลางอักเสบ คือ nitric oxide, iNOS, COX-2, PGE_2 และ ฤทธิ์การลดการสร้างเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอส โดยศึกษาในแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 2

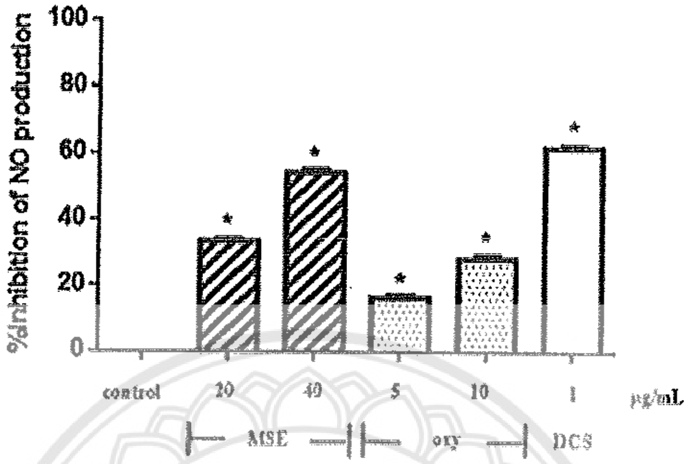
การทบทวนวรรณกรรม

(Literature review)

กระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) ประกอบด้วยเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) ที่ฝังตัวอยู่ภายในเมทริกซ์ (extracellular matrix) ซึ่งเซลล์กระดูกอ่อนจะทำหน้าที่สร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆที่เป็นองค์ประกอบหลักของกระดูกอ่อน เช่น collagen, proteoglycans, hyaluronan และ link protein ออกจากเซลล์มาสู่เมทริกซ์ นอกจากนี้เซลล์กระดูกอ่อนยังสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น proteases ทำหน้าที่สลายโปรตีน, collagenases ทำหน้าที่สลายคอลลาเจน และ MMPs ทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานของ collagenases ในการสลายเมทริกซ์ (Wajanavisit et al., 2011) ในสภาวะปกติเซลล์กระดูกอ่อนจะมีการสร้างสารชีวเคมีต่างๆเหล่านี้ทดแทนกับส่วนที่ถูกสลายไป ทำให้กระดูกอ่อนสามารถคงสภาพ และทำงานได้อย่างปกติ แต่หากมีปัจจัยมารบกวนสมดุลระหว่างกระบวนการสังเคราะห์และการทำลายของสารชีวโมเลกุลต่างๆเหล่านี้จะส่งผลให้เซลล์กระดูกอ่อนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ นั่นคือ มีการสร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่สลายเมทริกซ์เพิ่มมากขึ้นในขณะที่การสังเคราะห์เมทริกซ์คงที่ รวมทั้งหลั่ง cytokine ที่ก่ออักเสบ เช่น IL-1β, IL-6 และ tumor necrosis factor (TNF) -α มาช่วยเร่งกระบวนการสร้างเอนไซม์ที่ไปช่วยย่อยสลายกระดูกอ่อนมากขึ้นเรื่อยๆ อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ซึ่งมีหน้าที่หลักในการยับยั้งการสังเคราะห์เมทริกซ์และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเมทริกซ์ นอกจากนั้น cytokine เหล่านี้ยังกระตุ้นการสร้าง prostaglandin E_2 ซึ่งจะไปเพิ่มการผลิต MMPs เช่น MMP-1, MMP-3 และ MMP-13 และสารก่ออักเสบ ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อค่อยๆเสื่อมสภาพอย่างช้าๆนำไปสู่การเกิดโรคข้อเสื่อม (Wajanavisit et al., 2011; Shen et al., 2012) เมื่อมีการเคลื่อนไหวทำให้กระดูกบริเวณข้อต่อเกิดการเสียดสีกัน เกิดอาการบวมและปวดข้อ ข้อฝืดแข็ง ทำให้เกิดความยากลำบากในการเคลื่อนไหว ยาต้านการอักเสบที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันมักจะมีวัตถุประสงค์ในการบรรเทาอาการปวด ทำให้ผู้ป่วยสามารถเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น ซึ่งยาบรรเทาปวดที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น paracetamol และ codeine นอกจากนี้ยาต้านอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น diclofenac และ naproxen ซึ่งเป็นยาที่ใช้บ่อยที่สุดในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม แต่ยาเหล่านี้เมื่อใช้นานๆจะพบอาการข้างเคียง เช่น การระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ลำไส้ มึนศีรษะ ผื่นแดง หรือลมพิษ เป็นต้น ดังนั้นจึงมียากลุ่ม selective COX-2 inhibitor ซึ่งให้ประสิทธิภาพเท่ากับ nonselective NSAIDs และสามารถลดภาวะแทรกซ้อนด้านทางเดินระบบอาหารได้ดี แต่มีราคาแพงและอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนในระบบหลอดเลือดและหัวใจมากกว่า nonselective NSAIDs หากรักษาด้วยวิธีข้างต้นไม่ได้ผลก็จะรักษาโดยการผ่าตัด (พิพัฒน์ เพิ่มพูน, 2553) ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรจากธรรมชาติที่หาได้ในประเทศ และมีความปลอดภัยสูง น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งของการบรรเทาอาการข้ออักเสบได้

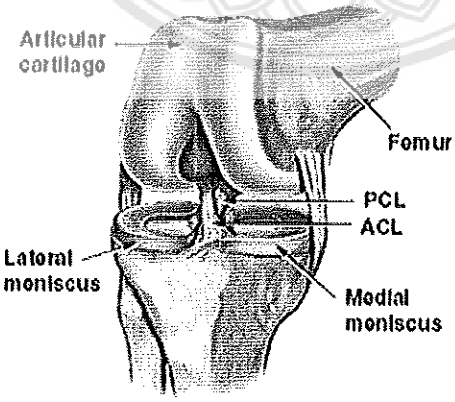
หม่อน (Mulberry) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus alba* Linn. เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ เปลือกต้นมีสีน้ำตาล ลำต้นตั้งตรง ใบเดี่ยว ดอกช่อ ผลอวบน้ำ เมื่อสุกจะมีสีม่วงแดง หม่อนเป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในแถบเอเชีย ประเทศจีนใช้เปลือกราก กิ่งอ่อน ใบ และผล ในการรักษาอาการไอ ขับปัสสาวะ และโรคปวดข้อ (Zhishen et al., 1999; Nanakorn et al., 2001) ปัจจุบันสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ได้มีการส่งเสริมให้ชาวบ้านปลูกหม่อนแทนการทำไร่เลื่อนลอย เพื่อสร้างรายได้ให้ชุมชนโดยการให้ชาวบ้านปลูกหม่อนและขายใบหม่อนให้กับศูนย์หม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เพื่อนำไปเป็นอาหารของหนอนไหม อันเป็นวัตถุดิบสำคัญที่นำไปทำเป็นผ้าไหมลวดลายต่างๆ นอกจากนี้ยังมีการนำส่วนอื่นๆของหม่อนมาใช้ประโยชน์ เช่น ไอศกรีมผลหม่อน น้ำผลหม่อน เยลลี่ผลหม่อน และชาใบหม่อน เป็นต้น แต่ยังไม่พบการนำมาใช้เพื่อบรรเทาอาการปวด อักเสบ ของโรคข้อเสื่อม จากการวิจัยก่อนหน้า พบว่า สารสกัดจากส่วนต่างๆของหม่อนมีสาร oxyresveratrol ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยพบว่าสารสกัดที่เตรียมได้จากส่วนลำต้นของหม่อนมีปริมาณสาร oxyresveratrol มากกว่าส่วนของกิ่งและใบ (Thongsuk, 2007) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของหม่อนพบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide โดยยับยั้งการหลั่ง iNOS ได้ใน RAW 264.7 macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อีกทั้งยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ oxyresveratrol ในสัตว์ทดลองโดยการกระตุ้นให้หนูเกิดการบวมของอุ้งเท้าด้วยการฉีด 1% w/v carrageenan solution เข้าใต้ผิวหนังอุ้งเท้าหนู หลังจากที่ให้หนูกินสารทดสอบ พบว่า oxyresveratrol สามารถช่วยลดอาการบวมได้ดี (Chung et al., 2003) นอกจาก oxyresveratrol แล้ว ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากหม่อนใน RAW 264.7 macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่าสารสกัดใบหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide โดยยับยั้งการหลั่ง iNOS และสามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ได้ ส่งผลให้หยุดการสังเคราะห์ PGE_2 นอกจากนี้สารสกัดจากใบหม่อนยังสามารถยับยั้งการสร้าง TNF-α, IL-1β และ IL-6 ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokines ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและการย่อยสลายของกระดูกอ่อนได้ (Choi and Hwang, 2005; Park et al., 2013) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Soonthornsit (2017) ซึ่งได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดโคนต้นหม่อนใน RAW264.7 macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และพบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (รูปที่ 2-1) (Soonthornsit, 2013) และสามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ได้เช่นกัน (Soonthornsit, 2017) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ลดอาการปวดของสารสกัดโคนต้นหม่อนในแบบจำลองโรคเข่าเสื่อมในหนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar ซึ่งชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเส้นเอ็นที่เข่าที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACL) (รูปที่ 2-2) หลังจากที่หนูเกิดอาการข้อเข่าเสื่อม (สัปดาห์ที่ 5) ได้ให้สารทดสอบ คือสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ 5.6, 56 และ 560 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกลูโคซามีน 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้น ประเมินฤทธิ์บรรเทาปวดโดยวัดการลงน้ำหนักที่เท้าหลังหนู (hind limb weight bearing) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากโคนต้น

หม่อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดได้ โดยขึ้นกับขนาด (dose) ของสารสกัด และที่ dose สารสกัด 560 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดข้อเข่าได้ดีกว่ากลูโคซามีนที่ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (รูปที่ 2-3) (Khunakornvichaya et al., 2012; Khunakornvichaya et al., 2016)



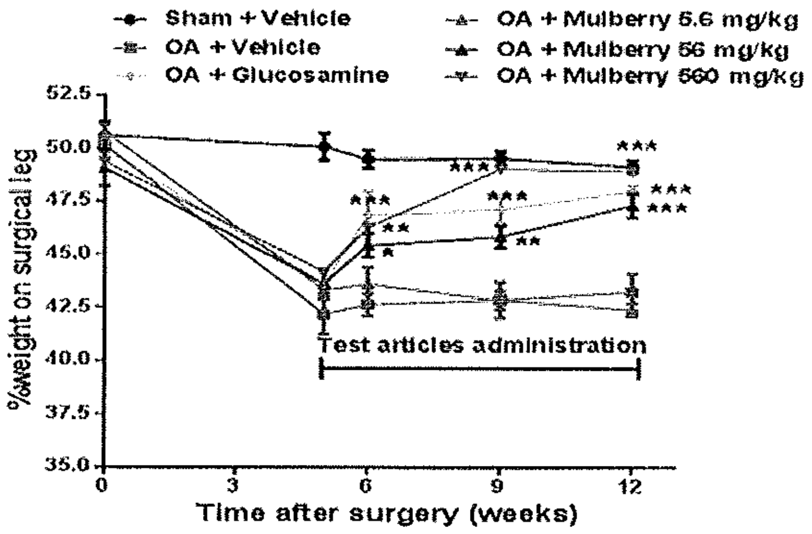
รูปที่ 2-1 ร้อยละการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 ซึ่งกระตุ้นด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ โดยบ่มเซลล์ (1.875×10^5 cells/mL) กับสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้น 20ม 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือออกซีเรสเวอราทรอล ความเข้มข้น 5, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือไดโคฟีแนค 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์โดย Griess assay

ที่มา: Soonthornsit et al., 2013



รูปที่ 2-2 ภาพแสดงตำแหน่งของเอ็นไขว้หน้าของข้อเข่า (Anterior cruciate ligament; ACL)

ที่มา: http://www.thaimedicalnews.com/wp-content/uploads/acl.jpg



รูปที่ 2-3 ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อน (5.6, 56 and 560 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลงในการลงน้ำหนักที่เท้าหนูที่มีการตัดเอ็นข้อเข่าเพื่อให้เกิดอาการคล้ายอาการของโรคข้อเข่าอักเสบ โดยใช้กลูโคซามีนที่ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นสารควบคุม

ที่มา: Khunakornvichaya et al., 2016

จากผลการศึกษาที่แสดง ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า "สารสกัดโคนต้นหม่อนมีศักยภาพในการนำมาใช้ในโรคข้อเสื่อมได้" ดังนั้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงศักยภาพของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการนำมาใช้ในโรคข้อเสื่อม โดยการประเมินจากฤทธิ์ของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการยับยั้งการแสดงออกของสารสื่อกลางอักเสบ คือ nitric oxide, iNOS, COX-2, PGE_2 และ ฤทธิ์การลดการสร้างเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเอส โดยศึกษาในแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

(Research methodology)

สารเคมี และเครื่องมือ

สารเคมี:

1). 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

2). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; MTT (Thermo Scientific™, Eugene, Oregon, USA)

3). Acetonitrile (HPLC grade, RCI Labcan, Bangkok, Thailand)

4). Acryl/Bis (40% w/v) Solution (AMRESCO®, Massachusetts, USA)

5). Ammonium persulphate (Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand)

6). Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase mouse monoclonal antibody (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

7). Bromophenol Blue, Sodium Salt (EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Germany)

8). C28/I2 Human Chondrocyte Cell Line (Merck Millipore, Temecula, California)

9). COX-2 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)

10). Diclofenac sodium; DCS (Pharmaceutical grade, Suzhou Ausun Chemical Co., Ltd., Zhejiang, China)

11). Dimethyl sulfoxide; DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

12). Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM high glucose (Cell culture grade, Invitrogen, Eggenstein, Germany)

13). Ethanol 95% (Commercial product, TTK-Science, Bangkok, Thailand)

14). Fetal bovine serum; FBS (Cell culture grade, Invitrogen, Eggenstein, Germany)

15). Glucosamine sulfate (Taizhou City Fengrun Biochemical Co., Ltd., Taizhou, China)

16). Goat Anti-Mouse IgG (H&L) Peroxidase conjugated Affinity Purified Antibody (Merck Millipore, Temecula, California)

17). Human MMP-13 ELISA Kit (Thermo Scientific™, Rockford, Illinois, USA)

18). Immobilon®-P Transfer Membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

19). L-glutamine (Cell culture grade, Invitrogen, Eggenstein, Germany)

20). Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

21). NOS2 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)

22). Methanol (HPLC grade, RCI Labcan, Bangkok, Thailand)

23). N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

24). Oxyresveratrol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

25). Penicillin Streptomycin (Pen Strep) (Cell culture grade, Invitrogen, Eggenstein, Germany)

26). Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, Rockford, Illinois, USA)

27). Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

28). Potassium dihydrogen orthophosphate (Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand)

29). Prostaglandin E_2 Assay Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA)

30). Recombinant Human IL-1β (Merck Millipore, Temecula, California)

31). Skim milk (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India)

32). Sodium dodecyl sulphate (Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand)

33). Sodium hydroxide (Analytical grade, Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand)

34). Sulfanilamide (AppliChem GmbH-An ITW Company, Darmstadt, Germany)

35). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Germany)

36). Triton® X-100 (AMRESCO®, Massachusetts, USA)

37). Trypsin-EDTA 0.25% w/v (Cell culture grade, Invitrogen, Eggenstein, Germany)

วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

1). 6-well cell culture plate (SPL Lifesciences, Gyeonggi-do, Korea)

2). C-18 Reverse phase HPLC column (Gemini, 5μm C18, 150 × 4.60 mm, Phenomenex, Torrance, USA)

3). Cell culture flask (SPL Lifesciences, Gyeonggi-do, Korea)

4). ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)

5). Conical tube (SPL Lifesciences, Gyeonggi-do, Korea)

6). Hemocytometer (BOECO, Hamburg, Germany)

7). High performance liquid chromatography; HPLC (LC-10AT, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a UV-Vis detector (SPD-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan), an auto sampler (UFLC, Shimadzu, Kyoto, Japan) and column oven (CTO-10 AS VP, Shimadzu, Kyoto, Japan)

8). Light microscope (Motic, Kowloon, Hongkong)

9). Microplate reader (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, USA)

10). Midi Plus Pipette Controller (Sartorius Biohit Liquid Handing Oy, Helsinki, Finland)

11). Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)

12). Nylon Membrane Filters, 47 mm, 0.45 μm (Vertical®, Bangkok, Thailand)

13). pH meter (PB-10, Sartorius Biohit Liquid Handing Oy, Helsinki, Finland)

14). Proline® Plus Mechanical Pipette (Sartorius Biohit Liquid Handing Oy, Helsinki, Finland)

15). Puradisc™ 25 mm Sterile and Endotoxin free 0.2 μm PES Filter

16). Rotary evaporator (R-210, Buchi, Flawil, Switzerland)

17). Serological Pipette (SPL Lifesciences, Gyeonggi-do, Korea)

18). Syringe needle slip (Nipro (Thailand) Co., Ltd., Phra Nakhon Si Ayutthaya, Thailand)

19). Water bath (M25 Lauda, Deutshland, Germany)

วิธีการดำเนินการศึกษา

1. พืชทดสอบ

หม่อน (Mulberry) พันธุ์บุรีรัมย์ 60 อายุประมาณ 15 ปี ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus alba* L. ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดตาก มาปอกเปลือกออก จากนั้นสับให้มีขนาดเล็ก แล้วนำไปอบให้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน

การสกัดทำโดยการแช่หมัก (maceration) โดยจะนำโคนต้นหม่อนแช่หมักในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเอาของเหลวออก แล้วแช่หมักในตัวทำละลายเอทานอลอีกครั้ง จากนั้นกรองสารละลาย และนำของเหลวที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator, R-210, Buchi, Flawil, Switzerland) และนำไประเหยแห้งบนหม้ออังไอน้ำ (Water bath, M25 Lauda, Deutshland, Germany) จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (% Yield) จากสมการ

ร้อยละของผลผลิต = (ปริมาณสารสกัดที่ได้ / น้ำหนักกิ่งหม่อนแห้ง) × 100

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอราทรอลโดยใช้เทคนิค HPLC

3.1. สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Yhirayha (6.1) ซึ่งมีสภาวะที่ใช้ (Condition) ดังนี้

Flow rate: 1 ml/min

Detector: UV-Vis detector, λ_{max} 320 nm

Column oven temperature: 30 °C

Injection volume: 20 µl

Column: C18 Reverse phase (Gemini, 5 µm, 150 × 4.6 mm, Phenomenax, USA)

Mobile phase: Acetonitrile : 0.05 M phosphate buffer (ratio 1:3) pH 3

Running time: 13 นาที

3.2 การเตรียมสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล (Oxyresveratrol standard curve)

เตรียมสารมาตรฐานออกซีเรสเวอทรอลความเข้มข้น 1 mg/ml โดยละลายในเมทนอล จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5 - 100 μg/ml กรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 0.45 μm ก่อนจะนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

3.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 1 mg/ml โดยละลายในเมทานอล จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/ml แล้วกรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 0.45 μm ก่อนจะนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์

เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ C28/I2 human chondrocyte cell line ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS) 10%, L-glutamine 1% และยาปฏิชีวนะ 1% (penicillin 100 U/ml + streptomycin 100 μg/ml ในตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นร้อยละ 80-90 เซลล์จะถูกทำการ sub-cultured โดยเซลล์จะถูกทำให้หลุดออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ด้วย 0.25% (w/v) trypsin-EDTA

5. การเตรียมสารทดสอบ

5.1 สารสกัดโคนต้นหม่อน (*M. alba* stem extract, MSE)

เตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 100 mg/ml โดยละลายใน DMSO จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ต้องการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วกรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 0.22 μm ที่ปราศจากฆ่าเชื้อ ก่อนจะนำไปใช้ทดสอบกับเซลล์

5.2 ไดโคลฟีแนค โซเดียม (Diclofenac sodium, DCS)

เตรียมสารละลายไดโคลฟีแนค โซเดียมความเข้มข้น 5 mg/ml โดยละลายในน้ำ จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ต้องการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วกรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 0.22 μm ที่ปราศจากฆ่าเชื้อ ก่อนจะนำไปใช้ทดสอบกับเซลล์

6. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) โดยการวัดความสามารถของ mitochondrial enzyme ในการเปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, MTT) ซึ่งมีสีเหลือง ไปเป็น formazan product ซึ่งเป็นสารประกอบสีม่วง โดยระดับของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ วิธีการทดสอบคือนำเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์มา

เพาะเลี้ยงในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 well plate) โดยมีความหนาแน่น 4,000 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัม (5, 25, 50 และ 100 μg/ml) ลงในหลุมที่เตรียมไว้ บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวกระตุ้น IL-1β 10 ng/ml บ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์จนครบ 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม MTT 0.5 mg/ml ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมลงในหลุม หลุมละ 100 μl และนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเติม DMSO 100 μl ลงในแต่ละหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (%Cell viability) กลุ่มทดสอบที่มีร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ตั้งแต่ร้อยละ 80 ขึ้นไปจะถูกพิจารณาว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์

$$\%\ \text{Cell viability} = \left(\frac{\text{Absorbance value of test sample-Absorbance value of blank}}{\text{Absorbance value of control- Absorbance value of blank}}\right) \times 100$$

7. **การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO)**

เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6 well plate) โดยมีความหนาแน่น 2×10^6 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 10, 50, 100 μg/ml ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมลงในหลุมที่เตรียมไว้ และมี DCS 10 μg/ml เป็นสารควบคุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม IL-1β ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้าง NO แล้วบ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์จนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารละลายในแต่ละหลุม (cell supernatant) มาทดสอบความเข้มข้นของ Nitrite (NO_2^-) ด้วยวิธี Griess reaction ดังนี้ เติม cell supernatant 100 μl ลงใน 96 well plate จากนั้นเติม Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) ลงไป หลุมละ 50 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 0.1% N-1-(naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ลงไป หลุมละ 50 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 548 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาความเข้มข้นของ Nitrite จากกราฟมาตรฐานโซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite standard curve)

8. **การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน inducible nitric oxide synthase (iNOS)**

เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6 well plate) โดยมีความหนาแน่น 2×10^6 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมตัวอย่างทดสอบต่างๆ ดังนี้ MSE 5, 25, 50, 100 µg/ml และ DCS 10 µg/ml ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมลงในหลุมที่เตรียมไว้ บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม IL-1β ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้าง iNOS แล้วบ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์จนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและทำการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ด้วยสารละลาย lysis buffer จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนรวมก่อนจะทำการแยกโปรตีน iNOS ใน 12% Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) gel โดยการผสมตัวอย่างกับ 5X loading dye แล้วนำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 120 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที นำแผ่นเจลด้านหนึ่งย้อมสี Coomassie blue ส่วนแผ่นเจลอีกด้านหนึ่งนำมาทำ western blotting โดยการเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนแผ่นเมมเบรน (polyvinylidene fluoride membrane) ด้วยเครื่อง transfer protein electrophoretic apparatus เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ได้มาแช่ใน 5% skim milk solution ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.05% Tween 20 ใน PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนที่ล้างแล้วบ่มด้วย iNOS mouse monoclonal เจือจาง 1:500 และ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) mouse monoclonal antibody เจือจาง 1:1,000 ใน 5% skim milk solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.05% Tween 20 ใน PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วบ่มด้วย Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG เจือจาง 1:10,000 ใน 5% skim milk solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.05% Tween 20 ใน PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วแช่ในสารละลายสับสเตรท Luminata Forte Western HRP substrate นาน 30 วินาที จากนั้นอ่านผลด้วย ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software version 6.0

9. **การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน cyclooxygenase (COX)-2**

ดำเนินการทดสอบตามสภาวะเดียวกันกับ การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS ตามข้อ 8 โดยวัดปริมาณโปรตีนรวมก่อนจะทำการแยกโปรตีน COX-2 ใน 12% Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) gel หลังจากทำ western blotting ด้วยเครื่อง transfer protein electrophoretic apparatus เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ได้มาแช่ใน 5% skim milk solution ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.05% Tween 20

ใน PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนที่ล้างแล้วบ่มด้วย COX-2 mouse monoclonal antibody เจือจาง 1:500 และ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) mouse monoclonal antibody เจือจาง 1:1,000 ใน 5% skim milk solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนตามวิธีการที่กล่าวในข้อที่ 8

10. การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง Prostaglandin E_2 (PGE_2)

เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6 well plate) โดยมีความหนาแน่น 2×10^6 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 10, 50, 100 µg/ml ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมลงในหลุมที่เตรียมไว้ และมี DCS 10 µg/ml เป็นสารควบคุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม IL-1β ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้าง PGE_2 แล้วบ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์จนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารละลายในแต่ละหลุม (cell supernatant) มาทดสอบความเข้มข้นของ PGE_2 ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ Prostaglandin E_2 ELISA Assay Kit ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้ เติมสารตัวอย่าง 150 µl ลงใน 96 well ELISA plate จากนั้นเติมสารละลาย primary antibody 50 µl แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า (Microplate shaker) เติม PGE_2 conjugate 50 µl แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า จากนั้นนำสารสะลายในหลุมออก แล้วล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 4 ครั้ง ครั้งละ 400 µl แล้วเติมสารตั้งต้น (substrate solution) ลงไป 200 µl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติมสารหยุดปฏิกิริยา (stop solution) 100 µl ซึ่งในขั้นตอนนี้สารละลายในหลุมจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาความเข้มข้นของ PGE_2 จากกราฟมาตรฐาน PGE_2 (PGE_2 standard curve)

11. การทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง Matrix metalloproteinase 13 (MMP-13)

เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม (6 well plate) โดยมีความหนาแน่น 2×10^6 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมทดสอบต่างๆ ดังนี้ MSE 5, 25, 50, 100 µg/ml, OXY 0.75, 15 µg/ml, GS 10 µg/ml และ DCS 10 µg/ml ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมลงในหลุมที่เตรียมไว้ บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม IL-1β ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการสร้าง MMP-13 แล้วบ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์จนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารละลายในแต่ละหลุม (cell supernatant) มาทดสอบความเข้มข้นของ MMP-13 ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ Human MMP-13 ELISA Kit ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้ เติมสารตัวอย่าง 100 µl ลงใน 96 well ELISA plate แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที บนเครื่องเขย่า (Microplate shaker) จากนั้นนำสารสะลายในหลุมออก แล้วล้างด้วยสารละลาย

1041064

บัฟเฟอร์ 4 ครั้ง ครั้งละ 300 µl จากนั้นเติมสารละลาย biotinylated antibody 100 µl แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์อีก 4 ครั้ง จากนั้นเติม Streptavidin-HRP solution ลงไป 100 µl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติมสารหยุดปฏิกิริยา (stop solution) 50 µl ซึ่งในขั้นตอนนี้สารละลายในหลุมจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาความเข้มข้นของ MMP-13 จากกราฟมาตรฐาน MMP-13 (MMP-13 standard curve)

12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way ANOVA) และ การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธีทดสอบแบบ Tukey test

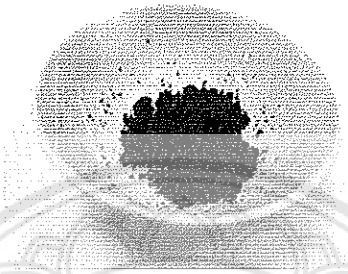
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

(Results and Discussion)

1. **สารสกัดโคนต้นหม่อน (Mulberry stem extract)**

สารสกัดจากโคนต้นหม่อนที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 4-1) และมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับร้อยละ 4.08



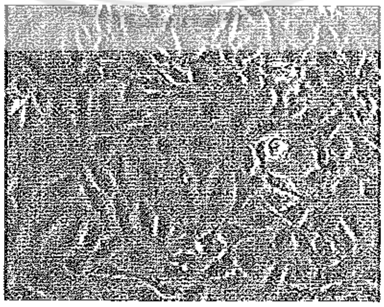
รูปที่ 4-1 สารสกัดจากโคนต้นหม่อน

2. **การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอราทรอลในสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยเทคนิค HPLC**

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอราทรอลในสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยคำนวณได้จากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอลที่มีสมการความชันเท่ากับ y = 105,406x + 24,221 พบว่า สารสกัดจากโคนต้นหม่อนมีปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอทรอลร้อยละ 15.06

3. **ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์**

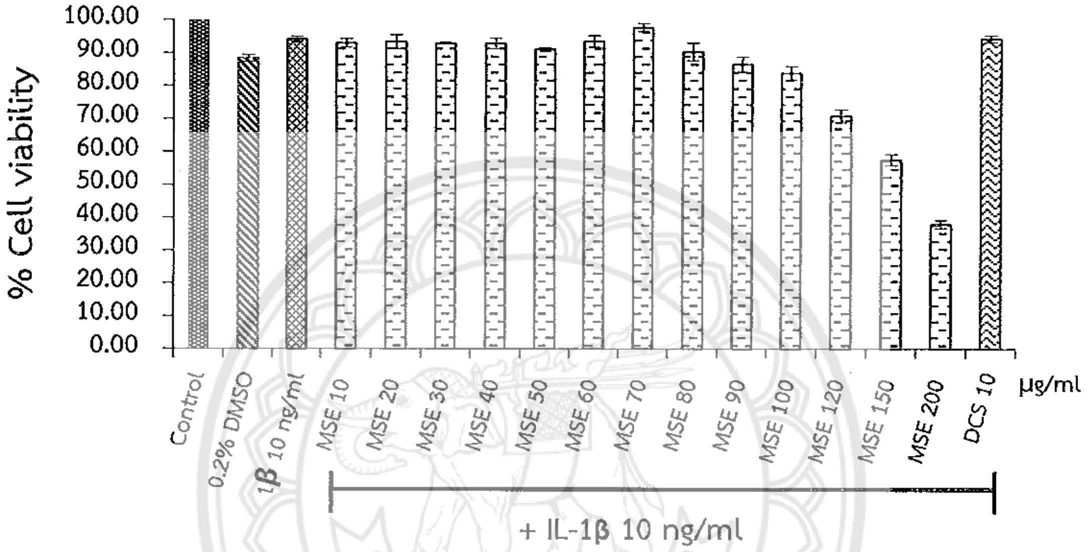
เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์มีลักษณะดังรูปที่ 4-2



รูปที่ 4-2 เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ (C28/I2 human chondrocyte cell line)

4. **การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์**

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า เซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 10-100 μg/ml และไดโคลฟีแนคโซเดียม 10 μg/ml ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย IL-1β มีชีวิตรอดมากกว่าร้อยละ 80 ดังรูปที่ 4-3 ส่วนสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 120, 150 และ 200 μg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยทำให้เซลล์มีชีวิตรอดต่ำกว่าร้อยละ 80 นอกจากนี้ยังทำให้ลักษณะรูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม



รูปที่ 4-3 ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์

5. **ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง NO**

จากการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ได้รับสารตัวอย่างและถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของสารไนไตรท์ (NO_2^-) ต่ำมาก ดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ความเข้มข้นของสารไนไตรท์ (NO_2^-) ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ได้รับสารตัวอย่างและถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สารตัวอย่าง	Nitrite (μM)
Control	0.21
IL-1β 10 ng/ml	0.65
MSE 10 μg/ml	0.69
MSE 50 μg/ml	0.69
MSE 100 μg/ml	0.52
DCS 10 μg/ml	0.75

จากผลการทดลองข้างต้นจึงทำการเปรียบเทียบเวลาในการบ่มด้วยสารตัวอย่างจาก 24 ชั่วโมง เป็น 18, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า กลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 18, 24 และ 48 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของไนไตรท์เท่ากับ 0.56, 0.52 และ 8.88 μM ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-2

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่ากลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของไนไตรท์เพิ่มขึ้นแต่ยังคงมีปริมาณต่ำมาก

ตารางที่ 4-2 ความเข้มข้นของสารไนไตรท์ (NO_2^-) ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml เป็นเวลา 18, 24 และ 48 ชั่วโมง

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น Nitrite (µM)		
	18 ชม	24 ชม	48 ชม
Control	0.65	0.61	8.21
IL-1β 10 ng/ml	0.56	0.52	8.88

นอกจากนี้ยังการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ IL-1β ในการกระตุ้นการสร้าง NO โดยเซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ng/ml เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า กลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β ทีความเข้มข้นต่างๆ มีความเข้มข้นของไนไตรท์ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4-3

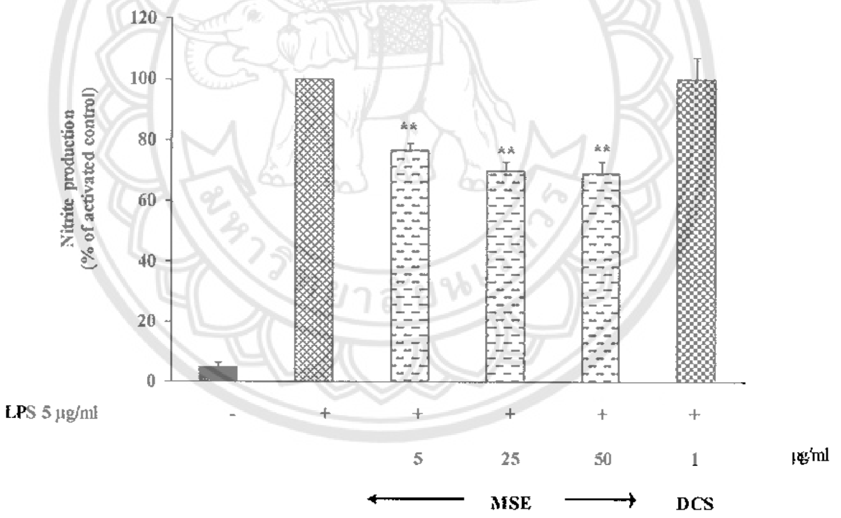
ตารางที่ 4-3 ความเข้มข้นของสารไนไตรท์ (NO_2^-) ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 5, 10 และ 15 ng/ml เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

สารตัวอย่าง	Nitrite (µM)	
	24 ชม	48 ชม
Control	1.09	1.51
IL-1β 5 ng/ml	1.32	1.68
IL-1β 10 ng/ml	1.23	1.72
IL-1β 15 ng/ml	1.32	1.85

6. ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS

จากการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ได้รับสารตัวอย่างและถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ชนิด C28/I2 immortalized human chondrocyte cell line ไม่สามารถตอบสนองต่อการผลิตโปรตีน iNOS ได้ จะสังเกตได้จากกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml เพียงอย่างเดียว ก็ไม่สามารถผลิตโปรตีน iNOS ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับผลการทดสอบของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide กล่าวคือไม่พบการสร้าง NO จากเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ชนิด C28/I2 immortalized human chondrocyte cell line

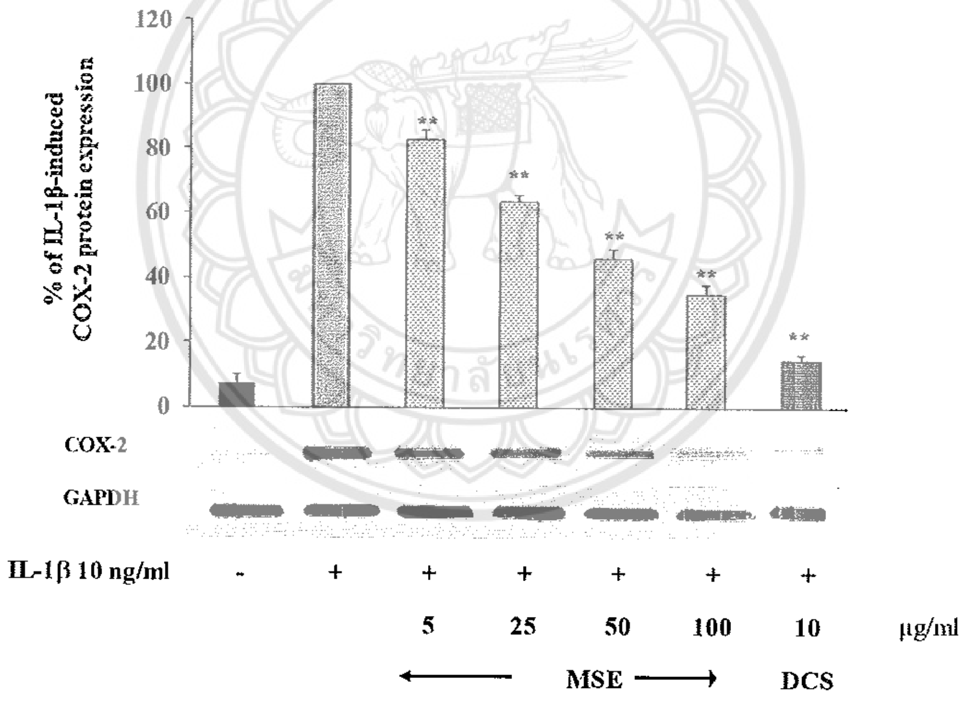
เนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ไม่สามารถผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันผลนี้จึงปรับโดยการศึกษาฤทธิ์ยังยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ เพิ่มเติมในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้แสดงในรูป 4-4 สารสกัดโคนต้นหม่อนสามารถยังยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (activated control)



รูปที่ 4-4 ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control (แท่ง 2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

7. **ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2**

จากการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ได้รับสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 μg/ml และถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml เพียงอย่างเดียว ในการทดลองนี้มีสารควบคุมคือ ไดโคลฟีแนคโซเดียม ซึ่งเป็นยาประเภท NSIAD ที่นิยมใช้ในรักษาโรคข้อเสื่อม จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับไดโคลฟีแนคโซเดียมความเข้มข้น 10 μg/ml และถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml มีร้อยละการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml (Untreated cell) ดังรูปที่ 4-5



รูปที่ 4-5 ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control (แท่ง 2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

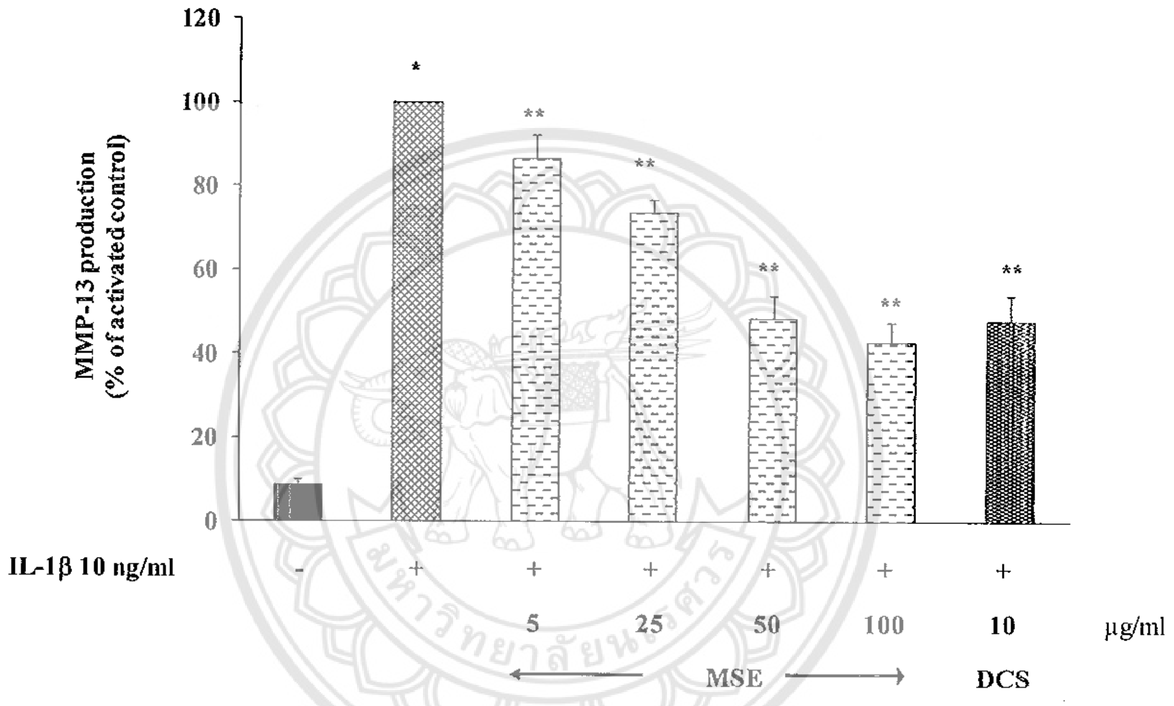
8. **ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง PGE_2**

จากการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง PGE_2 ด้วยวิธี ELISA พบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้นต่างๆและถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดการผลิตสารสื่ออักเสบ PGE_2 ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ IL-1β 10 ng/ml เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μg/ml สามารถลดการสร้าง PGE_2 ได้ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับไดโคลฟีแนคโซเดียม 10 μg/ml ซึ่งเป็นยาลดการอักเสบ (รูปที่ 4-6)

รูปที่ 4-6 ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการสร้างสารสื่ออักเสบ PGE_2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control (แท่ง 2) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

9. **ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง MMP-13**

จากการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง MMP-13 ด้วยวิธี ELISA พบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 μg/ml สามารถลดการผลิต MMP-13 ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ IL-1β 10 ng/ml เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับ ไดโคลฟีแนคโซเดียมความเข้มข้น 10 μg/ml สามารถลดการสร้าง MMP-13 ได้อีกด้วย ดังรูปที่ 4-7



รูปที่ 4-7 ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง MMP-13 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IL-1β 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สัญลักษณ์ * และ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ activated control ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และ 0.01

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา
(Conclusion)

สารสกัดจากโคนต้นหม่อนที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล มีร้อยละของผลผลิตเท่ากับร้อยละ 4.08 และมีปริมาณสารสำคัญออกซีเรสเวอราทรอลร้อยละ 15.06 จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ พบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 10-100 μg/ml ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ ผลการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง NO โดยวิธี Griess reaction พบว่า กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย IL-1β ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการสร้างไนไตรท์ในความเข้มข้นที่ต่ำมาก แม้จะมีการปรับความเข้มข้นของ IL-1β เป็น 5 หรือ 15 ng/ml หรือปรับระยะการบ่มเพาะเซลล์จาก 24 ชั่วโมง เป็น 18 หรือ 48 ชั่วโมง ก็ไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนไตรท์ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ iNOS เมื่อกระตุ้นด้วย IL-1β ก็ไม่พบการผลิตโปรตีน iNOS จาก C28/I2 immortalized human chondrocyte cell line จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ C28/I2 ไม่ตอบสนองต่อการสร้าง NO ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Santoro et al. (2015) ที่พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ T/C-28a2 และ SW-1353 ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) และ IL-1 เพียงอย่างเดียวหรือได้รับทั้ง LPS ผสม IL-1 ไม่สามารถตอบสนองต่อการแสดงออกของ iNOS และการสร้าง NO และเนื่องจากเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ C28/I2 แยกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อน T/C-28a4 จึงสามารถสรุปได้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนมนุษย์ C28/I2 ไม่ตอบสนองต่อการสร้าง NO และ iNOS แต่อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดโคนต้นหม่อนสามารถสังเกตเห็นได้จากการทดสอบในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง PGE_2 พบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 μg/ml สามารถยับยั้งการสร้างสารสื่ออักเสบ COX-2 และ PGE_2 ในเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ได้ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด นอกจากนี้ จากการทดสอบผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง MMP-13 พบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์ต้านการสลายของกระดูกอ่อนได้โดยการยับยั้งการผลิต MMP-13 ซึ่งมีหน้าที่ในการสลายสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของกระดูกอ่อนได้

ว QK 495 .ห73 ท3635 2561
30 มิ.ย. 2564 สำนักหอสมุด

เอกสารอ้างอิง (References)

Choi, E. M. and Hwang, J. K. (2005). Effects of *Morus alba* leaf extract on production of nitric oxide, prostaglandin E_2 and cytokines in RAW 264.7 macrophages. Fitoterapia, 76(7-8), 608-613.

Chung, K. O., Kim, B. Y., Lee, M. H., Kim, Y. R., Chung, H. Y., Park, J. H., et al. (2003). *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 55(12), 1695-1700.

Khunakornvichaya, A., Lekmeechai, S., Pham, P. P., Himakoun, W., Pitaksuteepong, T., Morales, N. P., et al. (2016). *Morus alba* L. stem extract attenuates pain and articular cartilage damage in the anterior cruciate ligament transection-Induced rat model of osteoarthritis. Pharmacology, 98(5-6), 209-216.

Khunakornvichaya, A., Lekmeechai, S., Pham, P. P., Himakoun, W., Pitaksuteepong, T., Morales, N. P., et al. (2012). Effect of *Morus alba* L. Extracton Pain Associated with Osteoarthritis in Rats. Thai Journal of Pharmacology, 34 (1), 121-125.

Nanakorn, W. (2001). Queen Sirikit Botanic Garden. Bangkok, Thailand: O.S. Printing House.

Park, E., Lee, S., Lee, J. and Kim, J. (2013). Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF-kB. Journal of Functional Foods, 5(1), 178-186.

Santoro A, Conde J, Scotece M, Abella V, LÓpez V, Pino J, et al. Choosing the Right Chondrocyte cell line: Focus on Nitric oxide. Journal of Prthopaedic Research. 2015: 33(12), 1784-1788.

Shen, C. L., Smith, B. J., Lo, D. F., Chyu, M. C., Dunn, D. M., Chen, C. H., et al. (2012). Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. Journal of Nutritional Biochemistry, 23(11), 1367-1377.

Soonthornsit, N., Hemstapat, W., Utaisincharoen, P., Pitaksuteepong, T. (2013) Effect of Morusalba stem extract on nitric oxide production in Lipopolysaccharide-induced raw 264.7 macrophage cells. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 38 (SUPPL.), pp. 69-71.

Soonthornsit, N., Pitaksutheepong, C., Hemstapat, W., Utaisincharoen P. and Pitaksuteepong, T. (2017). *In vitro* anti-inflammatory activity of *Morus alba* L. stem extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. doi:10.1155/2017/3928956.

Thongsuk, P. (2007). *In-vitro* and clinical study of *M. alba* extract for skin whitening product. Master thesis, M.Sc. (International Program), Naresuan University, Phitsanulok.

Wajanavisit, W., Woratanarat, P., Kijkunasathian, C., Laohajaroensombat, S. and Suppaphol, S. (2011). *Orthopedic*. Bangkok, Thailand: Holisticpublishing.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64(4), 555-559.

พิพัฒน์ เพิ่มพูน. ความรุนแรงของโรคและพฤติกรรมการดูแลตนเองของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในโรงพยาบาลศิริราช การค้นคว้าอิสระตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการสังคมและการจัดการระบบสุขภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2553.

ภาคผนวก

ผลสำเร็จของโครงการ (Research output)

1. โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยของนิสิตมหาบัณฑิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง และได้ผลิตมหาบัณฑิตหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง จำนวน 1 คน น.ส. ธิดารัตน์ วงศ์วัฒน์
2. นำเสนอในงานประชุม (Poster presentation)

   Thidarat Wongwat, Tasana Pitaksuteepong (2018) Effects of *Morus alba* L. stem extract and its marker on the inhibition of PGE_2 and MMP-13 production. The 2018 International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress X), Jomtien Palm Beach, Pattaya, Chonburi, Thailand. July 4-7, 2018.

3. **ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ** (International Journal)

   Thidarat Wongwat, Kanyarat Srihaphon, Chetsadaporn Pitaksutheepong, Worawan Boonyo and Tasana Pitaksuteepong (2019) Suppression of inflammatory mediators and matrix metalloproteinase (MMP)-13 by *Morus alba* stem extract and oxyresveratrol in RAW 264.7 cells and C28/I2 human chondrocytes. Journal of Traditional and Complementary Medicine (Accepted for publication).

ตารางแสดงรายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการเปรียบเทียบกับที่ตั้งไว้

การทดลอง	กิจกรรมที่ตั้งไว้	กิจกรรมที่ทำได้จริง
1. เตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน	/	เสร็จสิ้น
2. วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	/	เสร็จสิ้น
3. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อน ด้วยวิธี MTT assay	/	เสร็จสิ้น
4. ศึกษาผลของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide และ Prostaglandin E_2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อน	/	เสร็จสิ้น
5. ศึกษาผลของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อน	/	เสร็จสิ้น
6. ศึกษาผลของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อการยับยั้งการสร้าง MMP-13 ในเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อน	/	เสร็จสิ้น
7. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนและผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide ในเซลล์ RAW 264.7	เพิ่มเติมจากแผน	เสร็จสิ้น
8. รวบรวมและรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์	/	เสร็จสิ้น
9. จัดทำต้นฉบับงานวิจัยตีพิมพ์และตีพิมพ์ผลงานวิจัย	/	เสร็จสิ้น

ลงชื่อ ....ทัศนา พิทักษ์สุธีพงศ์........

(รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนา พิทักษ์สุธีพงศ์)

หัวหน้าโครงการวิจัย