



รายงานการวิจัย

กลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และฤทธิ์ทางชีวภาพของ
สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม
(Inhibitory Mechanism of Nitric Oxide Production and Biological
Activities of Extract from Seed Coat of Ma Khaam
(*Tamaindus indica* Linn))

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักกีฬาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548 ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้อย่างต่อเนื่องรวมทั้งความอดกลั้นที่โครงการนี้ล่าช้ากว่ากำหนด ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา สาขาวิชาเกษตรวิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิจัย ตลอดจนการอำนวยความสะดวกและบริการในทุก ๆ ส่วนที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยขอขอบคุณ อ. ดร. จินดา วัลย์ วิบูลย์อุทัย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ซึ่งในขณะนั้นเป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการและช่วยผลักดันให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ดี ขอขอบคุณ อ. ดร. พิชรพรรณ สิทธิศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏศรีสะเกษ ที่ให้ความช่วยเหลือในงานด้านเอกสาร

ท้ายสุดขอกราบบูชาพระคุณของคุณพ่อ-คุณแม่ ที่ให้ความรัก ความอบอุ่น อบรมสั่งสอนและดูแลลูกอย่างดีที่สุด ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ความรักและเมตตาอบรมสั่งสอนศิษย์เสมอมา ท้ายสุดขอขอบคุณครอบครัว รศ. ดร. ทวีช จิตรสมบุญ และ นายโพธิพล จิตรสมบุญที่เป็นขวัญและกำลังใจ เป็นน้ำหล่อเลี้ยงให้มีพลังในการทำงาน จนสามารถฟันฝ่าอุปสรรคที่ขวาง

เบ็ญจมาศ จิตรสมบุญ

หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ประเมินจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และการยับยั้งการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ภายหลังจากสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วย 50% อะซิโตน ได้ปริมาณสารสกัดร้อยละ 45.8 ของน้ำหนักแห้ง โดยมีสารประกอบฟีนอลิกเทียบเท่ากับน้ำหนักกรดแกลลิกเป็น 178 ± 3.8 mg/g และมีคุณสมบัติซึ่งแปรผันตามปริมาณสารในการต้านอนุมูลอิสระและการรีดักชันสูงกว่าวิตามินซีและสารสกัดจากเมล็ดองุ่นเมื่อประเมินโดยวิธีทดสอบ DPPH และ FRAP สารสกัดยังยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงถึงร้อยละ 60 ในเซลล์ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ที่ความเข้มข้น 10 μ g/mL ของสารสกัดซึ่งเป็นระดับสารที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดสามารถลดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 และลดการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยอิโทโพไซด์ได้ร้อยละ 10 เมื่อประเมินโดยวิธี annexin-V-PI ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับการลดการแตกหักของดีเอ็นเอ ดังนั้นสารสกัดจึงมีผลทั้งต่อระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย โดยรวมการศึกษานี้ชี้ชัดว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ควรค่าต่อการพัฒนาให้เป็นยาธรรมชาติเพื่อการป้องกันหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปในอนาคต

Abstract

Effects of seed coat extract of *Tamarindus indica* Linn. (TAM) on antioxidant capacity, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities were investigated. After 50% acetone extraction, the yield of TAM extract was 45.8%, and the total phenolic content was 178 ± 3.8 mg gallic acid equivalent per gram dry extract. TAM extract showed a higher dose dependent radical scavenging activity and power of reduction than vitamin C and grape seed extract as evaluated by the DPPH and FRAP assays, respectively. TAM extract induced a high suppression (\square 60%) of NO production by LPS plus IFN- \square activated RAW 264.7 cells at 10 μ g/mL, the concentration that had no cytotoxicity. In addition, TAM at the same concentration induced inhibition of iNOS and COX-2 protein expressions. TAM at this concentration also reduced the etoposide-induced apoptosis of RAW 264.7 cells by 10% as evaluated by the annexin V-PI binding. The decreased apoptotic result was also confirmed by a reduction of DNA fragmentation. Overall, the present data suggest that TAM extract has high potential as a safe, effective, low-cost source of natural antioxidant with many pharmaceutical properties and is worthwhile to be developed as natural chemopreventive products or nutraceuticals in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1-3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	4
บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5-14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี.....	15-17
น้ำ.....	17
วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือการวิจัย.....	18-19
วิธีดำเนินการวิจัย	19-33
บทที่ 4 ผลการวิจัย	34-52
บทที่ 5 การวิจารณ์	53-61
บทที่ 6 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	62-63
ข้อเสนอแนะ	63-64
บรรณานุกรม	65-77
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	78-85
ภาคผนวก ข	86-89
ภาคผนวก ค	90-91
ประวัติผู้วิจัย	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงรายชื่อสารเคมี.....	15-17
2. แสดงวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการวิจัย.....	18-19



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงส่วนต่างๆ ของมะขาม (<i>Tamarindus indica</i> L.).....	5
2. แสดงประโยชน์และโทษของ NO ในขบวนการสรีรวิทยา (physiological) และพยาธิสภาพ (pathophysiological)	9
3. การสังเคราะห์ prostanoids	10
4. Apoptotic pathway ที่ถูกชักนำด้วย NO	12
5. Thin Layer Chromatography (TLC) ของสารสกัด จากเมล็ดมะขาม (TAM) ที่ย้อมด้วย DPPH solution.....	35
6. ปริมาณของ phenolic รวม (TPC) ของสารสกัด TAM และ GSE ที่แสดงหน่วยเป็น mg GAE ต่อ g น้ำหนักแห้งของสารสกัด	36
7. ฤทธิ์การทำลายอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของสารสกัด TAM เทียบกับสารมาตรฐาน vitamin C และ GSE.....	37
8. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการใช้ ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP) ของสารสกัด TAM เทียบกับสารอ้างอิงมาตรฐาน vitamin C.....	38
9. ความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์ RAW264.7 ซึ่งถูกประเมินโดยวิธี trypan blue และ resazurin assay	39
10. ผลของความเข้มข้นของ LPS (0.001-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ต่อการชักนำให้เซลล์ macrophage RAW264.7 สังเคราะห์ NO ภายหลังการกระตุ้นด้วย LPS เป็นระยะเวลา 24 ชม.....	40
11. ผลของความเข้มข้นของ (1-50 U/mL) ต่อการชักนำให้เซลล์ RAW264.7 สังเคราะห์ NO ภายหลังการกระตุ้นด้วย IFN- γ เป็นระยะเวลา 24 ชม.....	41
12. การกระตุ้นการสร้าง NO จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IFN- γ (25 U/mL) หรือ LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชม	41
13. ผลของระยะเวลาของการกระตุ้นต่อการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ macrophage RAW264.7 เมื่อกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN- γ (25 U/mL)	43
14. ผลของสารสกัด TAM ต่อการชักนำการสร้าง NO จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN- γ (25 U/mL)	44

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15. ผลของสารสกัด TAM ต่อการชักนำการแสดงออกของ iNOS protein จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS (1 µg/mL) + IFN- γ (25 U/mL) เป็นเวลา 24 ชม	45
16. ผลของสารสกัด TAM ต่อการชักนำการแสดงออกของ COX-2 protein จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS (1 µg/mL) + IFN- γ (25 U/mL) เป็นเวลา 24 ชม	46
17. ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด apoptosis ในเซลล์ macrophage RAW264.7 โดยสารสกัด TAM	48
18. ผลของ GSE ต่อการเกิด apoptosis ในเซลล์ macrophage RAW264.7.....	49
19. ผลของ vitamin C ต่อการเกิด apoptosis ในเซลล์ macrophage RAW264.7.....	50
20. การลดลงของ DNA ladder โดยสารสกัด TAM และ antioxidant controls (GSE และ vitamin C).....	52
21. โครงสร้างของ oligomeric flavonoids: procyanidin B ₂ (II), procyanidin trimer (IV), procyanidin tetramer (V), procyanidin pentamer (VI) และ procyanidin hexamer (VII)	55
22. ปฏิกริยา Griess	58

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การนำพืชพันธุ์จากธรรมชาติมาเป็นทั้งอาหารและยาสมุนไพรเป็นวิถีชีวิตและวัฒนธรรมของคนไทยที่สืบเนื่องกันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยขึ้นอยู่กับองค์ความรู้พื้นบ้านและความแตกต่างของพันธุ์พืชแต่ละท้องถิ่น มะขาม (*Tamarindus indica* Linn) เป็นพืชที่พบในประเทศไทย และคนไทยคุ้นเคยกับการนำเนื้อมะขามและใบอ่อนมาใช้เป็นเครื่องเทศสำหรับปรุงอาหาร และตำราแพทย์แผนไทยระบุสรรพคุณในส่วนต่างๆ ของมะขามเช่น ผลมีสรรพคุณช่วยในการย่อย บำรุงเลือด ระบายและขับลม เมล็ดมีฤทธิ์ต้านอาการท้องร่วง ช่วยขับพยาธิและทำให้เอาเจียน ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดช่วยสมานแผลที่โดนไฟไหม้ได้ แต่งานวิจัยที่สามารถใช้อ้างอิงเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนต่างๆ ในมะขามยังมีปริมาณจำกัด โดยเฉพาะส่วนเปลือกนอกหุ้มเมล็ดมะขาม ซึ่งมักเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการรับประทานและจากอุตสาหกรรม หรืออาจถูกนำมาใช้ประโยชน์บ้างเป็นส่วนน้อย เช่น ในบางท้องถิ่นของประเทศไทยผสมผงบดจากเมล็ดมะขามในกาแฟโบราณ (Suttajit, 1985; Sittikijyothin and Cherdwongchroensuk, 2011)

คณะผู้วิจัยเริ่มให้ความสนใจและศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม และได้รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ethanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (Pumthong, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsuda *et al.* (1994) ที่พบส่วนประกอบต่างๆ ในสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง ด้วยเหตุนี้จึงมีทีมนักวิจัยพัฒนาสารสกัด ethanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้านอนุมูลอิสระชนิดอัดเม็ด (ทรงวุฒิ ยศวิมลวัฒน์, 2555) Pumthong (1999) ได้วิเคราะห์เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยวิธี thin layer chromatography และพบว่าสาร flavonoids ในสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นสารกลุ่ม oligomeric proanthocyanidin complexes (OPCs) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในเปลือกต้นสน เมล็ดองุ่น และในเมล็ดพืชอื่น เช่น ถั่ว pistachio มีรายงานการวิจัยมากมายเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของสารกลุ่ม OPCs หรือ proanthocyanidin ว่าสามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดหรือป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ (Fine, 2000; Bagchi *et al.*, 2000; Ray, Kumar, and Bagchi, 1999; Dhanalakshmi, Agarwal, and Agarwal, 2003; Cos *et al.*, 2003; Gentile, Allegra, and Angileri, 2012) ณัฐฐาพร ดาลัย (2550) ได้สกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วย methanol และพบว่ามีปริมาณ condensed tannins (proanthocyanidins) และฟีนอลิกสูงซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงของสารสกัด และเมื่อทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นต่อหนูขาว พบว่ามีความเป็นพิษต่ำทั้งในการทดลองแบบ

เฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Komutarin *et al.* (2004) ซึ่งได้รายงานว่ สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีความเป็นพิษต่ำในหนูเม้าส์ นอกเหนือจากการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว สารสกัด ethanol และน้ำจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามยังมีฤทธิ์ปกป้องโรคไขข้ออักเสบ (arthritic) อีกด้วย (Babaria *et al.*, 2011) คณะผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Komutarin *et al.*, 2004) พบว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ของเซลล์ macrophage ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

Macrophage เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทสำคัญในโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เมื่อเซลล์ macrophage ถูกกระตุ้น (activated macrophage) จะผลิตสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อาทิเช่น nitric oxide (NO) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) (MacMicking *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2002) NO เป็นโมเลกุลทางชีวภาพที่มีความสำคัญยิ่ง สามารถก่อให้เกิดทั้งประโยชน์และโทษต่อร่างกาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ NO มีบทบาทสำคัญช่วยในการปฏิบัติหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ แต่ในทางตรงกันข้าม ที่ระดับความเข้มข้นสูง NO ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลาง (mediator) สำคัญในกลไกของการก่อโรคหลายชนิด โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง การชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO ในปริมาณสูงจนถึงระดับที่เป็นโทษต่อร่างกาย ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ชนิดถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น (induced nitric oxide synthase; iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ NO ให้อยู่ในระดับสูงมากกว่าระดับที่ถูกสร้างในสภาวะปกติของร่างกาย (Bernstein *et al.*, 2005; Korde *et al.*, 2012) นอกจาก NO สารกลุ่มอื่นที่มีบทบาทเป็นสารสื่อกลางสำคัญในกระบวนการอักเสบคือ prostaglandin E₂ (PGE₂) ซึ่งเป็นหนึ่งใน metabolite ของ arachidonic acid ที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งโดยปกติอยู่ในระดับต่ำ แต่ระดับของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นหรือพบในระหว่างเกิดการอักเสบ (Donnelly and Hawkey, 1997; Harris *et al.*, 2002) หลายคณะวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์ NO สามารถตรวจพบปริมาณการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้ง iNOS และ COX-2 (Lin *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006) ดังนั้น การลดลงของระดับการแสดงออกของทั้ง NO, iNOS และ COX-2 จึงถูกใช้เป็นหนึ่งในกลุ่มยุทธศาสตร์ของการคัดกรอง (screen) หาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการอักเสบ

การตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) เป็นการตายของเซลล์ที่มีความสำคัญในกระบวนการเจริญพัฒนาของสิ่งมีชีวิต และเป็นตัวการหลักในพยาธิสภาพของโรคหลายชนิด มีปัจจัยทั้งภายนอกและภายในเซลล์หลายชนิดที่ชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis (Thompson, 1995) สภาวะเครียดออกซิเดชัน

(oxidative stress) จัดเป็นปัจจัยหนึ่งในการชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในเซลล์หลากหลายชนิดรวมทั้งเซลล์ macrophage (Slater *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997)

จากการค้นพบของคณะวิจัยว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีคุณสมบัติด้านออกซิเดชันสูง มีกลุ่ม สาร OPCs ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายเป็นองค์ประกอบ มีความสามารถยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage และมีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลองในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม โครงการวิจัยนี้จึงเสนองานวิจัยต่อเนื่องเพื่อศึกษากลไกยับยั้งการผลิต NO ในเซลล์ macrophage โดยเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ตลอดจนศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามว่าสามารถป้องกันการเกิด apoptosis หรือบรรเทาความเสียหายที่เกิดขึ้นในเซลล์ macrophage เพราะสภาวะที่ถูกชักนำให้เกิดการผลิต NO ทั้งนี้เพื่อประเมินศักยภาพของการใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่คณะผู้วิจัยค้นพบเพื่อประยุกต์ในเชิงเภสัชวิทยา หรือเพื่อพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อให้ทราบกลไกการยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ RAW264.7 โดยเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม
2. เพื่อหาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม
3. เพื่อหาความสามารถของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในการยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จำกัดการทดลองด้วย *in vitro* model โดยใช้เซลล์ RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ของ macrophage ในหนูเม้าส์ และใช้ LPS และ mouse IFN- γ เป็นสารกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ NO ศึกษากลไกยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ RAW264.7 โดยดูผลของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และการประเมินความสามารถของสารสกัดในการป้องกัน/ลดการตายแบบอะพอพอโตซิสของเซลล์ RAW264.7 ที่เกิดจาก oxidative stress ของ NO โดยการชักนำของ etoposide สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบกระทำโดยดูฤทธิ์ของสารสกัดต่อการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 ควบคู่กับการยับยั้ง NO

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ข้อมูลฤทธิ์ทางด้านชีวภาพของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงเภสัชวิทยา หรือเพื่อพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่อไปในอนาคต
2. ทราบกลไกของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในการยับยั้งการผลิต NO
3. ได้ข้อมูลทางด้านฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม
4. ได้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนและส่งเสริมการใช้มะขามของประชากรไทยที่ใช้มะขามเป็นเครื่องเทศหรือยารักษาโรคต่างๆ



บทที่ 2

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะขาม

มะขามเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* L. (รูปที่ 1) จัดเป็นพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae หรือ Fabaceae) พบในประเทศแถบร้อนชื้น โดยเฉพาะประเทศอินเดียและประเทศไทย เกือบทุกส่วนของมะขามสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ มะขามมีคุณค่าทั้งทางด้านสารอาหารและใช้เป็นยารักษาโรค (De Caluwé *et al.*, 2010) สำหรับคนไทยซึ่งใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของมะขามมาช้านานและถือว่ามะขามมีสรรพคุณมากมาย เช่น ใช้เป็นยาระบายแก้อาการท้องผูก ขับลม ขับเสมหะ แก้หวัด แก้ไอ แก้โรคมบิด แก้ท้องร่วง แก้คลื่นไส้ อาเจียน รวมไปถึงอาการแพ้ท้อง รักษาอาการท้องอืดหรือเฟ้อ และใช้เป็นยาฆ่าพยาธิ เป็นต้น (จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ 2556; ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2556; หน่วยบริการฐานข้อมูลสมุนไพร, 2556) ในบางประเทศใช้มะขามบรรเทาอาการเจ็บคอ รักษาโรคมะเร็ง รักษาบาดแผลและการบวมเนื่องจากการอักเสบ และรักษาโรคเบาหวาน (De Caluwé *et al.*, 2010)



รูปที่ 1 แสดงส่วนต่างๆ ของมะขาม (*Tamarindus indica* L.) (De Caluwé *et al.*, 2010)

สืบเนื่องจากสรรพคุณอันมากมายของมะขาม นักวิจัยหลายคนจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ทางด้านชีวภาพจากส่วนต่างๆ ของมะขาม และพบว่าไม่ว่าจะเป็นผล (Martinello *et al.*, 2006) ดอก (Al-Fatimi *et al.*, 2007) หรือใบ (El-Siddig *et al.*, 2006) ล้วนมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ Martinello *et*

al. (2006) พบว่าสารสกัดจากผลมะขามยังมีฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอลสูงในเลือด (hypercholesterolemic) ของหนู hamsters ส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการรับประทาน ในบางท้องถิ่นของประเทศไทยได้มีการนำผลบดจากเมล็ดมะขามมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยผสมกับกาแฟโบราณ สำหรับประเทศอินโดนีเซียใช้เป็นยาสมุนไพรหรือเป็นยาห้ามเลือด (De Caluwé *et al.*, 2010) ดังนั้นจึงมีคณะวิจัยค้นหาองค์ประกอบของสารและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม Pumthong (1999) ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัด ethanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่าประกอบด้วยสารกลุ่ม phenolics ในปริมาณสูง โดยเฉพาะกลุ่มสาร oligomeric proanthocyanidin complexes (OPCs) และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างดียิ่งด้วยการทำลายอนุมูลอิสระชนิด peroxy, hydroxyl และ superoxide anions เมื่อทำการทดลองใน *in vitro* นอกจากนี้ยังแสดงผลปกป้อง lipid peroxidation และความเสียหายอันสืบเนื่องจากสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsuda *et al.* (1994) ที่พบว่าสารสกัด ethanol และ ethyl acetate ที่เตรียมจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คนไทยนิยมใช้ทั้งมะขามดิบและแห้งหรือเรียกอีกอย่างว่ามะขามสุกเป็นเครื่องเทศประกอบอาหาร โดยเฉพาะมะขามหวานซึ่งเป็นมะขามสุกที่ชาวไทยนิยมบริโภค ดังนั้นจึงมีงานวิจัยค้นหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากมะขามทั้ง 2 ชนิดนี้ Siddhuraju (2007) พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามดิบและแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน linoleic acid emulsion system โดยมีฤทธิ์ต่ำกว่า butylated-hydroxy-anisole (BHA) แต่สูงกว่า ascorbic acid งานวิจัยของ Sittikijyothin และ Cherdwongchroensuk (2011) เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด ethanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามแห้งระหว่างมะขามเปรี้ยวและมะขามหวาน พบว่ามะขามเปรี้ยวมีปริมาณ phenolic และยับยั้ง DPPH radical (DPPH \cdot) สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวาน นอกจากนั้น การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด methanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามบ่งชี้ว่า สารประกอบ polyphenol หลัก ได้แก่ procyanidin dimer และ procyanidin trimer มีความปลอดภัยต่อหนู ไม่เหนียวนำไปให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และเพิ่มระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ในตับ คือ เอนไซม์ glutathione peroxidase, heme oxygenase และ glutathione S-transferase นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้น โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับที่ผิดปกติและส่งเสริมเอนไซม์กำจัดสารพิษในตับ (รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย 2554) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ญัฐฐาพร คาลัย (2550) ซึ่งสกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามคั่วด้วย methanol และพบว่ามียังมีปริมาณ condensed tannins (proanthocyanidins) และ phenolics สูง รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย เมื่อทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นต่อหนูขาว พบว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่ำทั้งในการทดสอบแบบเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน ฤทธิ์อื่นๆของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม อาทิเช่น ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน Komutarin

et al. (2004) พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสามารถยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน macrophage ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านการปวดตามข้อ (antiarthritic) (Babaria *et al.*, 2011) โดยการทดลองให้สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่สกัดด้วย ethanol และ น้ำกับหนู rat พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนู (paw edema) ที่ชักนำโดย Freud's complete adjuvant นอกจากนี้งานวิจัยเกี่ยวกับสรรพคุณของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในการป้องกันหรือรักษาพยาธิสภาพของโรคหลายชนิด ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้มะขามในการปรับปรุงการผลิตไก่เนื้อ (*Gallus domesticus*) งานวิจัยนี้พบว่าสารประกอบ polyphenolic จากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีคุณสมบัติคล้าย antibiotics และสามารถเพิ่มค่าเฉลี่ยน้ำหนักของไก่เนื้อต่อวัน อีกทั้งยังสามารถลดสภาวะเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน (heat stress) สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน รวมทั้งสามารถปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตจากสภาวะเครียดสืบเนื่องจากความร้อนได้ (Aengwanich, Suttajit and Narkkong, 2009a, b; Aengwanich and Suttajit, 2010)

บทบาทของ NO

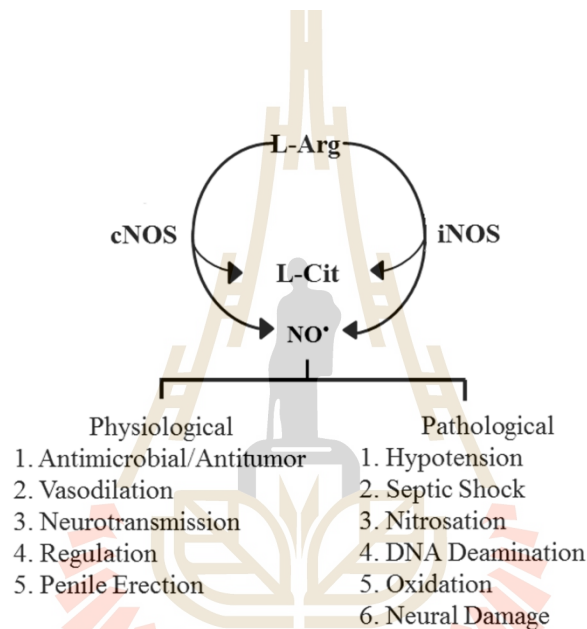
NO เป็นโมเลกุลชีววิทยาที่มีความสำคัญยิ่งต่อการควบคุมขบวนการสรีรวิทยา เช่น การขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) การสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท (neural signal transmission) การป้องกันการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) การแข็งตัวขององคชาติ (penile erection) การควบคุมการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ (antimicrobial) และต้านมะเร็ง (antitumor) อย่างไรก็ตามในระหว่างการติดเชื้อและการอักเสบ NO มีปริมาณสูงขึ้นซึ่ง NO ในระดับที่สูงกว่าปกติสามารถก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายด้วยการสร้างสารก่อมะเร็ง N-nitroso compounds การเกิด deamination ของ DNA base การเกิดออกซิเดชันของ DNA base การกลายพันธุ์ (mutation) และการก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อด้วยการเกิดออกซิเดชัน (Liu and Hotchkiss, 1995) นอกจากนี้ NO ยังเป็นสารสื่อกลาง (mediator) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) ภาวะช็อกโลหิตเป็นพิษ (septic shock) โรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmunity) รวมถึงโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (Karpuzoglu and Ahmed, 2006) รูปที่ 2 สรุปบทบาทที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษของ NO ในขบวนการทางสรีรวิทยา (physiological) และทางพยาธิสภาพ (pathophysiological) ตามลำดับ

การสังเคราะห์ NO โดยเอนไซม์ iNOS

การสังเคราะห์ NO เกิดจากปฏิกิริยาการนำ guanine nitrogen ออกจากกรดอะมิโน L-arginine โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) และ cofactors ต่างๆ บิดจำกัดของการสังเคราะห์ NO ภายในร่างกายขึ้นกับ activity ของ NOS การสังเคราะห์ NOS ในร่างกายมี 2 ลักษณะ คือเอนไซม์ NOS แบบที่มีการสังเคราะห์ตลอดเวลา เรียกว่า constitutive NOS (cNOS) และเอนไซม์ NOS แบบที่มีการถูกชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ เรียกว่า induced NOS (iNOS) เอนไซม์ cNOS มี 2 isoform คือ nNOS และ eNOS ที่ทำหน้าที่ในระบบประสาทและหลอดเลือดตามลำดับ สำหรับการสังเคราะห์ iNOS เกิดขึ้นในกรณีที่ถูกชักนำ (induced) เท่านั้น เซลล์ที่อยู่ในสภาวะพักปกติ (resting cell) จึงไม่พบ iNOS แต่ iNOS สามารถถูกตรวจพบได้ภายในเซลล์หลายชนิดเมื่อถูกกระตุ้น เช่น macrophage, endothelial cell, epithelial cell, เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์ไขกระดูก เซลล์ตับ และเซลล์มะเร็งบางชนิด (Robbins and Sisson, 1996; Weisz *et al.*, 1994) ตัวอย่างสารที่สามารถชักนำให้เกิด iNOS ภายในเซลล์ได้แก่ lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ , phorbol ester, รังสี UV โอโซนและ cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-12 (Nathan and Xie, 1994; Park *et al.*, 2000) Macrophage เป็นเซลล์สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถสร้าง NO ได้หลากหลายระดับโดยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวกระตุ้น เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่า การให้ตัวกระตุ้นชนิด LPS ร่วมกับ cytokine ชนิด IFN- γ สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง NO ได้สูงกว่าการใช้ตัวกระตุ้น LPS เพียงชนิดเดียวหรือใช้ LPS ร่วมกับ cytokine ชนิดอื่น เช่น TNF- α หรือ IL-1 β (Cheng *et al.*, 2010) การชักนำ iNOS มีผลให้เกิดการสังเคราะห์ NO ในปริมาณที่สูงกว่าและมีฤทธิ์ยาวนานกว่าเมื่อเทียบกับ NO ที่สังเคราะห์โดย cNOS (Wink *et al.*, 1998) NO ที่สังเคราะห์ผ่าน cNOS จำเป็นสำหรับการทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ ในขณะที่ NO ที่สังเคราะห์โดย iNOS นำมาซึ่งความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคหลายชนิด โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบดังได้ระบุเบื้องต้น

การอักเสบ (inflammation) หมายถึงปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อต่อสิ่งที่ก่อภัยอันตราย (injurious agent) และต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลง การอักเสบสามารถบ่งบอกได้จากปริมาณที่สูงขึ้นของสารสื่อกลางต่างๆ อาทิเช่น สารอนุมูลอิสระทั้งชนิด reactive oxygen species (ROSs) และ reactive nitrogen species (RNSs) รวมถึง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Reuter *et al.*, 2010) ดังนั้นปริมาณที่สูงของ NO ที่สังเคราะห์โดย iNOS อาจรวมเข้ากับ superoxide เกิดเป็น peroxynitrite ion (OONO⁻) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในการอักเสบ (Fang *et al.*, 2009) NO ที่สังเคราะห์ด้วย iNOS ยังสามารถชักนำการแสดงออกของยีนหลากหลายชนิดและนำมาซึ่งผลผลิตอย่างหลากหลายจากยีนเหล่านั้น และหนึ่งในนั้นคือ COX-2 ในพยาธิสภาพของโรคที่เกี่ยวข้องกับการ

อักเสบรวมถึงการตอบสนองต่อตัวกระตุ้น เช่น LPS และ IFN- γ ในเซลล์ macrophage สามารถตรวจพบ ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบรวมถึงผลผลิตที่ได้จากยีนเหล่านั้น (Jang *et al.*, 2005; Karpuzoglu and Ahmed, 2006) ดังนั้น NO จึงทำหน้าที่เป็นตัวกลาง (mediator) ที่เกี่ยวกับการอักเสบ (inflammatory mediator) ที่สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์จำพวก macrophage อาทิเช่น เซลล์สายพันธุ์ macrophage ในหนูเมาส์ RAW264.7 การยับยั้งการผลิต NO ที่มากเกินไปสามารถช่วยรักษาหรือบรรเทาโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่มี NO เป็นสื่อกลาง ดังนั้น ในปัจจุบันจึงมีความพยายามอย่างยิ่งในการค้นหาสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการผลิต NO เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบต่อไป

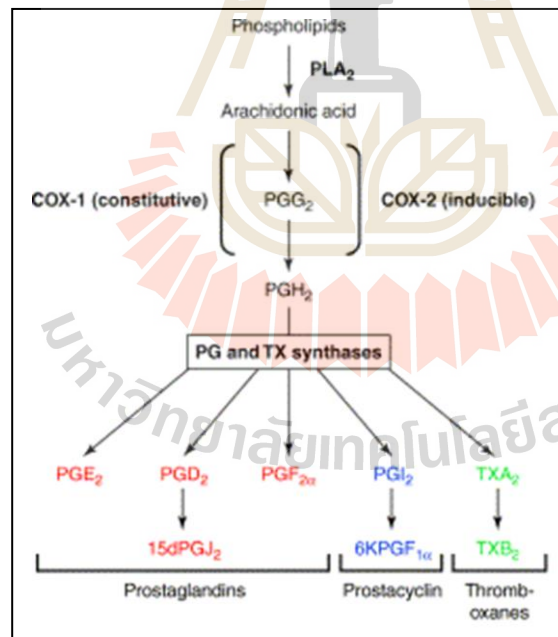


รูปที่ 2 แสดงประโยชน์และโทษของ NO ในขบวนการสรีรวิทยา (physiological) และพยาธิสภาพ (pathophysiological) ตามลำดับ (Liu and Hotchkiss, 1995)

Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Prostaglandin E₂ (PGE₂) เป็นอีกหนึ่ง mediator สำคัญที่ตอบสนองในระหว่างการอักเสบ การสังเคราะห์ PGE₂ เกิดผ่านเอนไซม์ cyclooxygenase หรือ prostaglandin synthase (PGH₂) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น PGH₂ ซึ่งเปลี่ยนต่อเป็น PGE₂ และ prostaglandins (PGs) ชนิดอื่นๆ เช่น PGI₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGD₂ และ thromboxane A₂ (รูปที่ 3) เอนไซม์ cyclooxygenase มี 2 ประเภท (isoform) คือ เอนไซม์ cyclooxygenase-1 (COX-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภทที่ถูกสังเคราะห์และแสดงออกตลอดเวลา (constitutively expressed) ในสภาวะปกติในร่างกายเพื่อทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา

และเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อถูกชักนำ (induced) ให้แสดงออกระหว่างเกิดการอักเสบ (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003; Iñiguez *et al.*, 2003) ตัวอย่างเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ COX-2 ได้แก่ macrophages, endothelial cell และ synoviocytes เป็นต้น การเกิด transcription ของยีน COX-2 ถูกกระตุ้นโดย growth factor, cytokine และ endotoxin ตัวอย่างสารที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ COX-2 ได้แก่ proinflammatory cytokines (IL-1 α/β , IL-2, IFN- γ , และ TNF- α), endotoxin, mitogens, oncogenes, phorbolic ester, growth factors และ hormones เป็นต้น การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 เกิดขึ้นได้ด้วย cytokine บางชนิด เช่น IL-4, IL-10 และ IL-13 รวมถึง glucocorticoid (Dannhardt and Kiefer, 2001) นอกจากบทบาทของ COX-2 ในกระบวนการอักเสบ COX-2 ยังมีบทบาทในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) มะเร็งลำไส้ (colon cancer) และโรค Alzheimer ซึ่งโรคเหล่านี้มีการแสดงออกของ COX-2 ในปริมาณสูง ดังนั้น การพัฒนาายามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX-2 จึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะกลุ่มที่มีฤทธิ์จำเพาะต่อ COX-2 โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของ COX-1 ซึ่งมีบทบาทจำเป็นในการควบคุมการทำงานในด้านสรีรวิทยาของร่างกาย (Vane *et al.*, 1998)

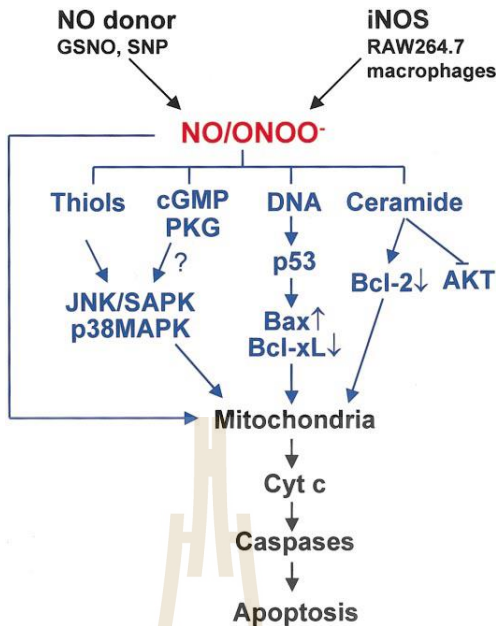


รูปที่ 3 การสังเคราะห์ prostanoids. Arachidonic acid ถูกสังเคราะห์จาก phospholipids ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดย phospholipase A2 arachidonic acid ถูกเปลี่ยนเป็น prostaglandin G2 (PGG₂) และเปลี่ยนต่อเป็น PGH₂ โดย cyclooxygenases (COX-1 และ COX-2) สำหรับการเปลี่ยนจาก PGH₂ เป็น

prostanoids ที่แตกต่างกัน (prostaglandins และ thromboxanes (TXs)) ถูก catalyzed โดย เอนไซม์ synthases และ isomerases ต่าง ๆ ที่จำเพาะ อักษรย่อ: 15dGJ₂, 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂; 6-keto-prostaglandin F_{1 α} (Iñiguez *et al.*, 2003)

บทบาทของ NO ใน apoptosis

Apoptosis เป็นกระบวนการตายของเซลล์แบบมีระเบียบแบบแผนตามโปรแกรมที่ถูกกำหนดของเซลล์ การชักนำให้เกิด apoptosis มีหลายวิธี อาทิเช่นการกระตุ้น death receptor เช่น Fas, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) สภาวะเครียดของเซลล์ (cellular stress) ชักนำให้เกิดการหลั่งของ cytochrome c จาก mitochondria ความเสียหายต่อ DNA และการติดเชื้อไวรัส (viral infection) เป็นต้น (Schmitt and Lowe, 1999) หน้าที่หนึ่งของ NO คือการชักนำความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้องอก (tumor cells) และเนื้อเยื่อที่อยู่โดยรอบ ปริมาณที่สูงของ NO หรือ peroxynitrite สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์หลายชนิด เช่นเซลล์ macrophages, thymocytes, pancreatic islets, neuron บางชนิด และ เซลล์เนื้องอก เป็นต้น โดยส่วนใหญ่ NO สามารถส่งเสริมการเกิด apoptosis (proapoptotic) ต่อเซลล์เหล่านั้นโดยไม่จำเป็นต้องขึ้นอยู่กับ cGMP แต่ก็ไม่ทั้งหมด ปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการเกิด apoptosis โดย NO คือสภาวะการให้หรือรับอิเล็กตรอน (redox state) และ transition metal complexes ภายในและการแสดงออกของยีน NO สามารถชักนำการเกิด apoptosis ได้หลายวิธี ดังแสดงในรูปที่ 4 คือ NO สามารถชักนำให้เกิดรูรั่ว หรือการสลายของเยื่อหุ้ม mitochondria เกิดการหลั่ง cytochrome c จาก mitochondria สู่ cytoplasm ซึ่งกระตุ้นให้เกิด apoptosis ผ่านเอนไซม์ caspase นอกจากนี้ NO ยังสามารถจับกับ cytochrome c oxidase ใน mitochondria electron transfer chain ภายใต้อาณัติ superoxide ที่เกิดจาก mitochondria สามารถทำปฏิกิริยากับ NO เกิดเป็น peroxynitrite มีผลทำให้ mitochondria ทำงานผิดปกติ และปลดปล่อย cytochrome c นอกจากนี้ ทั้ง NO และ peroxynitrite สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อ DNA และชักนำให้เกิด apoptosis โดยการสะสมของ p53 และการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วน Bax/Bcl-xL ที่นำไปสู่การปลดปล่อย cytochrome c NO ที่สร้างโดย iNOS ยังชักนำการเกิด apoptosis ได้โดยการกระตุ้น (activation) ของ JNK/SAPK, p38MAPK และ caspase 3 นอกจากนี้ NO ยังสร้าง ceramide ที่ก่อให้เกิดการปลดปล่อย cytochrome c และก่อให้เกิด apoptosis ด้วยการกระตุ้น caspase-9, caspase-3, JNK/SAPK, การยับยั้งของ protein kinase B/AKT รวมถึงการยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 (Chung *et al.*, 2001)



รูปที่ 4 กลไกการกระตุ้นให้เกิด Apoptotic pathway ที่ชักนำโดย NO (Chung *et al.*, 2001)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและชีวภาพของพืชสมุนไพร

งานศึกษาและวิจัยมากมายแสดงว่าสารบริสุทธิ์หรือสารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและชีวภาพ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ สารสกัดจากธรรมชาติบางชนิดนอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีคุณสมบัติต้านการอักเสบร่วมด้วย (Calixto *et al.*, 2003; Kris-Etherton *et al.*, 2004) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบ *in vitro* เซลล์ที่นิยมใช้ในการศึกษามากที่สุดคือเซลล์ macrophage เพราะจัดเป็นหนึ่งใน inflammatory cells ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการอักเสบและเกิดมะเร็ง ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น เซลล์ macrophage สังเคราะห์อนุมูลอิสระทั้งชนิด reactive oxygen species (ROSs) และ reactive nitrogen species (RNSs) ต่างๆ มากมาย เช่น NO^{\bullet} , H_2O_2 และ ONOO^- รวมถึงการสร้างเอนไซม์ iNOS และ COX-2 (Karpuzoglu and Ahmed, 2006) นอกจากทำลายจุลินทรีย์ที่กลืนกินเข้าสู่เซลล์ (phagocytosis) ROSs และ RNSs ที่สร้างขึ้น ชักนำให้เกิด pro-oxidant environment ทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกาย ลดระดับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และ/หรือทำลายความเสียหายต่อ DNA ดังพยาธิสภาพที่พบในโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง เช่น โรคไขข้ออักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) ภูมิคุ้มกันตนเอง ปฏิกิริยาการไม่ยอมรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เหงือกอักเสบ (gingivitis) และพิษในกระแสโลหิต (sepsis diseases) เป็นต้น (deRojas-Walker *et al.*, 1995; Virgili *et al.*, 1998)

ตัวอย่างของสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทั้งต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบโดยผ่านกลไกการยับยั้ง NO, iNOS หรือ COX-2 มีมากมาย อาทิเช่น สารประกอบ polyphenol จาก *Ulmus macrocarpa* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการยับยั้ง DPPH[•] และต้านการอักเสบโดยการยับยั้ง NO ในเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และยังยับยั้งเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์ชนิดนี้ร่วมด้วย (Kwon *et al.*, 2011) Wang *et al.* (2006) ได้แสดงว่าสารในกลุ่ม flavonoids เช่น flavonols, kaemferol, quercetin, morin, และ myricetin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการยับยั้ง DPPH[•] และต้านการอักเสบโดยการยับยั้ง NO ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เช่นกัน arctigenin เป็นสารที่ค้นพบในพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการยับยั้ง ROSs ภายในเซลล์ และมีคุณสมบัติต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการแสดงออกของอินและโปรตีน iNOS ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS มีงานศึกษาและวิจัยมากมายที่สนับสนุน polyphenol โดยเฉพาะกลุ่ม flavonoid ในพืชสมุนไพรหลายชนิดทั้งในรูปสารบริสุทธิ์ หรือสารสกัดสามารถยับยั้งการสร้าง NO ภายในเซลล์ เช่น rutin, quercetin, apigenin, wogonin, luteolin, tectoriginin, galangin, morin, naringenin, epigallocatechin gallate, ginko biloba extract (Egb 761), silymarin, hesperidin, pycnogenol, grape seed extract รวมถึงสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม เป็นต้น (Kolb and Kolb-Bachofen, 1992; Kim *et al.*, 1999; Raso *et al.*, 2001; Kobuchi *et al.*, 1997; Sakata *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002; Komutarin *et al.*, 2004) สาร flavonoids ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและ/หรือยับยั้งการสร้าง NO มีฤทธิ์ป้องกันความเสียหายต่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยการยับยั้งกระบวนการเกิด apoptosis เช่น L-ascorbic acid ยับยั้งการเกิด apoptosis ในเซลล์ T84 และ RAW264.7 (Sandoval *et al.*, 1997) สารประกอบ polyphenol เช่น caffeic acid, allagic acid และ ferulic acid สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ได้ในเซลล์เม็ดเลือดคนปกติ (normal human peripheral blood) (Khanduja *et al.*, 2006) วิตามิน E ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ในเซลล์ประสาท HT-22 โดยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ anti-apoptotic protein (Choi *et al.*, 2003) IH 636 GSPE มีฤทธิ์ยับยั้งการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) และ apoptosis ในเซลล์ keratinocyte ที่เตรียมจากปากของคนที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสกัดจากยาสูบ (smokeless tobacco extract) (Bagchi *et al.*, 2002)

สารกลุ่ม oligomeric proanthocyanidins (OPCs) เป็นสารสำคัญค้นพบโดยชาวฝรั่งเศส professor Jacques Masquelier ได้จดสิทธิบัตรสาร OPCs ที่สกัดจากเปลือกต้นสน (French maritime pine bark) ใช้ชื่อทางการค้าว่า pycnogenols ในกลุ่มยุโรปหรือ MASQUELIER'S[®] ในประเทศสหรัฐอเมริกา และมีผู้สกัดสารใหม่ในกลุ่ม OPCs จากเมล็ดองุ่น เรียกว่า IH636 grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) (Fine, 2000; Bagchi *et al.*, 2000) OPCs มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และพบได้ในพืชหลายชนิด มี

รายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาต่าง ๆ มากมาย เช่น มีฤทธิ์ต้าน bacteria ต้านไวรัส ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ และภูมิแพ้ และช่วยขยายหลอดเลือด เป็นต้น นอกจากนี้ มีงานวิจัยว่า OPCs สามารถยับยั้ง lipid peroxidation, การเกาะกันของเกร็ดเลือด (platelet aggregation), การซึมผ่าน (permeability) ของสารและความเปราะบาง (fragility) ของหลอดเลือดฝอย (capillary) และยังมีผลยับยั้ง เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ phospholipase A2, cyclooxygenase, และ lipoxygenase ใน ปัจจุบันมีการนำ OPCs ไปประยุกต์ใช้เป็นยาเพื่อลดการบวมน้ำ (edema) เพิ่มการไหลเวียนของโลหิตต่อ ร่างกาย (peripheral circulation) ปรับปรุงการมองเห็นของสายตา รักษาเบาหวานขึ้นจอตา (diabetic retinopathy) ป้องกันการเกิดโรคหัวใจ รักษาภาวะคอเรสเตอรอลสูงในเลือด (hypercholesterolemia) ลด การเกิดภูมิแพ้และการตอบสนองต่อการอักเสบ รวมทั้งรักษาบาดแผล (Fine, 2000) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ ว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง และมีสารประกอบ polyphenol โดยเฉพาะสารกลุ่ม OPCs เป็นส่วนประกอบหลัก และสามารถต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้าง NO ทั้ง ในเซลล์ macrophage ในช่องท้องและในเซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 (Pumthong, 1999; Komutarin *et al.*, 2004) นั้น น่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ/หรือ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ และสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามน่าจะสามารถ ปกป้องการเกิด apoptosis ในเซลล์ RAW264.7 เมื่อถูกกระตุ้นได้ด้วยเช่นกัน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมี

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อสารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัท
Acetic acid	Merck
Acrylamide	Sigma
Agarose	GIBCO
Ammonium persulfate	Merck, Darmstadt
Annexin V-FITC apoptosis detection kit II	BD Biosciences
Anti- iNOS (mouse monoclonal IgG1) (C-11)	Santa cruz
Anti-COX-2 (murine monoclonal IgG1) (Sc-1999)	Santa cruz
Anti-COX-2 (murine polyclonal) (160106)	Cayman
L-Ascorbic acid (vitamin C)	Sigma-Aldrich
Boric acid (H ₃ BO)	Merck, Darmstadt
Bromphenol blue	Sigma
Coomassie blue G250	Sigma
Dicolfenac	NOVARTIS
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT)	Wako company
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Wako company
DNA detection Kit	QIAGEN
DNA Ladder 100 bp	BIOLabs Inc.
DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	Sigma
ECL Plus Western blotting detection reagents	Amersham
Ethidium bromide	Sigma

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อสารเคมี (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	บริษัท
Ethyl alcohol	BDH
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma
E-64	Sigma-Aldrich
Etoposide (20 mg/mL)	Fytosid
Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone
Ferric-2,4,6-tripyridyl-s-triazine (FeIII-TPTZ)	Sigma
Ferrous sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	Sigma
Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent	Sigma
Hybond ECL nitrocellulose membrane	Amersham
Hyperfilm ECL	Amersham
Gallic acid	Sigma
Gentamicin	Gibco
Goat-anti-mouse-IgG-HRP conjugate (sc-2005, lot L1304)	Santa Cruz
Goat-anti-rabbit IgG-HRP conjugate (10004301)	Cayman
Glycine	Sigma
N-2-hydroxethyl sulfuric acid (HEPES) buffer	Gibco
Interferon gamma (IFN- γ)	Sigma
Leupeptin	Sigma
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma
Methyl alcohol	Sigma
Octylphenoxypolyethoxylethanol (Nonidet-P 40)	Bio active
Penicillin and streptomycin solution	Sigma
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อสารเคมี (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	บริษัท
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma
Proanthocyanidin from grape seed extract (GSE)	Sigma
Rainbow coloured protein molecular weight marker	GE Healthcare
Resazurin	Sigma
RNase A	US Biology
RPMI 1640	Gibco
Sodium acetate	Sigma
Sodium azide	Sigma
Sodium bicarbonate	Sigma
Sodium carbonate	Sigma
Sodium dodecyl sulfate	Sigma
Sodium hydroxide	Carlo
Trizma base	Sigma
Triton X-100 Bio-Active	Bio-Active
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)	Sigma
Trypan blue dye	Gibco
α -tubulin (mouse monoclonal IgG) (B-7, Sc 5286, lot J2505)	Santa cruz
Trypsin	Gibco
Tween-20	Sigma

น้ำ

น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำกลั่น (distilled water; DI) ยกเว้นในการทดลองด้านเซลล์ ใช้ MilliQ water (MQ water) ซึ่งได้จากการนำน้ำ DI ผ่านเข้าเครื่อง Millipore Milli-Q Simplicity 185 (EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA)

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือการวิจัย

ตารางที่ 2 แสดงวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ	บริษัท
6-well plate (flat bottom)	Co-Star
24-well plate (flat bottom)	Co-Star
96-well plate (flat, round and U bottom)	Co-Star
Alundum extraction thimbles	Fisher Scientific
Blender	Moulinex
Centrifuge machine model RT 7	SORVALL
CO ₂ incubator	SHEL LAB
Conical tubes	Nunc Co.
Coulter counter	Beckman
Electrophoresis system model # B1	BIORAD
Intelligent electrophoresis unit (model I My run)	Cosmo Bio
ELISA plate reader (model E6504)	BIORAD
FACScalibur cell analyzer (model FACScalibur™ Flowcytometry)	Becton Dickinson
Glasswares	Pyrex Co.
Haemocytometer และ cover slip	Fisher Scientific
Hot air oven	Gallenkamp
Inverted microscope	Olympus optical
Laminar flow hood (model SG 600E)	Holten, Scientific
Light microscope	Nikon
Lyophilizer	Dura-dry
Microcentrifuge	SORVALL
Microscope slides	Fisher Scientific
Multichannel pipette	Gibco

ตารางที่ 2 แสดงวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการวิจัย (ต่อ)

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ	บริษัท
Pasteur pipettes	Fisher Scientific
pH meter	Metrohm
Rotary evaporator with vacuum (model R205)	Buchi
Single frosted end slide	Fisher Scientific
Snap cap tubes	Nunc
Soxhlet extraction apparatus (model B-811)	Buchi
TLC plate Silica gel 60 F254 (Cat.OB 342214)	Merck
UV-Vis spectrophotometer	Perkin Elmer
Water bath (model 122006180703)	SHEL LAB
WEALTEC Dolphin-DOC ultraviolet analyzer	WEALTEC

วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการวิจัย

ทุกการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) กระทำในตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet class II) ใช้วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ปลอดเชื้อรวมทั้งใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ส่วนความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ระบุในการทดลองเกี่ยวกับเซลล์เป็นความเข้มข้นสุดท้ายของสารใน culture การบ่มเซลล์กระทำในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ การทดลองอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์กระทำในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ส่วนประกอบของ reagents ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองแสดงอยู่ในภาคผนวก ก ผลการทดลองที่แสดงทุกการทดลองเป็นตัวแทนของการทดลองแบบเดียวกันอย่างน้อย 3 ซ้ำ ทั้งห้องเพาะเลี้ยงเซลล์และห้องปฏิบัติการพิษวิทยาอยู่ที่อาคารเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. เซลล์สายพันธุ์ (Cell lines)

เซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 gamma NO (-) (ATCC, CRL2278) ซึ่งเป็นเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ถูกใช้เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อกลไกการยับยั้งการสร้าง NO

เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ และใช้ในการทดลองการยับยั้งการเกิด apoptosis เมื่อเซลล์ถูกชักนำให้เกิด apoptosis ด้วย etoposide

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW264.7

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ (complete media) คือ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/L ของ sodium carbonate, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin และ 100 μ g/mL streptomycin การบ่มเซลล์กระทำในตู้บ่ม (incubator) ภายใต้สภาวะ 37°C, 5% CO₂ และเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตคลุมพื้นที่ผิวใน culture flask (confluence) ประมาณ 80% ทุกครั้งก่อนนำเซลล์ไปใช้ในการทดลอง

1.2 การ trypsinize เซลล์ RAW264.7

เมื่อปริมาณเซลล์เจริญคลุมพื้นที่ผิวเพาะเลี้ยงใน culture flask ตามต้องการแล้ว สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการ trypsinize เซลล์เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นที่ผิวเกาะยึดใน flask ที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. Pipette RPMI media ออกจากเซลล์ที่อยู่ใน culture flask
2. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS
3. Trypsinize เซลล์ออกด้วยการใช้สารละลาย trypsin (0.25% trypsin 1 mM EDTA ใน 0.85% NaCl) โดยใช้ปริมาตรของสารละลาย trypsin ให้น้อยที่สุด แต่สามารถคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดของเซลล์ ซึ่งกระทำโดยขยับ flask ไปมาอย่างนุ่มนวลให้ trypsin ไหลคลุมผิวเซลล์ให้ทั่ว
4. บ่มเซลล์ร่วมกับ trypsin ที่ตู้บ่ม 37 °C 5% CO₂ เป็นระยะเวลาประมาณ 5-10 นาที ในระหว่างการบ่ม นำเซลล์ออกมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (invert microscope) เป็นครั้งคราวเพื่อดูว่าเซลล์ได้หลุดออกจากพื้นที่ผิวเกาะยึดหมดแล้วหรือไม่ ทั้งนี้สามารถเคาะ flask เบา ๆ และหมั่นกลิ้ง trypsin ให้คลุมพื้นที่ผิวให้ทั่ว flask เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดง่ายขึ้น ระยะเวลาของการบ่มเซลล์กับ trypsin ควรใช้ระยะเวลาให้สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ ในกรณีของเซลล์ RAW264.7 จะค่อนข้าง trypsinize ออกยาก ในบางครั้งอาจใช้เวลานานกว่า 10 นาที แต่ไม่ควรใช้เวลา มากกว่า 15 นาที เพราะ trypsin เป็น protease ถ้าสัมผัสกับเซลล์นานเกิน จะเป็นพิษต่อเซลล์

5. เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นที่ผิวเรียบร้อย รีบทำการต้านฤทธิ์ (neutralize) ของ trypsin ด้วยการใส่ complete RPMI media ซึ่งมี 10% FCS
6. ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 1,500 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที
7. ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS
8. Resuspend เซลล์ใน media ที่ต้องการใช้ในการทดลอง

2. การเตรียมสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

รายละเอียดและขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม มีดังนี้คือ

1. อบเมล็ดมะขามให้แห้งที่อุณหภูมิ 140°C เป็นระยะเวลา 2 ชม.
2. นำเมล็ดแห้งโขกให้แตกในโกร่งบดยา (mortar and pestle) แยกเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามออกจากเมล็ดมะขามด้วยการใช้มือ (ใส่ถุงมือ) ขยี้เปลือกออก และปั่นเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น (Moulinex)
3. สกัดผงบดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามใน 50% acetone ด้วยเครื่อง soxhlet ใส่ผงบดในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง (thimble) ที่มีขนาดของรูเยื่อกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-15 μm ทำการสกัดจนกระทั่งตัวทำละลายไม่สามารถชะสีจากตัวอย่างได้เพิ่มขึ้น (สารละลายใส ไม่มีสี หรือจางลงมาก (ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน)
4. ทำสารละลายให้เข้มข้นที่สุดเท่าที่กระทำได้ด้วยการใช้เครื่อง rotary evaporator
5. นำสารละลายเข้มข้น ไปแช่แข็งที่ -80°C เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 16 ชม. นำสารละลายเข้มข้นที่แข็งตัวไปทำให้แห้งเป็นผงด้วยเครื่อง lyophilizer (ใช้เวลาประมาณ 2 วัน)
6. เก็บสารสกัดที่เปลี่ยนเป็นผงแห้งไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ทุกการทดลอง ผงแห้งของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (TAM) ถูกนำมาละลายใน methanol : น้ำ ด้วยอัตราส่วน 1 : 2 ยกเว้นกรณีการทดลองเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ สารสกัด TAM ถูกนำมาละลายใน 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเจือจางด้วย RPMI complete media เพื่อป้องกันการเกิดพิษเนื่องจาก DMSO และให้ได้ความเข้มข้นของสารตามที่ต้องการ

3. การวิเคราะห์หาปริมาณ phenolics รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1 การหาปริมาณ phenolics รวม (total phenolic content)

การหาปริมาณ phenolic รวมในสารสกัด TAM ใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) Folin–Ciocalteu reagent ประกอบด้วยสาร sodium tungstate, sodium molybdate, phosphoric acid และ sodium carbonate หลักการของวิธีทดสอบคือ เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน ไอออน Molybdate (Mo) VI ซึ่งมีสีเหลืองจะถูกรีดิวซ์ให้อยู่ในรูปของ Mo V ซึ่งมีสีน้ำเงิน และวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ซึ่งอาจใช้สารมาตรฐานกรดแทนนิก (tannic acid) กรดแกลลิก (gallic acid) หรือคาทีชิน (catechin) เป็นตัวแทนของสารประกอบ phenolic อ้างอิง (Singleton *et al.*, 1999) การหาปริมาณของ phenolic รวมในสารสกัด TAM ด้วยวิธีของ Folin Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) มีการดัดแปลงบางขั้นตอนดังรายละเอียดดังนี้คือ

1. เติมสารสกัด 0.02 mL, methanol : water (1:2) 1.5 mL และ Folin-Ciocalteu reagent 0.1 mL ลงไปใน cuvette ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
2. เติม sodium carbonate (7.5%) 0.3 mL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.5 ชม.
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ด้วย Perkin-Elmer15 UV-Vis spectrophotometer (Norwalk, CT)
4. หาปริมาณ phenolics โดยคำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน gallic acid ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 25, 100, 200, และ 300 µg/mL
5. รายงานผลความเข้มข้นของสารประกอบ phenolic ในสารสกัดเป็น mg ของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมของสารสกัด

3.2 การวิเคราะห์หาสารประกอบของ TAM ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-layer chromatography; TLC)

ในการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด TAM ด้วยวิธี TLC ใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Pumthong (1999) ในการทดลองใช้ TLC plate Silica gel 60 F₂₅₄ และสารละลาย toluene : acetone : formic acid ในอัตราส่วน 6 : 6 : 1 ดังมีรายละเอียดของวิธีการดังต่อไปนี้

1. การแยกสารประกอบ ถูกสร้างขึ้นด้วยการใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วยตัวดูดซับชนิด silica ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่มีสารเรืองแสงผสมอยู่
2. ทำสัญลักษณ์เป็นจุดเล็ก 2 จุด ไว้ที่ขอบล่างของแผ่น TLC โดยเว้นระยะห่างจากขอบล่าง 1 cm
3. ใช้หลอดแคปิลลารี (capillary) ดูดสารละลายของสารสกัด TAM และสารอ้างอิง (สารสกัดจากเมล็ดคอรัน; GSE) แล้วจุด (spot) ลงบนแผ่น TLC ตรงจุดที่ทำสัญลักษณ์ไว้ ตัวอย่างละจุด รอให้ตัวอย่างซึมเข้าไปในแผ่น TLC ก่อนทำการจุดตัวอย่างซ้ำบนจุดเดิม กระทำการจุดแต่ละตัวอย่างซ้ำ ๆ กันหลายครั้ง จนจุดที่ได้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ระวังให้เส้นผ่านศูนย์กลางของแต่ละจุดไม่เกิน 1 ซม. รอให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง ก่อนทำขั้นตอนนี้ต่อไป
4. นำแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้วมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลาย toluene : acetone : formic acid ในอัตราส่วน 6 : 6 : 1 ปิดฝาภาชนะให้สนิทเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นข้างบนได้เร็วขึ้น
5. เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนเกือบถึงขอบบน ให้นำแผ่น TLC ออกพร้อมกับขีดแนวที่ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปได้สูงสุด (solvent front) ก่อนที่ตัวทำละลายจะแห้ง
6. ตรวจสอบสารประกอบ flavonoids ที่มีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระโดยการฉีดพ่นสารละลาย DPPH ลงไปบนแผ่น TLC

3.3 การตรวจสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระชนิด 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น สาร reagent ที่ใช้ คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) ซึ่งเป็น organic nitrogen radical ที่เสถียรและมีสีม่วงใน

ตัวทำละลาย methanol ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย scavenge radical ได้ ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงจะจางลง การทดสอบกระทำตามวิธีที่อธิบายโดย Saha *et al.* (2004) โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังมีรายละเอียดดังนี้

1. เตรียมสารสกัด TAM 10 mg/mL ใน methanol เพื่อใช้เป็น stock
2. เจือจาง stock solution ของสารสกัด TAM ด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500-3.9 $\mu\text{g/mL}$
3. เติมสารสกัด TAM ของแต่ละความเข้มข้น 95 μL ลงไปใน 96-well plate ใช้ตัวอย่างละ 4 ขั้ว
4. เติม 5 μL ของสารละลาย DPPH 10 mg/mL ที่เตรียมใน methanol ลงไปในแต่ละหลุม
5. ผสมสารสกัดและสารละลาย DPPH ให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 517 nm โดยการใช้ spectrophotometer
7. คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด DPPH \cdot โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\text{Percent inhibition} = \frac{\text{OD(DPPH)} - \text{OD(DPPH+sample)}}{\text{OD(DPPH)}} \times 100$$

3.4 FRAP (ferric reducing/antioxidant power) assay

FRAP assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนหรือถูกรีดิวซ์จากสารต้านออกซิเดชัน จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน วิธีนี้สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 593 nm จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วรายงานเป็นค่าของ FRAP (FRAP value) การวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของแต่ละสารสกัดกระทำตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996) ดังมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมส่วนประกอบของ FRAP reagent ซึ่งประกอบด้วย 300 mmol/L ของ acetate buffer (pH 3.6), 10 mmol/L 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) solution ใน 40 mmol/L HCl และ สารละลาย 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
2. นำส่วนประกอบของสารทั้ง 3 ชนิดในข้อ 1 ผสมรวมกันด้วยอัตราส่วน 10:1:1 (v/v/v) เพื่อเตรียม FRAP reagent
3. เติม FRAP reagent (3 mL) ลงไปใน หลอดทดลองที่มี 0.1 mL ของสารสกัด และ ผสมให้เข้ากันด้วย vortex โดยทุกตัวอย่างจะถูกกระทำ 3 ครั้ง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ 593 nm โดยใช้ spectrophotometer
5. นำไปคำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และสารมาตรฐาน vitamin C
6. รายงานความสามารถในการรีดิวซ์ของแต่ละสารสกัดโดยแสดงผลเป็น FRAP value มีหน่วยเป็น $\text{mol Fe}^{\text{II}}/\text{L}$ หรือรายงานเป็นค่า mg vitamin C equivalent (VCE) ต่อ กรัมของสารสกัด

4. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ RAW264.7 กระทำด้วย 2 วิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ trypan blue exclusion และ resazurin-based *in vitro* toxicology assay

4.1 การบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด TAM

ทั้ง 2 วิธีที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษ เริ่มต้นเหมือนกันโดยการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัด TAM โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ใส่เซลล์ RAW264.7 ที่อยู่ใน RPMI complete media ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate (5×10^5 เซลล์ต่อหลุม) ในกรณีที่เหมาะสมด้วยวิธี trypan blue exclusion และ ใส่เซลล์ลงไปในแต่ละหลุมของ 24-well plate (6×10^5 เซลล์ ต่อหลุม) ในกรณีที่เหมาะสมด้วย resazurin-based *in vitro* toxicology assay

2. นำเซลล์ที่อยู่ใน plate เข้าบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 2 ชม. เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับ plate
3. หลังจากนั้นเติมสารสกัด TAM ลงไปในแต่ละหลุมของ plate โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 0.01-100 µg/mL และบ่มเซลล์ต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.
4. เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการประเมินความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์ด้วยการใช้ 2 วิธีเปรียบเทียบกัน

4.2 การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion

การประเมินความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์ RAW264.7 ด้วยการย้อมสี trypan blue อาศัยหลักการว่า โดยปกติสี trypan blue ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตได้ ดังนั้น เซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสี trypan blue เฉพาะเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้นที่ย้อมติดสีน้ำเงินของ trypan blue ขั้นตอนของวิธีทดสอบมีดังนี้คือ

1. นำ single cells 100 µL ใส่ในหลอดทดลอง และใส่ปริมาตรที่เท่ากันของสี trypan blue 0.4% (w/v) ใน normal saline solution (0.85% sodium chloride)
2. Pipet เซลล์ที่ผสมอยู่กับสี trypan blue ลงไปในช่องของ haemocytometer สำหรับนับเซลล์และปิดด้วย cover glass
3. นับเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์มีลักษณะใสเพราะไม่ติดสีน้ำเงิน) และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (เซลล์ติดสีน้ำเงิน) โดยการใช้ haemocytometer และกล้องจุลทรรศน์แบบพื้นสว่าง (light microscope) ด้วยกำลังขยาย 100X (objective len 10X และ ocular len 10 X)
4. กำหนดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้สมการ:

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} - \text{จำนวนเซลล์ที่ตาย}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

4.3 Resazurin-based *in vitro* toxicology assay

การประเมินความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์ RAW264.7 ด้วยการย้อมสีเรืองแสง (fluorescence) resazurin มีหลักการว่า เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตสามารถรีดิวซ์สี resazurin ซึ่งมีสีน้ำเงิน

เข้มใน oxidized form ให้เปลี่ยนเป็น fluorescent intermediate resorufin ซึ่งมีสีแดง และสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ด้วย spectrophotometrically หรือ fluorometrically วิธีการทดลองมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. เติม resazurin dye solution ที่เจือจาง 10 เท่าจาก stock 10 mg/mL ด้วย RPMI complete media ลงไปในแต่ละหลุมของ 24-well plate
2. บ่มเซลล์ที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชม.
3. Pipette supernatant 200 μ L ที่มีสารเรืองแสง resazurin ไปใส่ใน 96-well plate และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย fluorometer

5. การวัด nitrite (nitrite assay)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของเมสลิคมะขามสามารถวัดได้จาก inflammatory mediator NO ที่สร้างจากเซลล์ RAW264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ โดย NO ที่เกิดขึ้นใน culture media จะถูก oxidize เป็น nitrite อย่างรวดเร็ว ปริมาณของ nitrite ที่เกิดขึ้นจึงเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ดังนั้น ในงานทดลองจึงนิยมวัดปริมาณของ nitrite ที่เกิดขึ้นแทนการวัดปริมาณของ NO โดยตรงซึ่งต้องใช้เครื่องมือและเทคนิคที่ยุ่งยาก การวัดปริมาณของ nitrite ซึ่งเป็นผลผลิตที่มีความเสถียรของ NO สามารถกระทำโดย Griess reagent (de Oliveira *et al.*, 2012) สำหรับรายละเอียดของการทดลองมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. Plate เซลล์ RAW264.7 cells (2×10^5 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate และบ่มไว้เป็นเวลา 2 ชม. เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะติดพื้นที่ผิวของหลุม
2. เติม antioxidant positive control ได้แก่ vitamin C (500 μ M) หรือ GSE (10 μ g/mL) และสารสกัด TAM (1, 5, หรือ 10 μ g/mL) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate
3. หลังจากการบ่มเป็นเวลา 30 นาที กระตุ้นการสร้าง NO ด้วยการใส่ LPS 1 μ g/mL ร่วมกับ IFN- γ 25 U/mL และบ่มเซลล์ต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.
4. เมื่อครบกำหนดเวลาการบ่ม นำ 96-well plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm 10 นาที แล้ว pipet 100 μ L ของ supernatant ไปยัง 96-well plate ใหม่ (ใช้ non-sterile plate ได้ในขั้นตอนนับจากนี้)

5. เติม 100 μL ของ Griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) และ 3% phosphoric acid] ลงไปใน plate ที่มี supernatant อยู่ ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงอย่างนุ่มนวล พยายามหลีกเลี่ยงการเกิดฟอง บ่มเซลล์ในที่มีดเป็นระยะเวลา 10 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 nm โดยการใช้อย่าง spectrophotometric microplate reader
7. ปริมาณของ nitrite ในตัวอย่าง คำนวณได้โดยการเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน sodium nitrite ที่มีความเข้มข้น 1.56 μM – 200 μM

6. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2

6.1 การเตรียม protein lysate

1. Plate เซลล์ RAW264.7 (2×10^6 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 6-well plate และบ่มเป็นเวลา 2 ชม. เพื่อให้เซลล์ติดที่พื้นผิวของแต่ละหลุม
2. เติมสาร antioxidant control ได้แก่ GSE (1 หรือ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) รวมทั้งสารสกัด TAM (1 หรือ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ลงไปในแต่ละหลุม
3. บ่มเซลล์ในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) เป็นระยะเวลาอีก 16-20 ชม.
4. ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS และเติม 150 μL ของ ice-cold lysis buffer (1 mL RIPA buffer ซึ่งได้เติม 2 mM PMSF, 2 μM leupeptin และ 1 μM E-64) เป็นเวลา 15 นาที
5. Pipet cell lysate ที่อยู่ในแต่ละหลุมของ 6-well plate ไปที่ microcentrifuge tubes และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 $\times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
6. เก็บ supernatant ไว้ใน -80°C เพื่อนำไปใช้ในการทำ Western blot ในขั้นตอนต่อไป และแบ่งอีกส่วนหนึ่งของตัวอย่างเดียวกันนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนใน lysate โดยใช้วิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยมีรายละเอียดของขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. เจือจาง protein lysate ใน lysis buffer (1 : 10 v/v)

2. เติม 20 μ L ของโปรตีนที่ได้เจือจางแล้วลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate ตามด้วย 200 μ L ของ reagent D และบ่มต่อเป็นระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติม 20 μ L ของ reagent C ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plat และบ่มที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นระยะเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 750 nm โดยการใช้ spectrophotometry microplate reader หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดโดยใช้ calibration curve ของสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

6.3 SDS-PAGE gel electrophoresis และ Western blot

การค้นหายูทึของสารสกัด TAM ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 กระทำโดยใช้เทคนิค Western blot ซึ่งเริ่มจากการแยกโปรตีนโดย polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีการของ Laemmli (1970) และหาชนิดของโปรตีนโดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา ขั้นตอนการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้คือ

1. นำ cellular protein ไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ใน 6X sample buffer (50 mM Tris-base, pH 7.4, 4% SDS, 10% glycerol, 4% 2-mercaptoethanol, 0.05 mg/mL ของ bromophenol blue)
2. โหลด (load) 30 μ g ของ cellular protein lysate ลงในแต่ละ lane ของ 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) กระทำการแยกโปรตีนที่ 125 โวลต์ เป็นระยะเวลา 150 นาที
3. ย้ายโปรตีนที่อยู่ในแผ่นเจลไปที่ nitrocellulose membrane โดยการ blot ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
4. Block membrane ด้วยการเติม 2% BSA และ 5% milk powder ใน 0.1% Tween-20 ใน PBS-buffer (TPBS) ลงไปที่แผ่น nitrocellulose membrane และบ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชม.
5. บ่ม nitrocellulose membrane ข้ามคืนด้วย 1 : 1000 dilution ของ primary antibody anti-iNOS mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)

- หรือ 1 : 2000 dilution ของ primary antibody anti-COX-2 mouse polyclonal (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)
6. ตรวจสอบและ normalize โปรตีนที่โหลดในแต่ละ lane ว่ามีปริมาณเท่ากันจริง โดย บ่ม nitrocellulose membrane ด้วย primary antibodies ต่อ protein ของ house keeping gene ต่าง ๆ ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ anti-tubulin mouse monoclonal antibody (Santa Cruz) ที่ได้เจือจาง 1 : 2000
 7. ภายหลังจากบ่ม primary antibody ดัง nitrocellulose membrane ด้วย TPBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และบ่ม nitrocellulose membrane ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ด้วย 1:10,000 dilution ของ secondary antibody goat-anti-mouse-HRP conjugate (Santa Cruz) สำหรับ iNOS และ tubulin และ goat-anti-rabbit IgG-HRP conjugate (Cayman) สำหรับ COX-2
 8. ภายหลังจากขั้นตอนการบ่มกับ secondary antibody ดังแผ่น membrane TPBS 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
 9. ในห้องมืด เติม ECL Western blotting substrate (Pierce Protein Research Products) ลงบน nitrocellulose membrane เคลือบให้ทั่วพื้นที่ผิว โดยบ่มเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการประกบกับฟิล์มเป็นเวลา 5 นาที สำหรับ iNOS และ 30 วินาที สำหรับ COX-2

7 การศึกษา apoptosis

การประเมินการตายของเซลล์แบบ apoptosis สามารถวิเคราะห์ได้จาก 2 ระยะของการเกิด apoptosis นั่นคือระยะเริ่มแรกของ apoptosis (early apoptosis) และระยะช่วงหลังของ apoptosis (late apoptosis) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการย้อมด้วยสี annexin V ควบคู่กับสี propidium iodide (PI) และวิเคราะห์การแตกหักเป็นท่อนๆ ของ DNA (DNA fragmentation) ตามลำดับ การเกิดการแตกหักของ DNA ในกระบวนการ apoptosis ทำให้เกิดลักษณะของ DNA ladder ใน agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการ apoptosis

7.1 Annexin V-PI

เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ถูกตรวจพบได้ด้วยการใช้ V-FITC apoptosis detection kit II (BD Biosciences) หลักการตรวจสอบของวิธีนี้คือ เซลล์ที่เริ่มเกิด apoptosis มีการเปลี่ยนแปลง โดย phosphatidyl serine (PS) ที่เดิมเคยอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) จะเคลื่อนออกสู่ผิวนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ย้อมติดสี annexin V ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 35-36 kDa ที่จับกับ phospholipid (phospholipid binding protein) โดย annexin V มีความจำเพาะกับ PS มากกว่า phospholipid ชนิดอื่น เนื่องจากสามารถจับกับประจุลบของ PS ได้สูง เซลล์ที่ไม่เกิด apoptosis จะย้อมไม่ติด annexin V เนื่องจากการเคลื่อนที่ของ PS เกิดก่อนการสูญเสียคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ย้อมไม่ติดสี PI ในระยะแรกเริ่มของการเกิด apoptosis สำหรับสี PI จะย้อมติดเฉพาะเซลล์ตายซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ทำให้สี PI สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปแทรกตัวระหว่าง (intercalate) base ของ nucleotide (ทั้ง DNA และ RNA) เมื่อจับกับ DNA สี PI จะให้สารเรืองแสง (fluorescent) เพิ่มขึ้นอีก 20-30 เท่า ทำให้สามารถตรวจสอบ DNA ได้ ทั้งนี้การตรวจสอบการเกิด apoptosis ของเซลล์โดยใช้ flow cytometer หากใช้ annexin V กับสารเรืองแสง (annexin V-fluorescein) ร่วมกับ PI จะสามารถจำแนกเซลล์ได้ 4 สถานะออกจากกันได้ คือ 1) เซลล์ที่มีชีวิต (ย้อมไม่ติด annexin V และไม่ติด PI) 2) เซลล์ที่เริ่มเกิด early apoptosis (ย้อมติด annexin V และไม่ติด PI) 3) เซลล์ที่เกิด late apoptosis/necrosis (ย้อมติด annexin V และ PI) และ 4) เซลล์ที่เกิด necrosis (ย้อมไม่ติด annexin V แต่ติด PI) (Fahrman and Hardman, 2013; Zhang *et al.*, 1997; Vermes *et al.*, 1995; Vermes, *et al.*, 2000; Darzynkiewicz, *et al.*, 1992) ขั้นตอนของวิธีทดสอบมีดังนี้คือ

1. Plate เซลล์ RAW264.7 จำนวน 1×10^6 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate และบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชม. เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะติดกับพื้นที่ผิว
2. เติม antioxidant positive controls ได้แก่ GSE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) และสารสกัด TAM (1, 10, หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ลงไปในแต่ละหลุมของ 6-well plate และบ่มเป็นระยะเวลา 30 นาที
3. เติมสาร etoposide เพื่อชักนำให้เกิด apoptosis โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ etoposide คือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และเซลล์ถูกบ่มต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.
4. ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS และอีก 2 ครั้งด้วย binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl และ 2.5 mM CaCl_2)

5. Resuspend เซลล์ใน 100 μ L ของ binding buffer และ 5 μ L ของ annexin-V
6. เติม 3 μ L ของ propidium iodide (PI) ลงไป และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด
7. Resuspend เซลล์ใน 400 μ L ของ binding buffer และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ flow cytometry (Becton Dickinson FACScalibur cell analyzer, USA)

7.2 DNA ladder

ลักษณะหนึ่งซึ่งค่อนข้างเป็นเอกลักษณ์ของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis คือเกิดการแตกหักของ genome DNA ตรงตำแหน่งของ nucleosome เกิดเป็น oligonucleosome fragment ที่มีขนาดแตกต่างกันขึ้นกับจำนวนของ nucleosome ในแต่ละ fragment ขนาดของท่อน DNA ที่แตกหัก หรือ DNA fragment สามารถตรวจสอบได้จากการเคลื่อนที่ของ DNA fragment ในสนามไฟฟ้าเมื่อถูกแยกออกจากกันโดย agarose gel electrophoresis เซลล์ที่เกิด apoptosis มีลักษณะจำเพาะของ DNA fragment ในเจลเป็นแบบขั้นบันได (DNA ladder) เนื่องจากขนาดของ fragment เป็นจำนวนเท่าของหนึ่ง nucleosome ที่ถูกตัดจาก genomic DNA โดยหนึ่ง nucleosome มี 180-200 base pair (Koopman *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1992; Wyllie *et al.*, 1984) ทั้งนี้สามารถหาขนาดของ DNA fragment หรือจำนวน base pair ได้โดยเทียบกับ DNA marker ที่รู้ขนาดของโมเลกุลอย่างแน่นอน ในการทดลองนี้ วิเคราะห์การแตกหักของ DNA ในเซลล์ที่เกิด apoptosis โดยใช้ genomic DNA detection kit (QIAGEN) (Kang, 2003) ขั้นตอนของการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้คือ

1. Plate เซลล์ RAW264.7 จำนวน 1×10^6 เซลล์/หลุมใน 6-well plate และบ่มเซลล์ในตู้บ่ม 37°C 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 2 ชม. เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะติดกับพื้นที่ผิว
2. เติม antioxidant positive controls ได้แก่ GSE (1, 10 หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) และสารสกัด TAM (1, 10, หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ลงไปในแต่ละหลุมของ 6-well plate และบ่มเซลล์ต่ออีก 24 ชม.
3. เติม etoposide 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เพื่อชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis บ่มเซลล์เพิ่มเติมอีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.
4. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS และเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการ trypsinize เซลล์ (ดูรายละเอียดการ trypsinize เซลล์ RAW264.7 ในหัวข้อ 2.2)

5. Cytosolic mononucleosomes และ oligonucleosomes (180 bp nucleotides หรือจำนวนเท่าของ 180 bp nucleotide) ถูกวิเคราะห์โดยใช้ DNA detection kit (QIAGEN) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือของชุด kit
6. Load DNA ลงไปใน 1.2% agarose gel ที่ประกอบด้วย 0.1 mg/mL ethidium bromide ใน 1X TBE buffer และ electrophoresis ที่ 80 volts เป็นระยะเวลา 90 นาที ใช้ 100 bp DNA markers ของ BIORLabs Inc. (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
7. ส่องดู DNA ladder ใน gel ภายใต้ WEALTEC Dolphin-DOC ultraviolet analyzer (WEALTEC, Corp., Sparks, Nevada, USA)

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

ชนิดข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบเดียวกัน (homogenous data) ประเมินด้วย One-way analysis of variance (ANOVA) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมด้วยการใช้ Dunnett's two tail Test สำหรับข้อมูลที่มีการกระจายต่างกัน (non-homogeneous data) ประเมินโดยการใช้ความแปรปรวนแบบสถิติการแจกแจงอิสระ (non-parametric analysis of variance) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมด้วยการใช้ Wilcoxon rank test

บทที่ 4

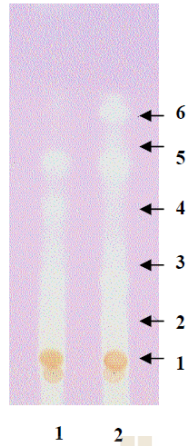
ผลการวิจัย

การสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วย acetone ได้ปริมาณสารสกัดร้อยละ 45.8 ของน้ำหนักสารสกัดแห้งเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามก่อนการสกัด สารสกัด TAM ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ phenolics และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ รวมถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo*

1. ปริมาณ phenolics และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.1 การตรวจสอบด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography system

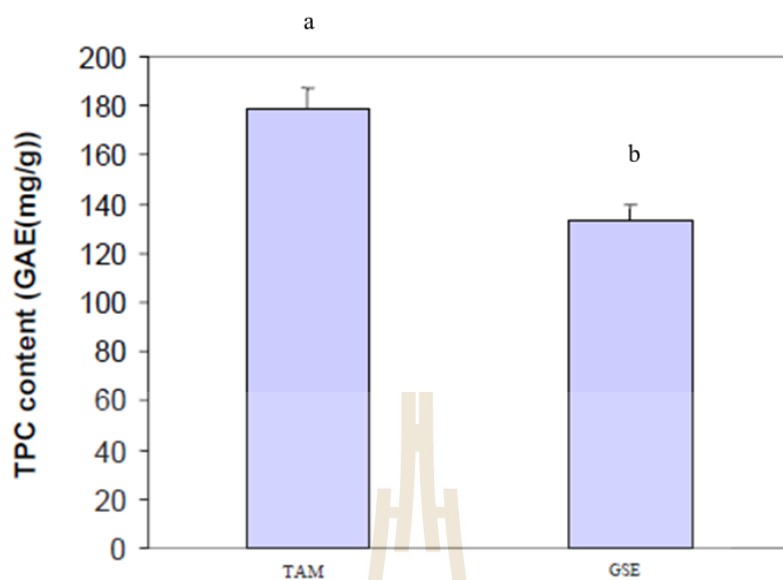
เพื่อตรวจสอบหาส่วนประกอบในสารสกัด TAM ที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging capacity) ส่วนประกอบต่างๆ ในสารสกัด TAM ถูกแยกออกจากกันด้วยวิธี TLC และค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระด้วยการใช้สารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วง ตรงตำแหน่งที่อนุมูลอิสระ DPPH ถูกกำจัด จะปรากฏเป็นสีขาวหรือสีม่วงที่ซีดจางลง (Soler- Rivas *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นหลักการเดียวกันกับวิธีการใน DPPH spectrophotometric assay รูปที่ 5 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัด TAM และ GSE ที่ได้จากการแยกสารด้วยการใช้ TLC ที่ develop ในสารละลาย toluene : acetone : formic acid (6:6:1, v/v/v) ผลการทดลองพบว่าการแยกสารสกัด TAM ได้สาร 6 กลุ่มหลัก (มี 6 ตำแหน่ง) โดยแต่ละตำแหน่งซึ่งมีสีเหลืองซีดหรือไม่มีสีของ DPPH มีค่า R_f ต่างกัน ดังนั้น สารสกัด TAM จึงประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างน้อย 6 ชนิด



รูปที่ 5 แสดง thin layer chromatography (TLC) ของสารสกัดจากเมล็ดมะขาม (TAM) ที่ย้อมด้วย DPPH solution หมายเลข 1 คือ GSE และหมายเลข 2 คือสารสกัด TAM สารละลายที่ใช้ใน TLC คือ toluene : acetone : formic acid (6:6:1, v/v/v)

1.2 ปริมาณของ phenolic รวม

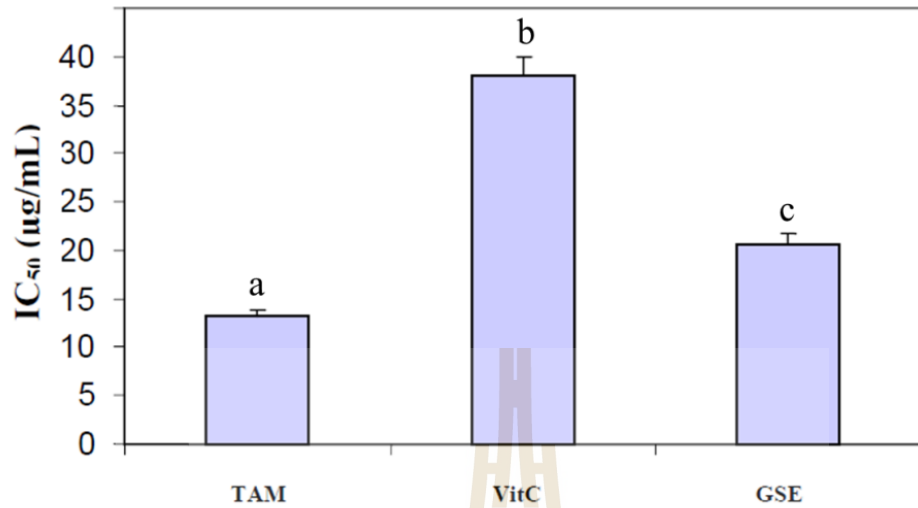
ในการทดลองนี้ หาค่าปริมาณของสารประกอบ phenolic รวม (TPC) โดยเทียบกับ gallic acid และค่า TPC มีหน่วยเป็น mg gallic acid equivalent (GAE) ต่อ หนึ่งกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 6 สารสกัด TAM มีค่า TPC เท่ากับ 178.6 ± 3.36 mg GAE ต่อ g ของสารสกัด ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณ TPC ของ GSE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดย GSE มีค่า TPC เท่ากับ 133.2 ± 2.39 mg GAE ต่อ g ของสาร



รูปที่ 6 ปริมาณ phenolic รวม (TPC) ของสารสกัด TAM และ GSE ที่แสดงหน่วยเป็น mg GAE ต่อ g น้ำหนักแห้งของสาร ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ($n = 3$) ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$

1.3 การทำลายอนุมูลอิสระชนิด DPPH (free radical scavenging assay)

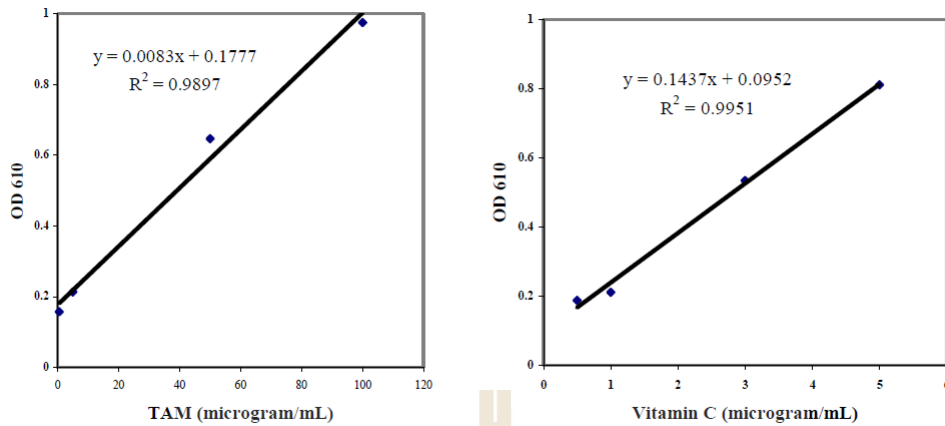
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของสารสกัด TAM และสารมาตรฐานทั้ง GSE และ vitamin C แสดงค่าเป็นความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปริมาณ DPPH[•] ซึ่งเป็น stable free radical ได้ที่ 50% (median inhibitory concentration; IC₅₀) สารที่มีค่า IC₅₀ ต่ำมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารที่มีค่า IC₅₀ สูง เนื่องจากสารที่มีค่า IC₅₀ ต่ำหมายถึงใช้ความเข้มข้นของสารน้อยก็สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% ทัดเทียมกับสารที่มีค่า IC₅₀ สูงซึ่งต้องใช้สารที่ความเข้มข้นสูงกว่าในการออกฤทธิ์ที่เท่ากัน จากรูปที่ 7 ซึ่งแสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH บ่งบอกว่าสารสกัด TAM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC₅₀ = 13.2 μ g/mL) ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานอ้างอิงคือ GSE (IC₅₀ = 20.7 μ g/mL) และ vitamin C (38 μ g/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$



รูปที่ 7 ฤทธิ์การทำลายอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของสารสกัด TAM เทียบกับสารมาตรฐาน vitamin C และ GSE ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n = 3) ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$

1.4 Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay

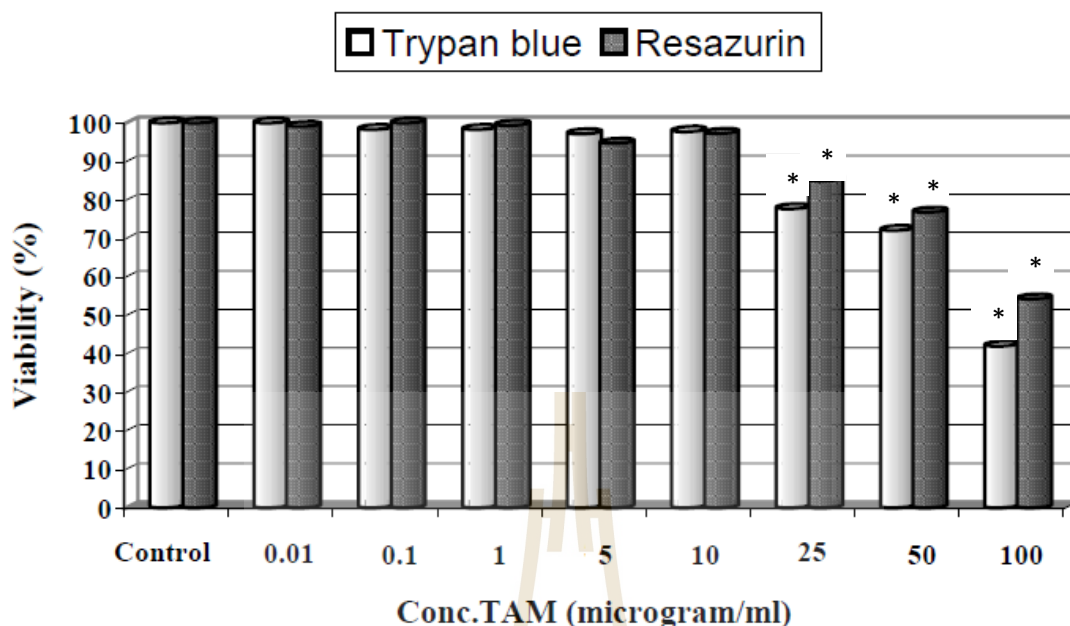
ผลการทดสอบค่า total antioxidant power ของสารในการ reduce สารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ให้เป็น Fe(II)-TPTZ ใน FRAP assay แสดงในรูปที่ 8 สารสกัด TAM สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด ค่า slope ของความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) ของสารสกัด TAM เป็น 0.0083 ในขณะที่ค่า slope ของ vitamin C เป็น 0.1437 ดังนั้นศักยภาพในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ของสารสกัด TAM เป็นประมาณ 1 ใน 17 เท่า ของ vitamin C ดังนั้น vitamin C มีความสามารถในการรีดิวซ์ได้ดีกว่าสารสกัด TAM



รูปที่ 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการใช้นิ่ว ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP) ของสารสกัด TAM เทียบกับสารอ้างอิงมาตรฐาน vitamin C

2. การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัด TAM ที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ RAW264.7

ในการหาความเข้มข้นสูงสุดของ TAM ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 เซลล์ RAW264.7 ถูกบ่มร่วมกับสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้น 0.01-100 $\mu\text{g/mL}$ ที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลอง (รูปที่ 9) พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัด TAM ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษใดๆ ต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ไม่ว่าจะวัดปริมาณเซลล์ซึ่งมีชีวิตอยู่ (cell viability) ด้วยวิธี trypan blue exclusion method หรือ resazurin assay ทั้ง 2 วิธีให้ผลในทิศทางเดียวกัน และชี้ชัดว่าที่ความเข้มข้นของ TAM ที่สูงขึ้น (25-100 $\mu\text{g/mL}$) สามารถลดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลงประมาณ 25-50%



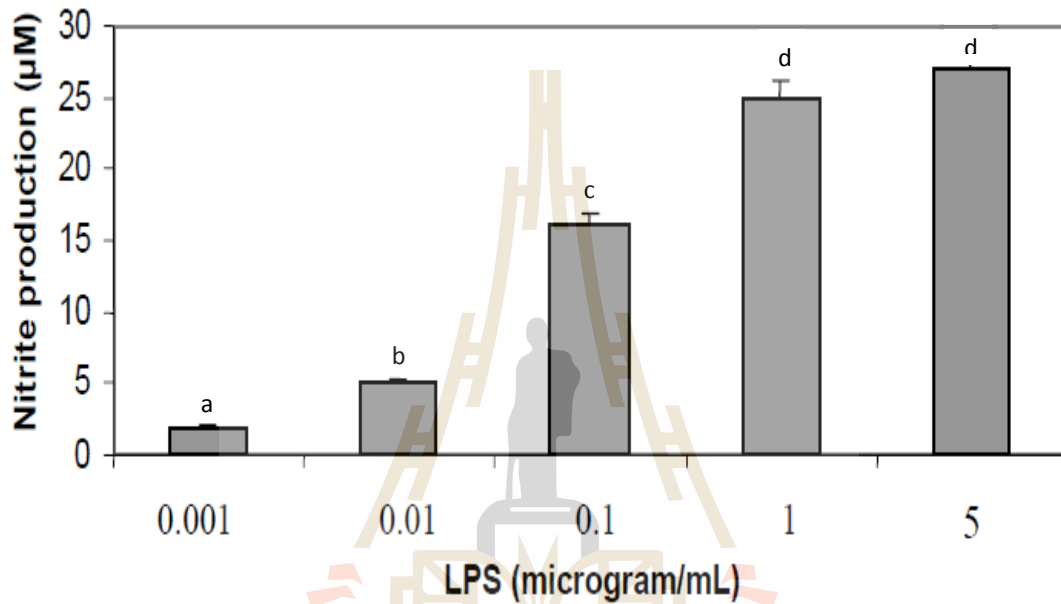
รูปที่ 9 ความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์ RAW264.7 ซึ่งถูกประเมินโดยวิธี trypan blue และ resazurin assay (* = แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$)

3. การยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 โดย TAM

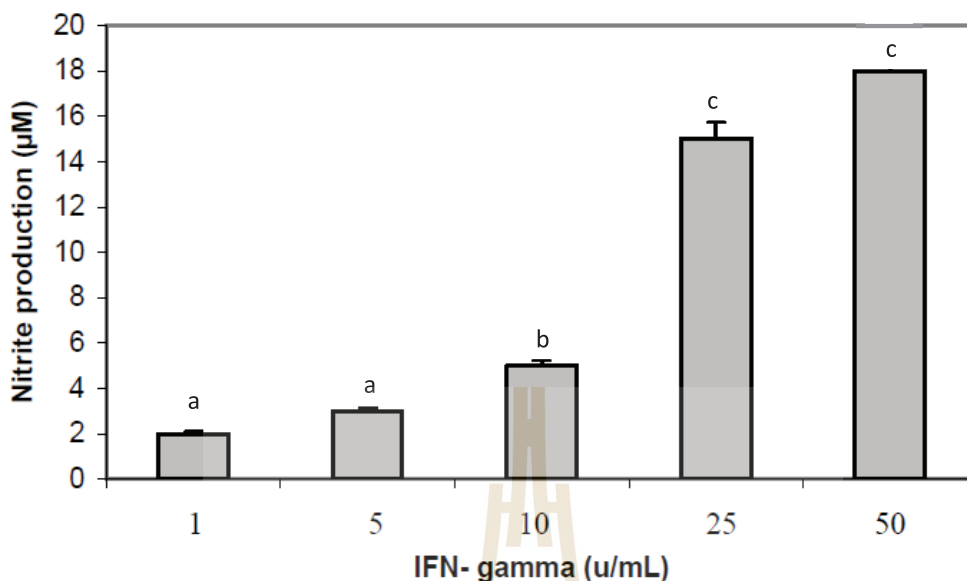
3.1 การหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกระตุ้นการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ RAW264.7

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO เซลล์ RAW264.7 macrophage ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS หรือ IFN- γ ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 24 ชม. ก่อนการวัดปริมาณ NO ที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้น เนื่องจาก NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วเป็น nitrite ปริมาณของ nitrite ที่เกิดขึ้นจึงเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ดังนั้น ในงานทดลองจึงนิยมวัดปริมาณของ nitrite ที่เป็นผลผลิตที่เสถียรของ NO โดยใช้ Griess reagent ผลการทดลองพบว่าเซลล์ RAW264.7 สามารถปลดปล่อย nitrite หรือสังเคราะห์ NO ได้สูงสุดเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยใช้ความเข้มข้น 1- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS (รูปที่ 10) และ 25-50 U/mL IFN- γ (รูปที่ 11) ดังนั้น ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ของ LPS และ 25 U/mL ของ IFN- γ จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้ศึกษาศักยภาพในการเสริมฤทธิ์กันของทั้ง 2 สาร ผลการทดลอง (รูปที่ 12) พบว่าเมื่อเซลล์ RAW264.7 ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ IFN- γ (25 U/mL) ร่วมกันสามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ nitrite หรือ NO ได้มากกว่าการกระตุ้นด้วย LPS หรือ IFN- γ เพียงอย่างเดียว ดังนั้น สารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดที่เสริมฤทธิ์กันคือ

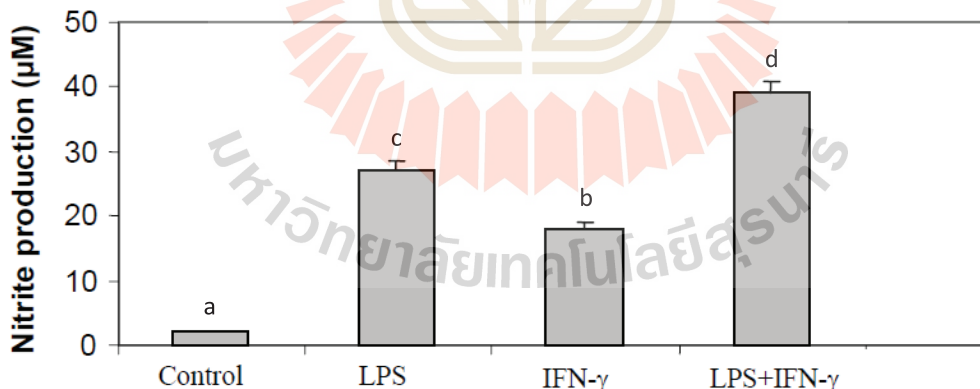
LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ IFN- γ (25 U/mL) จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาผลการยับยั้งของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการสร้าง NO รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของการยับยั้งการสังเคราะห์ NO ในเซลล์ macrophage RAW264.7



รูปที่ 10 ผลของความเข้มข้นของ LPS (0.001-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ต่อการชักนำให้เซลล์ RAW264.7 สังเคราะห์ NO ภายหลังการกระตุ้นด้วย LPS เป็นระยะเวลา 24 ชม. ปริมาณของ nitrite ถูกตรวจวัดโดยใช้ Griess reagent ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM (n = 4) กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกัน แตกต่างกันอย่างสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$



รูปที่ 11 ผลของความเข้มข้นของ IFN- γ (1-50 U/mL) ต่อการชักนำให้เซลล์ RAW264.7 สังเคราะห์ NO ภายหลังการกระตุ้นด้วย IFN- γ เป็นระยะเวลา 24 ชม. ปริมาณของ nitrite ถูกตรวจวัดโดยใช้ Griess reagent ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM (n = 4) กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกัน แยกต่างกันอย่างสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

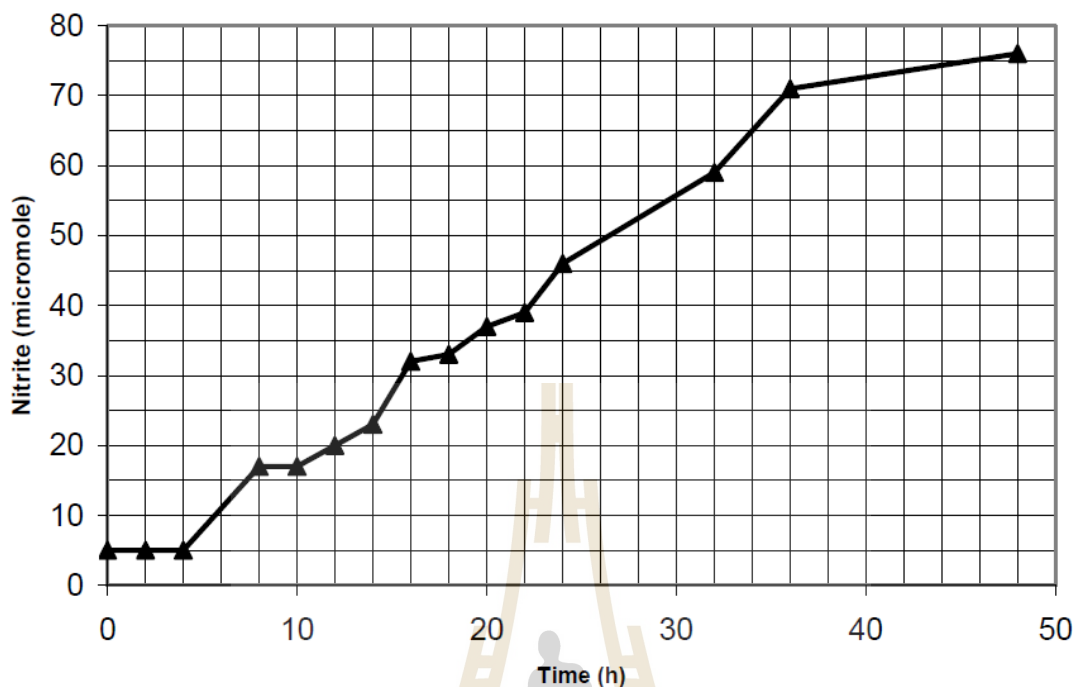


รูปที่ 12 การกระตุ้นการสร้าง NO จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ด้วย LPS (1µg/mL), IFN- γ (25 U/mL) หรือ LPS (1 µg/mL) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชม. ปริมาณของ nitrite ถูกตรวจวัดด้วย Griess reagent ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM (n = 4) กราฟแท่งที่มีอักษรต่างกัน แยกต่างกันอย่างสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ RAW264.7

ในการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เซลล์ RAW264.7 สังเคราะห์ NO เซลล์ RAW264.7 ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 0, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 32, 36 และ 48 ชม. ก่อนการวัดปริมาณของ nitrite ที่เกิดขึ้น ผลของการศึกษาปัจจัยของระยะเวลาของการกระตุ้นแสดงในรูปที่ 13 เมื่อกระตุ้นด้วยระยะเวลาสั้น ๆ คือ 0-4 ชม. ปริมาณ nitrite มีค่าคงที่ (ประมาณ 6 μM) หลังจากนั้น ปริมาณ nitrite เริ่มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับระยะเวลาของการกระตุ้นที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณ nitrite เพิ่มขึ้นจาก 6 μM เมื่อกระตุ้นเป็นระยะเวลา 4 ชม. ไปจนถึง 70 μM เมื่อระยะเวลาของการกระตุ้นเป็น 36 ชม. ซึ่งเป็นช่วงที่อัตราการสังเคราะห์ NO สูงสุด (slope ขั้นที่สุด) แต่เมื่อใช้ระยะเวลาของการกระตุ้นนานกว่า 36 ชม. ปริมาณของ nitrite ก็ยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่เป็นการเพิ่มด้วยอัตราที่ช้า (ค่า slope ต่ำลง) และมีแนวโน้มที่จะมีระดับที่คงที่ (plateau level) หรือไม่เพิ่มมากกว่าปริมาณสูงสุด จากผลการทดลองที่ได้ ผู้วิจัยเลือกใช้ระยะเวลาของการกระตุ้นที่ 24 ชม. ซึ่งมีค่าระดับของ nitrite อยู่ประมาณ 45 μM สูงกว่าปริมาณที่ 0 ชม. ประมาณ 8 เท่าและช่วงระยะเวลาดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของ slope ที่ชัน ซึ่งหมายถึงอัตราการสังเคราะห์ NO เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเหมาะสมต่อการนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัด TAM ต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7



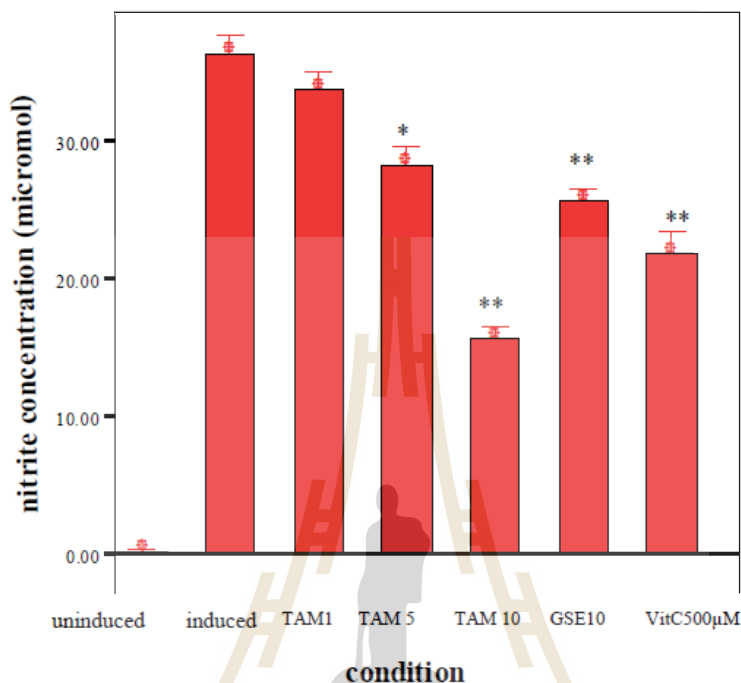


รูปที่ 13 ผลของระยะเวลาของการกระตุ้นต่อการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ macrophage RAW264.7 เมื่อกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) ภายหลังจากกระตุ้นด้วยระยะเวลาที่กำหนด ปริมาณของ nitrite ถูกตรวจวัดด้วย Griess reagent กราฟที่แสดงเป็นข้อมูลซึ่งเป็นตัวแทนจาก 4 การทดลองซึ่งให้ผลที่คล้ายคลึงกัน

3.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ NO ของ RAW264.7 โดยสารสกัด TAM

ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัด TAM ต่อการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เซลล์ RAW264.7 ถูกบ่มล่วงหน้า (pretreat) เป็นระยะเวลา 30 นาทีกับสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้น 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งเป็นช่วงของความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (ดังแสดงในรูปที่ 8) หรือบ่มร่วมกับ antioxidant control คือ GSE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) ก่อนการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO โดยการเติม LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) ภายหลังจากบ่มเซลล์ต่ออีก 24 ชม. ระดับของ nitrite ถูกตรวจวัดโดย Griess reagent ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 14 สารสกัด TAM มีฤทธิ์ยับยั้งปริมาณของ nitrite และปริมาณการยับยั้งขึ้นอยู่กับระดับของความเข้มข้นของสารสกัด ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ของสารสกัด TAM สามารถยับยั้ง

ระดับของ nitrite ได้ประมาณ 60% ซึ่งสูงกว่า antioxidant control ทั้ง GSE และ vitamin C ที่สามารถยับยั้งระดับของ nitrite ได้ประมาณ 33% และ 42% ตามลำดับ

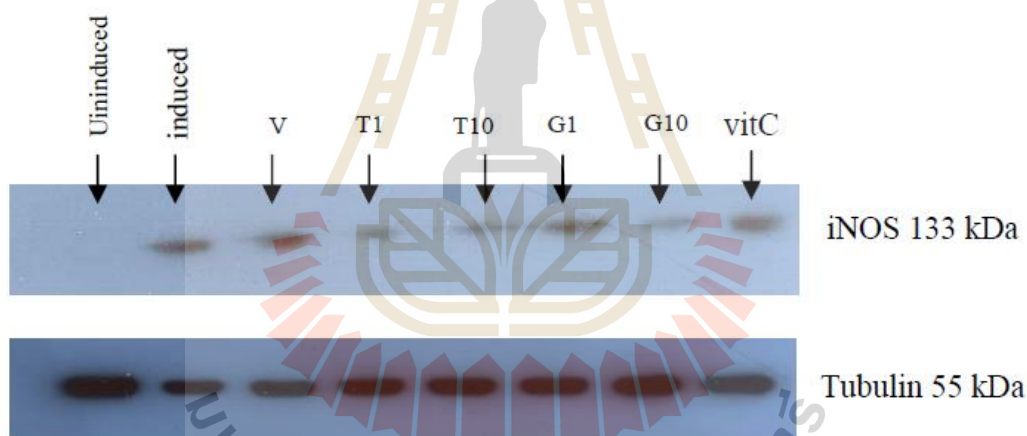


รูปที่ 14 ผลของสารสกัด TAM ต่อการชักนำการสร้าง NO จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS (1 µg/mL) + IFN- γ (25 U/mL) ภายหลังกกระตุ้นเป็นระยะเวลา 24 ชม. ระดับของ nitrite ถูกตรวจวัดด้วย Griess reagent ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD และเป็นตัวแทนจาก 3 การทดลองที่ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน * และ ** แสดงถึงความต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม (induced) ที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ

4. ผลของสารสกัด TAM ต่อการยับยั้งเอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ของเซลล์ RAW264.7

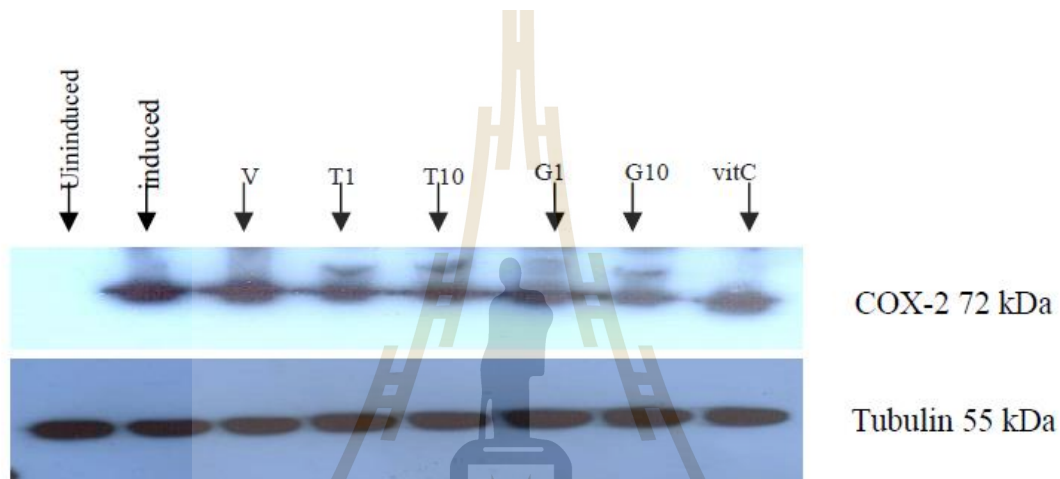
เพื่อค้นหากลไกของสารสกัด TAM ในการยับยั้งการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ร่วมกับ IFN- γ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารสกัด TAM ต่อ iNOS ซึ่งเป็นเอ็นไซม์เกี่ยวข้องโดยตรงในการสังเคราะห์ NO ในสภาวะเมื่อถูกชักนำ (โดย LPS และ IFN- γ) ให้เกิดการสังเคราะห์ขึ้น ปริมาณของ NO ในสภาวะที่ถูกชักนำ (induced NO) มีระดับสูงและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ดังนั้น สารสกัด TAM ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ในสภาวะที่ถูกชักนำ

น่าจะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด TAM ต่อการยับยั้ง COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ การแสดงออก (expression) ของทั้ง iNOS และ COX-2 protein ถูกตรวจสอบด้วยวิธี Western blot analysis ในการทดลอง เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับสารสกัด TAM หรือ antioxidant control ทั้ง GSE หรือ vitamin C ก่อนได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ IFN- γ เป็นระยะเวลา 24 ชม. และประเมินด้วยวิธี Western blot analysis ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 15 สารสกัด TAM ทั้งที่ความเข้มข้น 1 หรือ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ antioxidant control (GSE หรือ vitamin C) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS protein ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (induced) โดยสารสกัด TAM ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS protein ได้สูงถึง 68% ซึ่งมีค่ามากกว่า antioxidant control GSE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ vitamin C (500 μM) ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ได้เพียง 40.7% และ 32.3% ตามลำดับ โดยร้อยละของการยับยั้งวัดโดยการใช้นำเสนอ



รูปที่ 15 ผลของสารสกัด TAM ต่อการชักนำการแสดงออกของ iNOS protein จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL) เป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังจากเซลล์ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับสารสกัด TAM (1 หรือ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ antioxidant control GSE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) เป็นระยะเวลา 30 นาทีก่อนการกระตุ้น การแสดงออกของ iNOS protein ประเมินโดย Western blot analysis ปริมาณของ protein ที่ถูก load คือ 30 $\mu\text{g}/\text{lane}$

ผลของ Western blot analysis ของ COX-2 แสดงในรูปที่ 16 สารสกัด TAM ทั้งที่ความเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ antioxidant control (GSE หรือ vitamin C) สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 protein ได้โดยสารสกัด TAM ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 protein ได้สูงถึง 59.6% ซึ่งมากกว่า antioxidant control GSE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ vitamin C (500 μM) ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ได้เพียง 45.2% และ 20.2% ตามลำดับ ทั้งนี้ร้อยละของการยับยั้งถูกวัดโดยใช้ densitometry



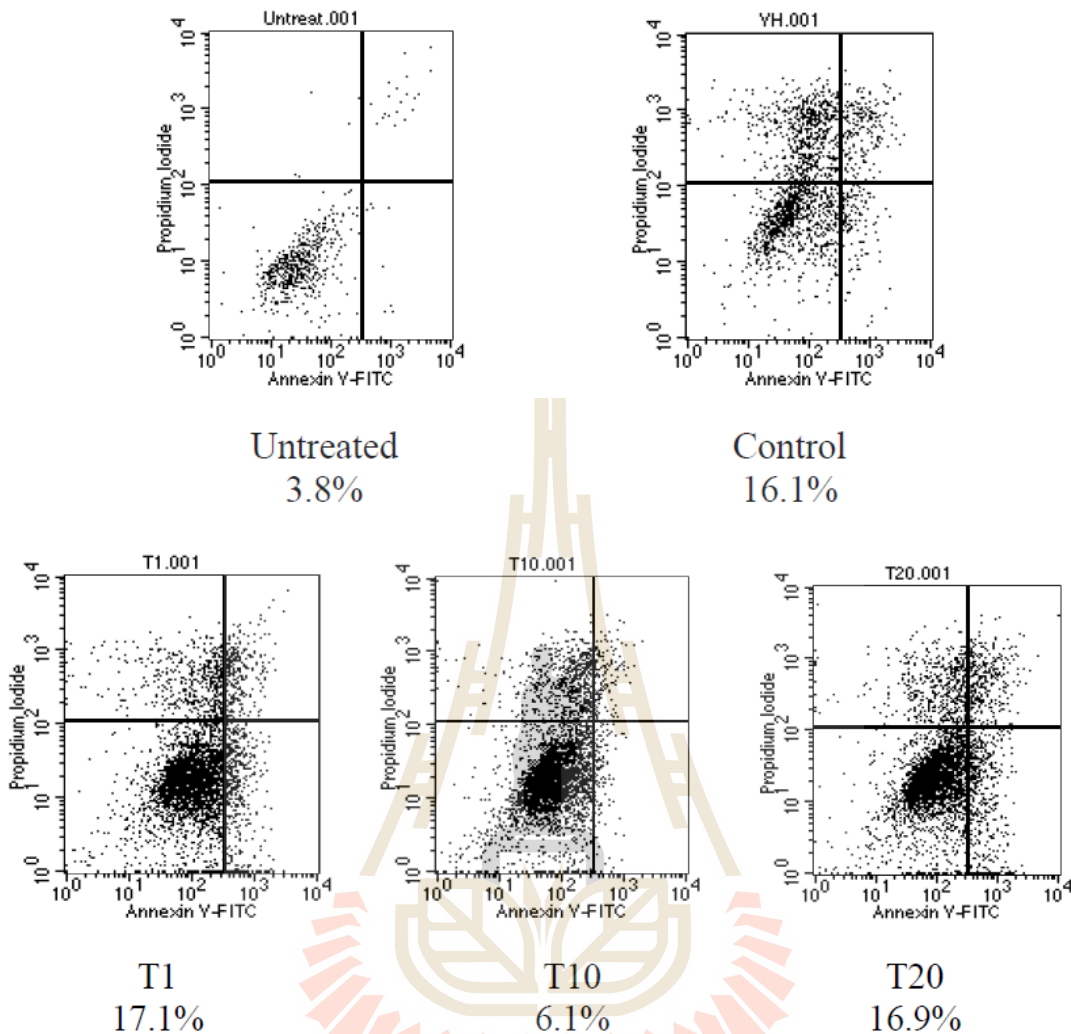
รูปที่ 16 ผลของสารสกัด TAM ต่อการชักนำการแสดงออกของ COX-2 protein จากเซลล์ macrophage RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN- γ (25 U/mL) เป็นระยะเวลา 24 ชม. ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับสารสกัด TAM (1 หรือ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ antioxidant control GSE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) เป็นระยะเวลา 30 นาทีก่อนการกระตุ้น การแสดงออกของ COX-2 protein ประเมินโดย Western blot analysis ปริมาณของ protein ที่ถูก load คือ 30 $\mu\text{g}/\text{lane}$

5. ผลของสารสกัด TAM ต่อการยับยั้งการเกิด apoptosis ในเซลล์ RAW264.7

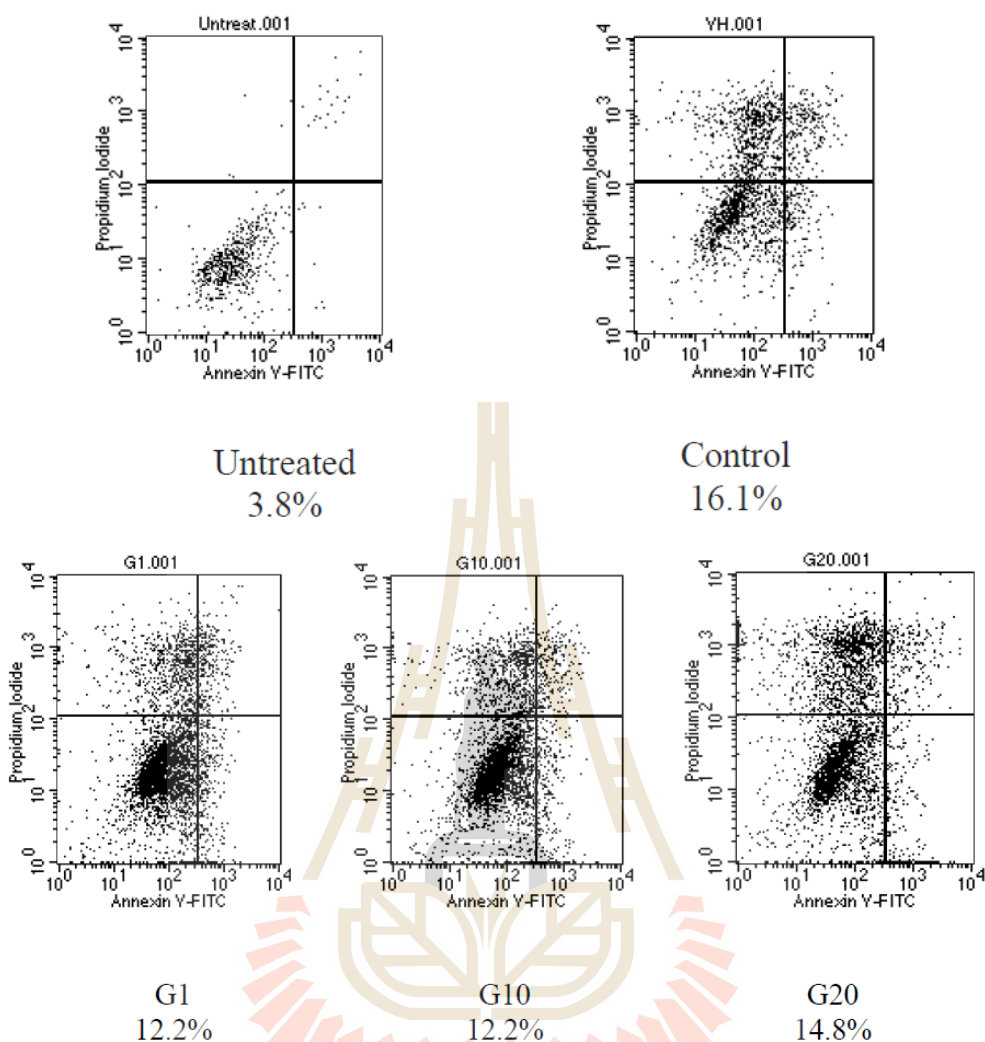
การทดสอบความสามารถของ TAM ในการยับยั้งการเกิด apoptosis ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ IFN- γ กระทำโดย 2 เทคนิคคือการใช้ annexin-V และการตรวจหา DNA ladder ซึ่งเป็นคุณลักษณะจำเพาะของเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการ apoptosis

5.1 Annexin V-PI method

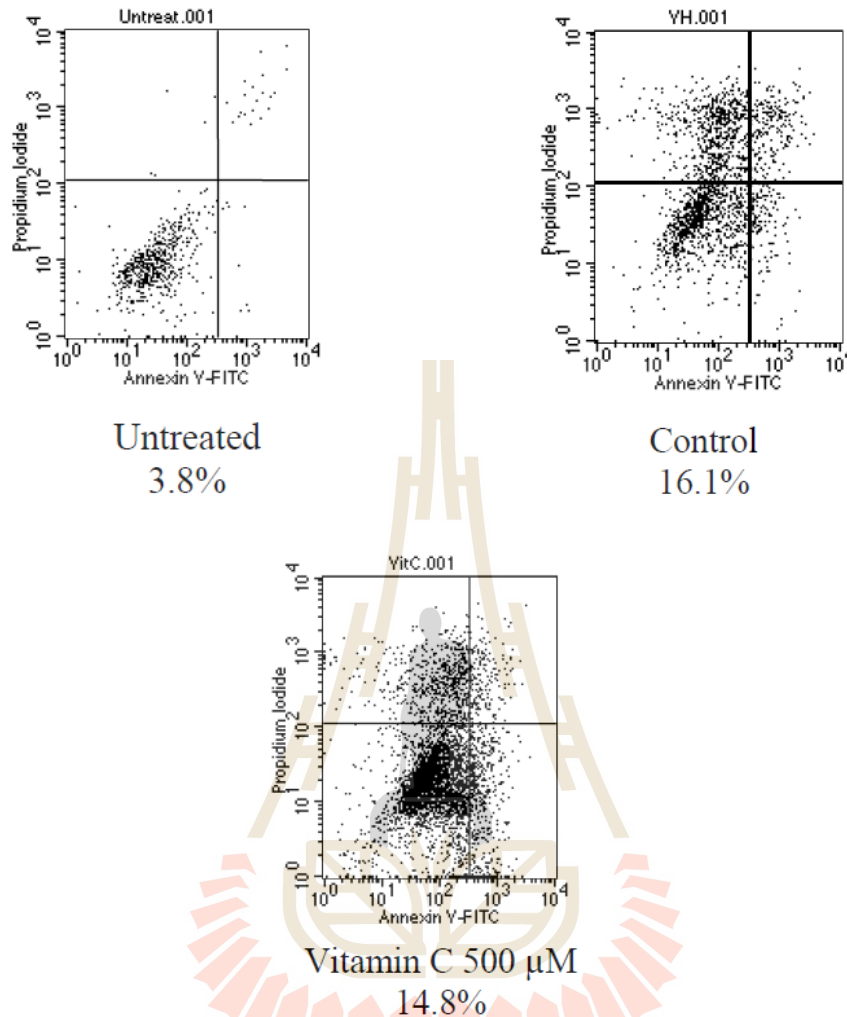
การตายของเซลล์แบบ apoptosis สามารถตรวจพบได้ด้วยการย้อมเซลล์กับ Annexin V-FITC และ propidium iodide (PI) ในการทดลอง เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับสารสกัด TAM (1, 10 หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ antioxidant control GSE (1, 10 หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม etoposide (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ลงไปเพื่อชักนำให้เกิด apoptosis เซลล์บ่มร่วมกับ etoposide เป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลของการทดลองแสดงในรูปที่ 17-19 สารสกัด TAM และ antioxidant control สามารถลดการเกิด apoptosis ในเซลล์ RAW264.7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) สารสกัด TAM ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถลดการเกิด apoptosis จากกลุ่มควบคุมได้ 62.1% (ลดลงจากกลุ่มควบคุม 16.1% เหลือ 6.1%) ซึ่งให้ผลดีกว่า antioxidant positive control แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของ TAM ที่ 1 และ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ กลับไม่มีผลต่อการเกิด apoptosis (รูปที่ 17) สำหรับ antioxidant control 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ของ GSE (รูปที่ 18) และ 500 μM ของ vitamin C (รูปที่ 19) สามารถลดการเกิด apoptosis จาก 16.1% ของกลุ่มควบคุมเป็น 12.2% และ 14.8% ตามลำดับ หรือมีค่าลดลงจากกลุ่มควบคุม 24.2% และ 8.1% ตามลำดับ



รูปที่ 17 ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด apoptosis ในเซลล์ macrophage RAW264.7 โดยสารสกัด TAM เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับ Vehicle control (0.08% DMSO) หรือสารสกัด TAM (1, 10 หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนการชักนำให้เกิด apoptosis ด้วย 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ etoposide ตัวเลขที่แสดงเป็นร้อยละของ early apoptosis หรือเซลล์ที่ติดสี annexin V-FITC และไม่ติดสี PI



รูปที่ 18 ผลของ GSE ต่อการเกิด apoptosis ในเซลล์ macrophage RAW264.7 เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้าด้วย Vehicle control (0.08% DMSO) หรือ GSE เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนการชักนำให้เกิด apoptosis ด้วย 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ etoposide ตัวเลขที่แสดงเป็นร้อยละของ early apoptosis หรือเซลล์ที่ติดสี annexin V-FITC และไม่ติดสี PI

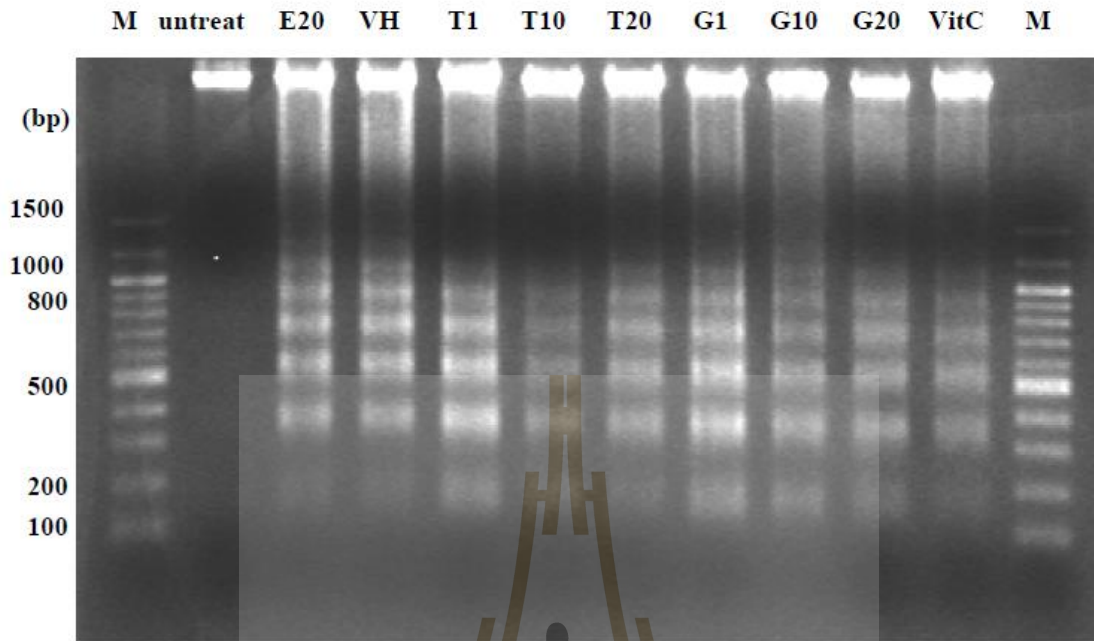


รูปที่ 19 ผลของ vitamin C ต่อการเกิด apoptosis ในเซลล์ macrophage RAW264.7 เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับ vehicle control (0.08% DMSO) หรือ vitamin C เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนการชักนำให้เกิด apoptosis ด้วย 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ etoposide ตัวเลขที่แสดงเป็นร้อยละของ early apoptosis หรือเซลล์ที่ติดสี annexin V-FITC และไม่ติดสี PI

5.2 การตรวจดูลักษณะการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation)

เซลล์ RAW264.7 ได้รับการบ่มล่วงหน้ากับสารสกัด TAM (1, 10 หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ antioxidant control GSE (1, 10 หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) หรือ vitamin C (500 μM) เป็นระยะเวลา 30 ชม. หลังจากนั้นชักนำให้เกิด apoptosis โดยเติม etoposide (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และบ่มต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.

การตรวจดูลักษณะการแตกหักของ DNA กระทำโดยใช้ agarose gel electrophoresis ผลการทดลองแสดงใน รูปที่ 20 ใน lane ที่ไม่มีการเติมสารใดนอกจาก etoposide (E20) และ lane ที่เติมเฉพาะตัวทำลาย (VH) พบลักษณะการแตกหักของ DNA เป็นแบบขั้นบันได (DNA ladder) ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการ apoptosis แสดงว่า etoposide สามารถชักนำให้เซลล์ RAW 264.7 เกิด apoptosis ได้ตามความต้องการ และตัวทำลายสำหรับสารสกัด ไม่ได้ส่งผลต่อการเกิด apoptosis ตามความคาดหมาย แต่ทั้งสารสกัด TAM และ antioxidant control (GSE หรือ vitamin C) สามารถลดการเกิด apoptosis ในเซลล์ RAW264.7 ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle (VH) control สารสกัด TAM ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ได้สูงสุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ การยับยั้งกลับลดลงเล็กน้อย เพราะพบ DNA ladder หรือการเกิด apoptosis ที่ TAM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ อย่างไรก็ตาม DNA ladder ของ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TAM ก็ยังน้อยกว่ากลุ่ม vehicle control แต่สารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ไม่สามารถลดการเกิด apoptosis ได้ ซึ่งผลการทดลองค่อนข้างสอดคล้องกับผลการทดลองใน annexin V ในทำนองเดียวกัน ที่ความเข้มข้นต่ำสุด antioxidant positive control GSE (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ไม่สามารถลด DNA ladder ได้ แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (10 และ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) GSE สามารถลดการเกิด DNA ladder ได้ แต่ไม่มีความแตกต่างของการยับยั้งระหว่างสองความเข้มข้นที่ใช้



รูปที่ 20 การลดลงของ DNA ladder โดยสารสกัด TAM และ antioxidant positive controls (GSE และ vitamin C) การสกัด DNA ใช้ DNA mini kit การตรวจหา DNA ladder กระทำใน 1.2% agarose gel electrophoresis และดูการเกิด DNA ladder โดยใช้ ethidium bromide และ gel document system (Lane M = 100 base-pair ladder marker, E20 = etoposide (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), VH = vehicle control (0.08% DMSO), T1-T20 = สารสกัด TAM (1, 10 หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), G1-G20 = GSE (1, 10, หรือ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ Vitc = vitamin C 500 μM)

บทที่ 5

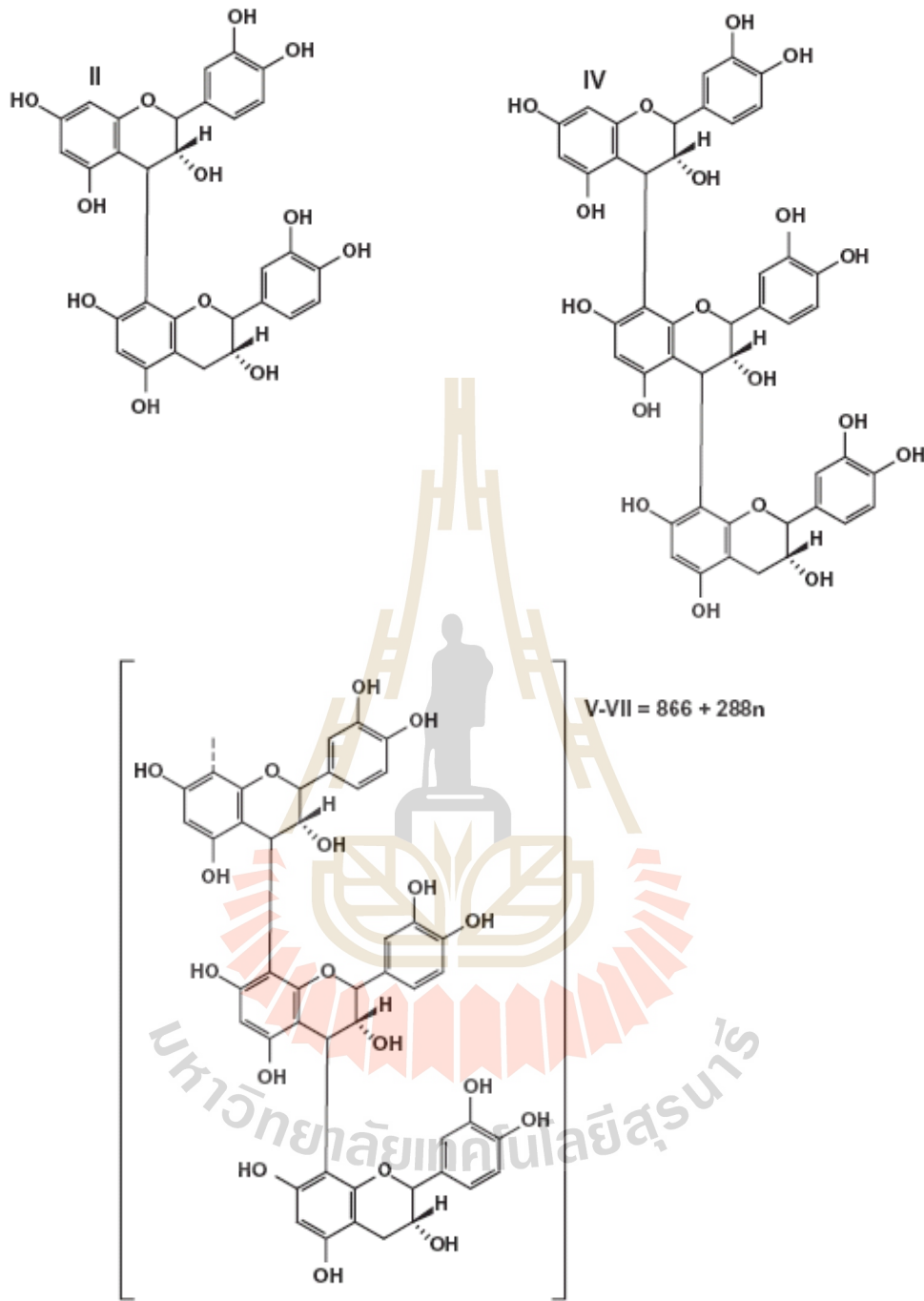
การวิจารณ์

ในการสกัดสารจากพืช ผัก สมุนไพร หรือธัญพืช ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบมักนิยมกำจัดไขมันออกก่อน สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ประกอบด้วยน้ำมัน (oil) 4-16% ก่อนที่จะสกัด phenolic compounds ก็มีการกำจัดน้ำมันออกก่อนเช่นกัน (Shahidi and Nacz, 1995) ซึ่งปกตินิยมกำจัดไขมันด้วยการใช้ methanol/aluminium/water (Nacz and Shahidi, 1989) หรือด้วย carbon tetrachloride (Li and El Rassi, 2002) โดยปกติเมล็ดธัญพืชที่กำจัดไขมันออกแล้วมักถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) และที่นิยมใช้กัน ได้แก่ methanol, ethanol หรือ acetone การสกัด tannins จากมะขามสามารถสกัดได้ด้วยการใช้ 50% acetone ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมาก (Vuorela, 2005) นอกจากนี้ acetone ยังเป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่าย (volatile) ทำให้มีปริมาณที่หลงเหลือ (residue) ในสารสกัดน้อย เมื่อผ่านการระเหยด้วย rotary evaporator นอกจากนี้ acetone ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมมีความเป็นพิษน้อย เป็นที่ยอมรับได้ในการศึกษาวิจัยทางด้านชีวภาพ (Eloff, 1998) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ acetone เป็นตัวทำละลายในการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยการผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 (acetone 50%)

การศึกษาโดยใช้วิธี TLC แสดงให้เห็นว่าสารสกัด TAM มีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระชนิด DPPH เทคนิค TLC เป็นวิธีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative) ข้อมูลที่ได้บอกแต่เพียงว่าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือไม่ แต่ไม่ได้บ่งบอกข้อมูลเชิงปริมาณ (quantitative) ว่าสารสกัด TAM มีประสิทธิภาพเท่าใดในการทำลาย DPPH• ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงใช้ DPPH assay ร่วมด้วยในการวัดประสิทธิภาพการทำลายอนุมูลอิสระของสารสกัด TAM ผลการวิจัยชี้ชัดว่าสารสกัด TAM มีศักยภาพสูงในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH• และสามารถกำจัด DPPH• ได้ดีกว่า antioxidant control ทั้งชนิด GSE และ vitamin C ทั้งนี้อาจสืบเนื่องจากในสารสกัด TAM มีสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นสารประกอบฟีนอลิกสูง ดังผลที่ได้จากการทดสอบโดย Folin-Ciocalteu assay จึงทำให้สารสกัด TAM มีศักยภาพสูงในการทำลายอนุมูลอิสระ ซึ่งคุณสมบัติ antioxidant ของสารประกอบฟีนอลิกใน DPPH model ขึ้นกับจำนวนของ hydroxyl groups ที่สามารถให้ electron หรือ hydrogen radical กับ DPPH radical ได้ Brand-Williams *et al.* (1995) รายงานว่าฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีความสัมพันธ์กับการแทนที่ของ hydroxyl groups ใน aromatic ring ของ phenolics ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการให้ hydrogen อะตอม Pumthong (1999) ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด TAM ที่อุดมด้วย flavonoids รวมถึง tannins, polyphenols และ anthocyanidins มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ

การศึกษาของ Sudjaroen *et al.* (2005) ที่รายงานว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระอันเนื่องมาจากสารประกอบ oligomeric flavonoids: procyanidin B₂ (II), procyanidin trimer (IV), procyanidin tetramer (V), procyanidin pentamer (VI), และ procyanidin hexamer (VII) โครงสร้างของ oligomeric flavonoids เหล่านี้แสดงในรูปที่ 21





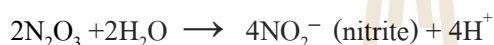
รูปที่ 21 โครงสร้างของ oligomeric flavonoids: procyanidin B₂ (II), procyanidin trimer (IV), procyanidin tetramer (V), procyanidin pentamer (VI) และ procyanidin hexamer (VII) (Sudjaroen *et al.*, 2005)

Hagerman *et al.* (1998) ได้รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลที่สูงของ phenolics (tannins) สัมพันธ์กับความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ ประสิทธิภาพของการจับหรือการกำจัดอนุมูลอิสระนอกจากขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลแล้ว ยังขึ้นอยู่กับจำนวนของ aromatic rings และการแทนที่ของ hydroxyl groups มากกว่า functional groups จำเพาะในปฏิกิริยาของ oxidative phenolic coupling, phenolic dimers และ oligomer reactions ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ประกอบด้วย oligomeric procyanidins จึงสามารถแสดงผลเป็น antioxidant และทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่ง

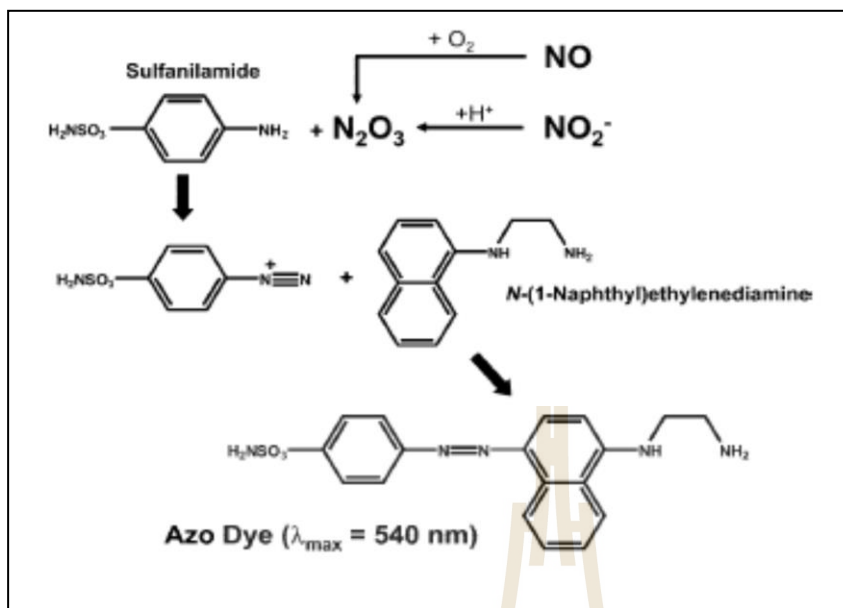
นอกเหนือจาก DPPH assay สารสกัด TAM ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน FRAP assay ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งของการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยคุณสมบัติในการให้ electron อิสระ ซึ่งคือปฏิกิริยา reduction จาก Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} ในสภาวะที่มี pH ต่ำ (Benzie and Strain, 1996) ศักยภาพในการ reduction โดย TAM ใน FRAP assay อาจขึ้นอยู่กับ dihydroxy ของ benzene derivatives ในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ดังนั้น phenolic compounds จากสารสกัด TAM จึงเป็นแหล่ง antioxidant ที่อุดม ควรค่าต่อการค้นหาและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้านอนุมูลอิสระ ในปัจจุบัน ทรงวุฒิ ยศวิมลวัฒน์ (2555) ได้มีการพัฒนาสารสกัด ethanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้านอนุมูลอิสระชนิดอัดเม็ด อย่างไรก็ตามแม้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามจะได้รับการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแล้ว แต่ยังคงขาดข้อมูลยืนยันคุณสมบัติของการต้านออกซิเดชันในโมเดล *in vivo* และข้อมูลในมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการประเมินเรื่องความปลอดภัยในระยะยาวต่อผู้บริโภค

NO เป็น free radical gas ที่ไม่เสถียร เซลล์หลักที่สามารถผลิต NO ได้คือ macrophage ปริมาณ NO ในรูปที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้น (induced NO) โดยตัวกระตุ้นจะมีปริมาณสูง สามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อและเป็นสารสื่อกลาง (mediator) สำคัญในกระบวนการอักเสบ (Korhonen *et al.*, 2005) RAW264.7 เป็นเซลล์สายพันธุ์ macrophage จากหนูเมาส์ (murine macrophage cell line) ที่สามารถสร้าง NO เพื่อตอบสนองต่อ LPS หรือ LPS ร่วมกับ $IFN-\gamma$ การกระตุ้นเซลล์ macrophages ให้สร้าง NO จำเป็นต้องใช้การส่งสัญญาณถึงสองครั้ง $IFN-\gamma$ เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญต่อการตอบสนองจากสัญญาณที่กระตุ้นโดย LPS แม้สัญญาณที่เกิดจากการกระตุ้นโดย $IFN-\gamma$ จะไม่ใช่สัญญาณหลัก แต่การกระตุ้นเซลล์ RAW264.7 ด้วย $IFN-\gamma$ เพียงชนิดเดียวก็สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO ได้เช่นกัน (Scuro *et al.*, 2004) ดังนั้น ทั้ง $IFN-\gamma$ และ LPS จึงถูกใช้ในการศึกษานี้ โดยเซลล์ RAW264.7 ถูกกระตุ้น ด้วย LPS หรือ $IFN-\gamma$ เพียงอย่างเดียว หรือกระตุ้นโดยใช้ LPS ร่วมกับ $IFN-\gamma$ เป็นระยะเวลา 24 ชม. เพื่อชักนำการสร้าง NO การศึกษาชี้ชัดว่าการกระตุ้นเซลล์ RAW264.7 ด้วย LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ร่วมกับ $IFN-\gamma$ (10 U/mL) ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO ได้สูงกว่าการกระตุ้นด้วย

LPS หรือ IFN- γ เพียงอย่างเดียว การวัดปริมาณของ NO โดยตรงกระทำได้ยาก เนื่องจาก NO มีปริมาณน้อย และเมื่อเกิดใน *in vitro* สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบัน การวัด NO กระทำได้หลากหลายวิธี อาทิเช่น chemiluminescence (Gladwin *et al.*, 2000), ultraviolet (UV) visible spectroscopic (Kelm *et al.*, 1997) และ electron paramagnetic resonance (ERP) (Kuppusamy *et al.*, 1996) รวมถึง colorimetric assay ซึ่งเป็นการวัดปริมาณของ NO ทางอ้อม เนื่องจาก NO ที่เกิดใน cell culture ไม่เสถียร ในสภาวะที่มีก๊าซ oxygen ก๊าซ NO เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว โดย autoxidize ได้ nitrogen oxides ในรูปต่าง ๆ ดังนี้คือ (Tarpey *et al.*, 2004)



ในบรรดาผลผลิตของ nitrogen oxide ต่าง ๆ ที่เกิดจาก autoxidation ของ NO ในสารละลายที่มี oxygen ผลผลิตเดียวที่เสถียรคือ nitrite ซึ่งสามารถตรวจหาโดย Griess reagent ที่มีส่วนผสมของ sulfanilamide, phosphoric acid และ N-(1-naphthyl) ethylenediamine ใน Griess reaction สภาวะที่เป็นกรดทำให้ nitrite เปลี่ยนเป็น nitrous acid ซึ่งไม่เสถียร และอยู่ในรูปของ anhydride คือ N_2O_3 จากปฏิกิริยาที่แสดงข้างต้น N_2O_3 ยังอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง NO และ NO_2 ใน Griess reaction ปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนหลักของการเกิด diazotization (รูปที่ 22) คือ nitrosating agent ที่ได้จาก NO คือ N_2O_3 ทำปฏิกิริยากับ sulfanilic acid ได้ diazonium ion ซึ่งจับคู่ (couple) กับ N-(1-naphthyl) ethyl-enediamine ใน Griess reagent ได้สารประกอบ azo ที่มีสี (chromophoric azo product) ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 nm (Tarpey *et al.*, 2004) ค่าการดูดกลืนแสงเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของ nitrite ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนั่นเอง ดังนั้น เมื่อเติม Griess reagent ลงไปในตัวอย่างที่มี nitrite ตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง และปริมาณของ nitrite สามารถหาได้โดยเทียบกับกราฟที่ใช้สารมาตรฐาน nitrite ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Sun *et al.*, 2003)



รูปที่ 22 ปฏิกิริยา Griess สาร nitrosating agent N_2O_3 ทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ได้อนุพันธ์ของ diazonium ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อกับ N-1 naphthylethylenediamine ได้ diazo product ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 nm (Tarpey *et al.*, 2004)

งานวิจัยนี้จึงใช้ Griess reaction เพื่อวัดปริมาณของ nitrite ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของ NO ที่สังเคราะห์จาก RAW264.7 เซลล์เมื่อถูกกระตุ้นโดย LPS ร่วมกับ $\text{IFN-}\gamma$ เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีเรียบง่าย ไม่แพง และมีความไว (sensitive) ต่อการตรวจวัด ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่สกัดด้วย acetone 50% สามารถลดระดับของ NO ที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์จากเซลล์ RAW264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ $\text{IFN-}\gamma$ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ที่ใช้ในการทดลองสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ได้ดีกว่า antioxidant positive control (GSE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ vitamin C 500 μM) (รูปที่ 14) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Komutarin *et al.* (2004) ที่ค้นพบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่สกัดด้วย 70% ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ NO ในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ $\text{IFN-}\gamma$ ใน *in vitro* นอกจากนั้น สารสกัดยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO จากเซลล์ macrophage ที่เตรียม (isolate) จากช่องท้องของหนูเมาส์ (peritoneal macrophage) B6C3F1 ที่นำมากระตุ้น *in vitro* ด้วย LPS, $\text{IFN-}\gamma$ หรือ LPS ร่วมกับ $\text{IFN-}\gamma$ และกระตุ้นแบบ *in vivo* โดยการฉีดด้วย 12-o-tetradecanoylporbol-13-acetate (TPA) เข้าช่องท้อง อย่างไรก็ตาม กลไกของการยับยั้งการสังเคราะห์ NO โดยสารสกัด TAM ยังไม่เคยมีงานวิจัยมาก่อน เนื่องจากกลไกหลักในการชักนำให้เกิด

การสังเคราะห์ NO ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ร่วมกับ IFN- γ เกิดผ่านการเพิ่มขึ้นของ เอนไซม์ iNOS ในเซลล์ (Jang *et al.*, 2005; Korhonen *et al.*, 2005) ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงศึกษาว่ากลไก การยับยั้งการสังเคราะห์ NO โดย TAM เกิดผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS หรือไม่ โดยการตรวจวัดด้วยวิธี Western blot ผลงานวิจัยชี้ชัดว่า ในเซลล์ RAW264.7 ที่การสังเคราะห์ NO ถูกยับยั้ง โดย TAM เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับ IFN- γ มีปริมาณการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ลดลง เช่นกัน โดยปริมาณ iNOS ที่ลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัด TAM ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 15) และ เป็นไปตามทิศทางเดียวกันกับผลการศึกษาใน NO ดังนั้น กลไกหนึ่งของการยับยั้งการสังเคราะห์ NO ที่ ถูกชักนำใน RAW264.6 เซลล์เมื่อถูกกระตุ้นโดย LPS และ IFN- γ เกิดผ่านการลดลงของโปรตีน iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่รับผิดชอบในการสังเคราะห์ NO ในกรณีที่ถูกชักนำโดย proinflammatory cytokine หรือสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังเช่น LPS และ IFN- γ ยังสามารถชักนำการแสดงออกของ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 (Jang *et al.*, 2005; Karpuzoglu and Ahmed, 2006) เป็นที่ทราบกันดีว่าเมื่อ COX-2 เพิ่มขึ้น ปริมาณของ PGE₂ มักเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ มักพบการเพิ่มของ COX-2 ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ อักเสบ (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003) การศึกษาครั้งนี้ยังได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด TAM แสดงผลในการยับยั้งการอักเสบด้วยการไปลด COX-2 และการยับยั้งนี้แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น ของ TAM ที่เพิ่มขึ้นแจกเช่นเดียวกันกับการยับยั้งการสังเคราะห์ NO และ iNOS protein ผลการศึกษา ชี้แนะว่าสารสกัด TAM สามารถลด iNOS ได้ดีกว่า COX-2 ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ แสดงว่าสารสกัดจากพืชหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant สามารถมีฤทธิ์ยับยั้ง NO, iNOS หรือ COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 และฤทธิ์ทางด้านชีวภาพอื่นๆ รวมทั้งฤทธิ์ต้านการอักเสบ ตัวอย่างเช่น curcumin จาก *Curcuma longa* L., resveratrol จากเปลือกองุ่น, ไวน์แดง และสารสกัดจากพืชอื่นๆ อีก มากมาย เป็นต้น (Surh *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2003) นอกจากนี้ phenolic compounds โดยเฉพาะกลุ่ม flavonoids อาทิเช่น apigenin, genistein และ kaempferol เมื่อบ่มล่วงหน้ากับเซลล์ RAW264.7 สามารถ ยับยั้งการแสดงออกของ NO, iNOS และ COX-2 protein ที่กระตุ้นด้วย LPS ได้ (Kobuchi *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1999; Raso *et al.*, 2001; Sakata *et al.*, 2003) ดังนั้น สารสกัด TAM ซึ่งประกอบด้วย phenolic สูง จึงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การยับยั้ง transcription factors อาทิเช่น NF- κ B และ activator protein-1 (AP-1) เป็นอีกหนึ่ง กลไกของการยับยั้ง iNOS (Bourke and Moynagh, 1999) ดังนั้นกลไกที่สารสกัด TAM ลดปริมาณ iNOS และ COX-2 protein จะเกิดผ่านการยับยั้ง NF- κ B หรือ AP-1 หรือไม่ควรมีการตรวจสอบต่อไปใน อนาคต นอกจากการยับยั้ง NO, iNOS และ COX-2 โดย flavonoids แล้ว สารประกอบ flavonoids อาทิ เช่น rutin, quercetin, luteolin, hesperidin และ bioflavonoids ยังมีฤทธิ์ต้านการเจ็บปวดและต้านการ

อักษะบ (Ramesh *et al.*, 1998; Bittar *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2000) การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด TAM ที่ประกอบไปด้วย flavonoid มีฤทธิ์ลดการสังเคราะห์ NO และ COX-2 *in vitro* ส่วนความสามารถของสารสกัด TAM ในการต้านความเจ็บปวด หรือการอักษะบ *in vivo* จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

Apoptosis เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ที่ตายอย่างมีระเบียบแบบแผน มีลักษณะเฉพาะและเป็นการตายที่ได้ถูกโปรแกรมไว้แล้ว (programed cell death) เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะเกิดความเสียหายสูงสุดที่ nucleus โดยอวัยวะอื่น ๆ ของเซลล์ (cell organelles) ส่วนใหญ่ยังอาจคงรูปเหมือนเดิม สิ่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ เซลล์มีขนาดเล็กลง (shrinkage) ส่วนที่เป็น chromatin เกิดการหดตัว (chromatin condensation) ตามด้วยการหดตัวของ nucleus (nuclear condensation) และ DNA เกิดการแตกหัก (DNA fragmentation) (Pelfrey *et al.*, 1995) ผลจากการทดลอง (lane E20 ในรูปที่ 20) พบว่าเซลล์ RAW264.7 ที่บ่มร่วมกับ etoposide เกิดการตายแบบ apoptosis ดังสังเกตจากการแตกหักของ DNA มีลักษณะแบบขั้นบันไดที่เป็นเอกลักษณ์ของเซลล์ที่เกิด apoptosis สืบเนื่องจาก DNA ถูกตัดที่ nucleosome มีขนาดประมาณ 180-200 bp ดังนั้น เมื่อ load DNA ของเซลล์ที่เกิด apoptosis ใน agarose gel electrophoresis จึงได้ลักษณะเป็นขั้นบันไดของ DNA (DNA ladder) ที่มีขนาด 180 bp หรือเป็นจำนวนเท่าของ 180 bp ดังแสดงในรูปที่ 20 lane ซึ่ง DNA มีลักษณะเป็น ladder ไม่พบในเซลล์ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับ etoposide (untreat ในรูปที่ 20)หรือไม่ถูกชักนำให้เกิด apoptosis นั่นเอง ในกรณีที่เซลล์ไม่ได้ตายด้วยกระบวนการ apoptosis เมื่อ load DNA ใน agarose gel electrophoresis จะมีลักษณะเป็น smear ซึ่งหมายถึง DNA ที่เกิดการแตกหักมีทุกขนาด bp เพราะถูกตัดอย่างไม่เจาะจง (random) lane E20 ในรูปที่ 20 แสดงว่าเซลล์ที่ได้รับ etoposide เท่านั้น ที่ DNA มีลักษณะเป็น ladder ทั้งนี้เพราะ etoposide เป็นสารที่ชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis (Kozmar *et al.*, 2010) ผลการทดลองในงานวิจัยนี้ ซึ่งชี้ว่าการบ่มเซลล์ RAW264.7 ล่วงหน้ากับสารสกัด TAM ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นระยะเวลา 24 ชม. สามารถลดผลการเกิด apoptosis ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้เกิด apoptosis โดย etoposide ได้ (รูปที่ 17 และ 20) ผลการประเมินการเกิด apoptosis ของเซลล์โดย 2 วิธีคือการดูลักษณะการเกิด DNA ladder และการใช้ annexin V-PI ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือการลดการเกิด apoptosis ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด TAM ที่ใช้ สารสกัด TAM ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ให้ผลสูงสุดในการลดการเกิด apoptosis ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำกว่า (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ไม่ส่งผลต่อการเกิด apoptosis และในกรณีที่เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 2 เท่า (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) การลดการเกิด apoptosis ไม่ได้เพิ่มขึ้น แต่กลับมีแนวโน้มลดลง ดังนั้น สารสกัด TAM ต้องมีความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงสามารถลดการเกิด apoptosis ได้ แต่ถ้าความเข้มข้นมากหรือน้อยเกินไป จะไม่มีผล หรืออาจให้ผลที่ไม่พึงประสงค์ได้ ซึ่งเป็นลักษณะของ biphasic dose response curve

ที่มักพบในสารที่ให้คุณค่าทางอาหาร (nutrient) เช่นในกรณีของวิตามินต่าง ๆ ต้องได้รับในปริมาณที่เหมาะสม จึงมีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ถ้าได้รับในปริมาณที่น้อยเกินไป ก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับการขาดวิตามิน (vitamin deficiency) และถ้าได้รับในปริมาณมากเกินไปก็ก่อให้เกิดพิษได้



บทที่ 6

สรุป

สรุปผลการวิจัย

1. การสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วย 50% acetone ได้สารสกัด TAM คิดเป็นร้อยละ 45.8 ของน้ำหนักแห้ง สารสกัด TAM อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณฟีนอลรวมมีค่าเท่ากับ 178 ± 3.8 mg GAE/g ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (GSE) ที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า (ปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 133.2 ± 2.39 mg GAE/g) และจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบด้วยวิธี TLC พบว่าสารสกัด TAM มีส่วนประกอบคล้ายคลึงกับสารสกัด GSE โดยสาร 5 กลุ่ม จาก 6 กลุ่มหลักในสารสกัด TAM มีค่า Rf ใกล้เคียงกับที่พบในสารสกัด GSE
2. สารสกัด TAM สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยกลไกที่แตกต่างกันทั้งใน DPPH และ FRAP assay โดยสารสกัด TAM ทำลายอนุมูลอิสระชนิด DPPH ได้ดีกว่า antioxidant control GSE และ vitamin C ค่า IC_{50} ของ TAM, GSE และ vitamin C เท่ากับ 13 μ g/mL, 20.7 μ g/mL และ 38.7 μ g/mL ตามลำดับ ส่วนศักยภาพในการ reduce ferric เป็น ferrous ของสารสกัด TAM ใน FRAP assay มีค่าประมาณ 1/17 เท่าของ vitamin C
3. สารสกัด TAM มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ *in vitro* สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO และการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS (1 μ g/mL) ร่วมกับ IFN- γ (25 U/mL)
4. กลไกการยับยั้งการสังเคราะห์ NO ของสารสกัด TAM เกิดผ่านการยับยั้งเอนไซม์ iNOS ที่ใช้ในการสังเคราะห์ NO
5. สารสกัด TAM ที่ 10 μ g/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด apoptosis ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำให้เกิด apoptosis โดย etoposide (20 μ g/mL) เมื่อวิเคราะห์โดยดูลักษณะการแตกหักของ DNA ใน agarose gel electrophoresis และการย้อมติดสี annexin V โดยใช้ flow cytometry อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ต้านการเกิด apoptosis ของสารสกัด TAM ไม่เด่นชัดเท่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ เพราะการ

ออกฤทธิ์อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่จำกัด ถ้าเพิ่มหรือลดความเข้มข้นจากความเข้มข้นที่เหมาะสม สารสกัด จะไม่มีฤทธิ์

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยการทดสอบแบบ *in vitro* ทั้งนี้โดยภาพรวมในประเทศไทย ประชาชนนิยมบริโภคมะขาม นำมาประกอบอาหาร ใช้เป็นยาสมุนไพร และนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ แต่เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเมล็ดมะขามกลับไม่ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากนัก นอกจากอาจมีการนำมาบดเป็นผงผสมกาแฟ แต่ไม่ได้นำไปใช้ในการบริโภคโดยตรง ในทางตรงข้าม เมล็ดมะขามมักเป็นส่วนเหลือทิ้ง การศึกษาในงานวิจัยนี้ชี้แนะถึงประโยชน์ของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามว่ามีศักยภาพสูง ควรค่าต่อการได้รับการพัฒนาและศึกษาต่อยอดงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยารักษาโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระหรือเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่าง ๆ รวมทั้งการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเพิ่มเติม

สำหรับข้อเสนอแนะของงานวิจัยที่สามารถกระทำต่อยอดในด้านที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบ ได้มีดังนี้คือ

1. ควรศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่เกิดภายในเซลล์ เช่น ใช้ cell line ที่ได้รับสารสกัดใน *in vitro* และได้รับการชักนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน เพื่อดูว่าสารสกัด TAM ที่เข้าสู่เซลล์ สามารถลดหรือต้านการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์ได้ดีเพียงใด ทั้งนี้อาจใช้สาร 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFHDA) เป็น probe ใน DCFHDA assay สาร DCFHDA เมื่อเข้าสู่เซลล์ หมู่ acetyl จะถูกดึงออกโดย esterase ได้ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) ซึ่งเกิดการ oxidize อย่างรวดเร็วโดย อนุมูลอิสระ หรือ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ได้สารเรืองแสง dichlorodihydrofluorescein (DCF) ดังนั้น ปริมาณสารเรืองแสงที่ลดลงเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับตามความสามารถของสารสกัดในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระหรือการเกิด ROS ภายในเซลล์

2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเพิ่มเติมใน *in vivo* โดยใช้สัตว์ทดลอง
3. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ นอกจากการยับยั้ง COX-2 แล้ว ควรยืนยันการลดระดับของ prostaglandins และศึกษาผลกระทบของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อ proinflammatory cytokines ต่าง ๆ เช่น IL-1, IL-6 และ TNF เป็นต้น และในการวิจัย ควรศึกษาผลของสารสกัดต่อ COX-1 ด้วย เนื่องจาก COX-1 เป็น mediator ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของสรีรวิทยา ดังนั้นหากสารสกัด TAM ไปลดระดับ COX-1 ย่อมมีผลกระทบต่อกระบวนการทำงานปกติของร่างกาย ซึ่งคล้ายกับยาแผนปัจจุบันหลายชนิดที่มีผลลดการอักเสบโดยการไปลด COX-2 แต่ในขณะเดียวกันมีผลไปลด COX-1 ด้วย ดังนั้นถ้าสารสกัด TAM มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ COX-2 แต่ไม่มีผลต่อ COX-1 เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามก็ควรค่าอย่างยิ่งต่อการต่อยอดงานวิจัยและพัฒนาไปเป็นยาในอนาคต
4. ในกรณีที่สารสกัดสามารถยับยั้ง COX-2 และไม่มีผลต่อ COX-1 ใน *in vitro* ควรศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัด TAM ในสัตว์ทดลองว่าสามารถต้านการอักเสบได้มากน้อยเพียงใด โมเดลสัตว์ทดลองที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีอยู่มากมาย เช่น carrageenan-induced paw edema, acetic acid-induced vascular permeability หรือ arachidonic-acid-induced ear edema เป็นต้น
5. ศึกษากลไกการยับยั้ง iNOS และ COX-2 ในเชิงลึกว่าเกิดผ่านการยับยั้ง transcription factors ที่เกี่ยวข้อง เช่น NF- κ B และ AP-1 หรือไม่ เป็นต้น
6. ศึกษากลไกของสารสกัดต่อการยับยั้ง apoptosis ว่าเกิดผ่าน intrinsic หรือ extrinsic pathway โดยศึกษาผลของสารสกัดต่อ initiator caspase และ protein ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในแต่ละ pathway และการชักนำให้เกิด apoptosis เช่น ผลต่อ caspase 8, caspase 9, apoptosis-inducing factors, survivin, Apaf-1, Fas receptor. กลุ่ม BCL-2 family ที่เป็น proapoptotic (BCL-2, BCL-X_L) และกลุ่มที่เป็น proapoptotic (Bad, Bax, Bid, PUMA, NOXA) รวมทั้งการหลั่งของ cytochrome c การเปลี่ยนแปลง mitochondrial membrane potential, transcription factors ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น p53, Akt เป็นต้น

บรรณานุกรม

- จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์. (2556). **ศูนย์สมุนไพรทักษิณ** [ออนไลน์]. ได้จาก http://herbal.pharmacy.psu.ac.th/index.php?option=com_content&task=view&id=118&Itemid=42.
- ณัฐฐาพร คาลัย. (2550). ผลของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในตับหนูขาว. **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่** 40(2): 126.
- ทรงวุฒิ ยศวิมลวัฒน์. (2-8 มกราคม 2555). กะเทาะเปลือกเมล็ดมะขาม. **ข่าวรอบสัปดาห์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**: 2.
- รวิวรรณ (พัชราณาโชคชัย) วงศ์ภูมิชัย. (2554). ผลของสารสกัดเชิงซ้อนโอลิโกเมอริก โพรแอนโทรซัยยานิ ดินจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นและกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันอนุมูลอิสระ. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (รายงานฉบับสมบูรณ์).
- ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. (2556). **สรรพคุณของมะขาม**. [ออนไลน์]. ได้จาก <http://www.moe.go.th/moe/th/blog/view-blog.php?memberid=159&blogid=67>.
- หน่วยบริการฐานข้อมูลสมุนไพร. (2556). **ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ (มะขาม)**. [ออนไลน์]. ได้จาก <http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/>.
- Aengwanich, W. and Suttajit, M. (2010). Effect of polyphenols extracted from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on physiological changes, heterophil/lymphocyte ratio, oxidative stress and body weight of broilers (*Gallus domesticus*) under chronic heat stress. **Animal Science Journal** 81(2): 264-270.
- Aengwanich, W., Suttajit, M. and Narkkong, N. (2009a). Effects of polyphenols extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on differential white blood cell count in broilers (*Gallus domesticus*) exposed to high environmental temperature. **International Journal of Poultry Science** 8(10): 957-962.

- Aengwanich, W., Suttajit, M., Srikhun, T. and Boonsorn, T. (2009b). Antibiotic effect of polyphenolic compound extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on productive performance of broilers. **International Journal of Poultry Science** 8(8): 749-751.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. and Lindequist, U. (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology** 111(3): 657-666.
- Babaria, P., Mute, V., Awari, D. and Ghodasara, J. (2011). In vivo evaluation of antiarthritic activity of seed coat of *Tamarindus indica* Linn. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 3(4): 204-207.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D.K., Ray, S. D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S. and Pruess, H. G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology** 148(2-3): 187-197.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D.K., Ray, S. D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S. and Pruess, H. G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology** 148(2-3): 187-197.
- Bagchi, D., Ray, S. D., Bagchi, M., Pruess, H. G. and Stohs, S. J. (2002). Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. **Indian Journal of Experimental Biology** 40(6): 717-726.
- Benzie, I. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry** 239(1): 70-76.
- Bernstein, H. G., Bogerts, B. and Keilhoff, G. (2005). The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophrenia Research** 78(1): 69-86.
- Bittar, M., de Souza, M. M., Yunes, R. A., Lento, R., Delle Monache, F. and Cechinel Filho, V. (2000). Antinociceptive activity of I3, II8-binaringenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferæ. **Planta Medica** 66(01): 84-86.

- Bourke, E. and Moynagh, P. N. (1999). Antiinflammatory effects of glucocorticoids in brain cells, independent of NF- κ B. **The Journal of Immunology** 163(4): 2113-2119.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology** 28(1): 25-30.
- Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R., Filho, V. C. and Yunes, R. A. (2000). Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research** 14(6): 401-418.
- Calixto, J. B., Otuki, M. F. and Santos, A. R. S. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica** 69: 973-983.
- Chan, M. M., Fong, D., Ho, C., and Huang, H. 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. **Biochemical Pharmacology** 54: 1281-1286.
- Cheng, R., Glynn, S., Flores-Santana, W., Switzer, C., Ridnour, L. and Wink, D. A. (2010). Nitric oxide and redox inflammation in cancer. In C. F. James (Ed.). **Advances in Molecular Toxicology** (Vol. 4, pp. 157-182). Elsevier.
- Choi, J., Conrad, C. C., Dai, R., Malakowsky, C. A., Talent, J. M., Carroll, C. A., Weintraub, S. T. and Gracy, R. W. (2003). Vitamin E prevents oxidation of antiapoptotic proteins in neuronal cells. **Proteomics** 3(1): 73-77.
- Chung, H.-T., Pae, H.-O., Choi, B.-M., Billiar, T. R. and Kim, Y.-M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 282(5): 1075-1079.
- Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., and Sellins, K.S. 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annual Review of Immunology* 10: 267-293.

- Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Vanden Berghe, D. and Vlietinck, A.J. (2003). Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. **Current Medicinal Chemistry** 10: 1345-1359.
- Dannhardt, G. and Kiefer, W. (2001). Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry** 36(2): 109-126.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., and Traganos, F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry** 13: 795-808.
- De Caluwé, E., Halamová, K. and Van Damme, P. (2010). *Tamarindus indica* L.: a review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Afrika Focus** 23(1): 53-83.
- de Oliveira, M. G., Marques, R. B., de Santana, M. F., Santos, A. B., Brito, F. A., Barreto, E. O., De Sousa, D. P., Almeida, F. R., Badaue-Passos, D., Jr., Antonioli, A. R. and Quintans-Junior, L. J. (2012). Alpha-terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology** 111(2): 120-125.
- deRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1995. Chemical Research in Toxicology 8:473-477
- Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., and Agarwal, C. 2003. Inhibition of NF-kappa B pathway in grape seed extract-induced apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. **International Journal of Oncology** 23(3):721-727.
- Donnelly, M. and Hawkey, C. (1997). Review article: COX-II inhibitors—a new generation of safer NSAIDs? **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** 11(2): 227-235.
- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica** 64(8): 711-713.
- El-Siddig, K., Gunasena, H.P.M., Prasa, B.A., Pushpakumara, D.K.N.G., Ramana, K.V.R., Vijayanand, P., and Williams, J.T. (2006). **Tamarind-Tamarindus indica** L. **Fruits for the future 1**. Southampton, UK: Southampton Centre for Underutilized Crops.

- Fahrman, J.F. and Hardman, W.E. 2013. Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. **Lipids in Health and Disease** 12:36-48.
- Fang, J., Seki, T. and Maeda, H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews** 61(4): 290-302.
- Fine, A. M., 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. **Alternative Medicine Review** 5(2): 144-151.
- Gentile, C., Allegra, M., Angileri, F., Pintaudi, A.M., Livrea, M.A., and Tesoriere, L. (2012). Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. **European Journal of Nutrition** 51:353-363.
- Gladwin, M. T., Shelhamer, J. H., Schechter, A. N., Pease-Fye, M. E., Waclawiw, M. A., Panza, J. A., Ognibene, F. P. and Cannon, R. O. (2000). Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 97(21): 11482-11487.
- Hagerman, A. E., Rice, M. E. and Ritchard, N. T. (1998). Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin16 (4→ 8) catechin (procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46(7): 2590-2595.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. and Phipps, R. P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology** 23(3): 144-150.
- Iñiguez, M.A., Rodriguez, A., Volpert, O.V., Fresno, M., and Redondo, J.M. 2003. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. **Trends in Molecular Medicine** 9 (2): 73-78.
- Jang, S. I., Kim, Y. J., Lee, W. Y., Kwak, K. C., Baek, S. H., Kwak, G. B., Yun, Y. G., Kwon, T. O., Chung, H. T. and Chai, K. Y. (2005). Scoparone from *Artemisia capillaris* inhibits the release

- of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon-gamma plus LPS. **Archives of Pharmacal Research** 28(2): 203-208.
- Kang, J. S., Jeon, Y. J., Kim, H. M., Han, S. H. and Yang, K.-H. (2002). Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 302(1): 138-144.
- Kang, M. S. (2003). **Handbook of formulas and software for plant geneticists and breeders**. Binghamton, NY: Food Products Press.
- Karpuzoglu, E. and Ahmed, S. A. (2006). Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide** 15(3): 177-186.
- Kelm, M., Dahmann, R., Wink, D. and Feelisch, M. (1997). The nitric oxide/superoxide assay insights into the biological chemistry of the NO/O₂ interaction. **Journal of Biological Chemistry** 272(15): 9922-9932.
- Khanduja, K. L., Avti, P. K., Kumar, S., Mittal, N., Sohi, K. K. and Pathak, C. M. (2006). Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta** 1760(2): 283-289.
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y. and Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical Pharmacology** 58(5): 759-765.
- Kim, J.-K., Oh, S.-m., Kwon, H.-S., Oh, Y.-S., Lim, S. S. and Shin, H.-K. (2006). Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 345(3): 1215-1223.

- Kobuchi, H., Kroy-Lefaix, M. T., Christen, Y., and Packer, L. 1997. Ginkgo biloba extract (Egb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW254.7. **Biochemical Pharmacology** 53:897-903.
- Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. (1992). Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunology Today** 13(5): 157-160.
- Komutarin, T., Azadi, S., Butterworth, L., Keil, D., Chitsomboon, B., Suttajit, M. and Meade, B. J. (2004). Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology** 42(4): 649-658.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T and Oers, M.V. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood** 84: 1415-1420.
- Korde, S., Sridharan, G., Gadbaile, A. and Poornima, V. (2012). Nitric oxide and oral cancer: A review. **Oral Oncology** 48(6): 475-483.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. and Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation and Allergy** 4(4): 471-479.
- Kozmar, A., Greenlee-Wacker, M. C. and Bohlsion, S. S. (2010). Macrophage response to apoptotic cells varies with the apoptotic trigger and is not altered by a deficiency in LRP expression. **Journal of Innate Immunity** 2(3): 248-259.
- Kris-Etherton, P., Lefevre, M., Beecher, G., Gross, M., Keen, C. and Etherton, T. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. **Annual Review of Nutrition** 24: 511-538.
- Kuppusamy, P., Wang, P., Samouilov, A. and Zweier, J. L. (1996). Spatial mapping of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance imaging. **Magnetic Resonance in Medicine** 36(2): 212-218.

- Kwon, J.-H., Kim, S.-B., Park, K.-H. and Lee, M.-W. (2011). Antioxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from the roots of *Ulmus macrocarpa*. **Archives of Pharmacal Research** 34(9): 1459-1466.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259): 680-685.
- Li, J. and El Rassi, Z. (2002). High performance liquid chromatography of phenolic choline ester fragments derived by chemical and enzymatic fragmentation processes: analysis of sinapine in rape seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50(6): 1368-1373.
- Li, P.-F., Dietz, R. and von Harsdorf, R. (1997). Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. **FEBS letters** 404(2): 249-252.
- Liang, Y.-C., Huang, Y.-T., Tsai, S.-H., Lin-Shiau, S.-Y., Chen, C.-F. and Lin, J.-K. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis** 20(10): 1945-1952.
- Lin, H.-Y., Juan, S.-H., Shen, S.-C., Hsu, F.-L. and Chen, Y.-C. (2003). Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264. 7 macrophages involves heme oxygenase-1. **Biochemical Pharmacology** 66(9): 1821-1832.
- Liu, R. H. and Hotchkiss, J. H. (1995). Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology** 339(2): 73-89.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193(1): 265-275.
- MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology** 15: 323-350.
- Martinello, F., Soares, S., Franco, J., Santos, A., Sugohara, A., Garcia, S., Curti, C. and Uyemura, S. (2006). Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food and Chemical Toxicology** 44(6): 810-818.

- Naczki, M. and Shahidi, F. (1989). The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. **Food Chemistry** 31(2): 159-164.
- Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry** 269(19): 13725-13728.
- Park, E.-K., Shin, Y.-W., Lee, H.-U., Kim, S.-S., Lee, Y.-C., Lee, B.-Y. and Kim, D.-H. (2005). Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E₂ biosyntheses of RAW264. 7 cells induced by lipopolysaccharide. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 28(4): 652-656.
- Park, Y. C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G. and Packer, L. (2000). Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. **FEBS Letters** 465(2): 93-97.
- Pelfrey, C. M., Tranquill, L. R., Boehme, S. A., McFarland, H. F. and Lenardo, M. J. (1995). Two mechanisms of antigen-specific apoptosis of myelin basic protein (MBP)-specific T lymphocytes derived from multiple sclerosis patients and normal individuals. **The Journal of Immunology** 154(11): 6191-6202.
- Pumthong, G. (1999). **Antioxidative activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarindus indica* Linn.** M.S. thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Ramesh, M., Nageshwar Rao, Y., Appa Rao, A. V. N., Prabhakar, M. C., Seshagiri Rao, C., Muralidhar, N. and Madahava Reddy, B. (1998). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of a flavonoid isolated from *Caralluma attenuata*. **Journal of Ethnopharmacology** 62(1): 63-66.
- Raso, G. M., Meli, R., Carlo, G.D., Pacilio, M., and Carlo, R.D. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Science** 68: 921-931.

- Ray, S. D., Kumar, M. A. and Bagchi, D. 1999. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases *in vivo* Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 369(1): 42-58.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine** 49(11): 1603-1616.
- Robbins, R. A. and Sisson, J. H. (1996). Nitric oxide. In R. G. Townley and D. K. Agrawal (eds.). **Immunopharmacology of allergic disease** (pp 415-431). New York: Marcel Dekker.
- Saha, K., Lajis, N. H., Israf, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 92(2-3): 263-267.
- Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T., and Mori, H. 2003. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. **Cancer Letters** 199: 139-145.
- Sandoval, M., Zhang, X.-J., Liu, X., Mannick, E. E., Clark, D. A. and Miller, M. J. S. (1997). Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 Cells: Attenuation by l-ascorbic acid. **Free Radical Biology and Medicine** 22(3): 489-495.
- Schmitt, C. A. and Lowe, S. W. (1999). Apoptosis and therapy. **The Journal of Pathology** 187(1): 127-137.
- Scuro, L. S., Simioni, P., Gabriel, D., Saviani, E. E., Modolo, L. V., Tamashiro, W. M. and Salgado, I. (2004). Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. **BMC Biochemistry** 5(1): 1-8.
- Soler-Rivas, C., Espin, J., Wichers, H.J., and Garcia-Viguera, C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48: 1588-1592.

- Shahidi, F. and Naczk, M. (1995). **Food Phenolics**. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc.
- Siddhuraju, P. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. **LWT-Food Science and Technology** 40(6): 982-990.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture** 16(3): 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology** 299: 152-178.
- Sittikijyothin, W. and Cherdwongchroensuk, D. (2011). Free radical scavenging activity of seed coat extracts of sweet and sour Tamarinds. **Burapha Science Journal** 16(1): 47-55.
- Slater, A. F., Stefan, C., Nobel, I. and Orrenius, S. (1995). The role of intracellular oxidants in apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease** 1271(1): 59-62.
- Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A. J. (2003). Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **Trends in Pharmacological Sciences** 24(2): 96-102.
- Sudjaroen, Y., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H. and Owen, R. W. (2005). Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. **Food and Chemical Toxicology** 43(11): 1673-1682.
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. and Fein, H. (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors** 3(8): 276-284.

- Surh, Y.-J., Chun, K.-S., Cha, H.-H., Han, S. S., Keum, Y.-S., Park, K.-K. and Lee, S. S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** 480: 243-268.
- Suttajit, M. (1985). Natural toxicants and hazardous substances. **Journal of The Science Society of Thailand** 39: 205-222.
- Tarpey M.M., Wink, D.A. and Grisham, M.B. 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 286:R431-R444.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** 267(5203): 1456-1462.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Yamamoto, A., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994). Antioxidative components isolated from the seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 42(12): 2671-2674.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S. and Botting, R. M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 38: 97-120.
- Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods** 243: 167-190.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C.A. 1995. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. **Journal of Immunological Methods** 184: 39-51.
- Virgili, F., Kim, D., and Packer, L. 1998. Procyanidins extracted from pine bark protect α -tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW 264.7 macrophages: role of nitric oxide and peroxynitrite. **FEBS Letter** 431:315-318.

- Vuorela S. (2005). **Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics**. Academic dissertation, University of Helsinki, Finland.
- Wang, L., Tu, Y.-C., Lian, T.-W., Hung, J.-T., Yen, J.-H. and Wu, M.-J. (2006). Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54(26): 9798-9804.
- Weisz, A., Oguchi, S., Cicatiello, L. and Esumi, H. (1994). Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. **Journal of Biological Chemistry** 269(11): 8324-8333.
- Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W. and Mitchell, J. B. (1998). The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis** 19(5): 711-721.
- Wyllie, A. H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. **The Journal of Pathology** 142: 67-77.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R., and Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. **BioTechniques** 23: 525-531.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. Folin-Ciocalteu micro method

- **Gallic acid stock solution**

Gallic acid	0.500	g
-------------	-------	---

Ethanol	10	mL
---------	----	----

เจือจางความเข้มข้นตามต้องการด้วยน้ำ (เก็บที่ 4° C)

- **Sodium carbonate solution**

Anhydrous sodium carbonate	200	g
----------------------------	-----	---

DI water	800	mL
----------	-----	----

นำไปต้ม ที่ 100°C จนแห้ง เติมผลึกของ sodium carbonate

ลงไปเล็กน้อย ที่ 100°C เป็นเวลา 24 ชม. นำไปกรองและเติม DI water

จนมีปริมาตร 1 L (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

2. DPPH assay

- **Stock DPPH solution (1 mM)**

DPPH	0.0985	g
------	--------	---

Methanol	250	mL
----------	-----	----

(กรอง และเก็บไว้ใน freezer)

- **Working DPPH (0.2 mM)**

Stock DPPH solution (1 mM)	10	mL
----------------------------	----	----

Methanol	40	mL
----------	----	----

3. FRAP assay

- **Acetate buffer (300 mM, pH 3.6)**

Sodium acetate.3H ₂ O	3.1	g
Glacial acetic acid	16	mL
เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L (เก็บไว้ที่ 4° C)		
● Dilute HCl: 40 mM		
Conc. HCl (1 M)	1.46	mL
เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L (เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)		
● TPTZ (10 mM)		
TPTZ	0.062	g
HCl (40 mM) (เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)	20	mL
● Ferric chloride (20 mM)		
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.108	g
DI water (เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)	20	mL
● Working FRAP reagent		
Acetate buffer (300 mM, pH 3.6)	200	mL
TPTZ (10 mM)	20	mL
Ferric chloride (20 mM)	20	mL
DI water (เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)	24	mL

4. Nitrite assay

● Griess reagent		
Phosphoric acid	3.5	mL
Sulfanilamide	1	g
N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (NED)	0.1	g

เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 mL
(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

5. Western blot

- **RIPA buffer**

PBS 1X	100	mL
NP-40	1	mL
SDS	0.1	g
(เก็บไว้ที่ 4° C)		

- **Lysis buffer**

RIPA buffer	1	mL
PMSF (200 mM)	10	μL
Leupeptin (2 mM)	1	μL
E-64 (1 mM)	1	μL
(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)		

- **6X Sample Buffer**

Tris-base	0.59	g
DI water	8.5	mL
SDS	1.5	g
2ME	0.6	mL
Glycerol	7.5	mL
Bromophenol blue	7.5	mg
(เก็บไว้ที่ 4° C)		

- **10% SDS-polyacrylamide gel**

SDS	10	g
DI water	100	mL
(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)		

- **10% AP solution**

Ammonium persulfate	0.1	g
DI water	1	mL
(เตรียมทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)		

- **30% acrylamide**

Acrylamide	30	g
bis- acrylamide	0.8	g
DI water	100	mL
(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

- **1.5 M Tris Cl, pH 8.8**

Tris-base	18.165	g
DI water	80	mL
ปรับด้วยกรด HCL ไปที่ pH 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

- **5 M TrisCl, pH 6.8**

Tris-base	6	g
DI water	80	mL
ปรับด้วยกรด HCL ไปที่ pH 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

- **Running buffer (10 X)**

Tris-base	30	g
Glycine	14.4	g
SDS	10	g
ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 1 L (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)		

- **Running buffer (1X)**

Running buffer (10 X)	100	mL
DI water	900	mL

กรอง (เก็บไว้ที่ 4° C)

- **Blotting buffer (1X)**

Tris-base	3.03	g
Glycine	14.4	g
Methanol	200	mL

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 1 L (กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)

- **TPBS 0.1% Tween 20**

PBS 1X	1,000	mL
Tween 20	1	mL

กรอง (เก็บไว้ที่ 4° C)

- **5% skim milk**

Skim milk	0.75	g
TPBS 0.1% Tween 20	15	mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Coomassie stain solution**

Coomassie blue	0.05	g
Methanol	80	mL
Glacial acetic acid	14	mL

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **Destaining solution**

Methanol	5	mL
Glacial acetic acid	7	mL

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 100 mL

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **10% Resolving gel (12.05 mL สำหรับ 2 gel)**

30% acrylamide	3.984	mL
1.5 M Tris/SDS pH 8.8	2.988	mL
DI water	4.98	mL
10% AP	84	μL
TEMED	15	μL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Stacking gel (4.99 mL สำหรับ 2 gel)**

30% acrylamide	0.65	mL
0.5 M Tris/SDS pH 6.8	1.25	mL
DI water	3.05	mL
10% AP	34	μL
TEMED	5	μL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Lowry reagent**

Reagent A (2% Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH)

▪ Na ₂ CO ₃	5	g
▪ NaOH (0.1 N)	250	mL

(เก็บไว้ที่ 4° C)

Reagent B (0.5% CuSO₄·5H₂O in 1% sodium citrate)

▪ CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05	g
▪ Sodium citrate	0.1	g
▪ DI water	10	mL

Reagent C (1 N Folin phenol reagent)

- 2 N Folin phenol reagent เจือจางด้วย DI water (1:1, v/v)
- (เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

Reagent D

- Reagent A : Reagent B (50 : 1)

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Primary antibodies iNOS หรือ COX-2 (1:500)**

Primary antibodies (iNOS or COX-2) (200µg/ mL) 20 µL

Skim milk 0.1 g

TPBS 10 mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Secondary antibody HRP-conjugated rabbit-anti-mouse-IgG (1:10,000)**

Secondary antibody HRP (200 µg/ 0.5 mL) 1 µL

Skim milk 0.1 g

TPBS 10 mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **Tubulin antibody (1:1,000)**

Tubulin antibody (200 µg/ mL) 10 µL

Skim milk 0.1 g

TPBS 10 mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

6. DNA fragmentation

- **1.2% agarose gel**

Agarose gel 1.2 g

DI water 100 mL

(เตรียมทุกครั้งก่อนการทดลอง)

- **TBE buffer 10X solution**

Boric acid 55 g

Tris-base 109 g

EDTA 9.3 g

DI water 800 mL

ละลาย และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water ไปที่ 1 L
(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **TBE buffer 1 X solution**

TBE buffer 10 X solution 100 mL

DI water 900 mL

(กรอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **RNaseA 100 mg/mL**

RNaseA 50 mg

Double-distilled water (DDW) 500 μ L

(Aliquot และเก็บไว้ที่ 4° C)

- **DNA ladder 100 bp (keep in -20°C) (DNA detection kit (QIAGEN))**

Stock solution= 500 μ g/mL = 0.5 μ g/ μ L = 500 ng/ μ L

Working solution = 50 ng/ μ L

Stock 5 μ L + 45 μ L AE

- **DNA mini kit (QIAGEN)**

AW1 + ethanol 25 mL

AW2 + ethanol 30 mL

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

- **Ethidium bromide staining (10 mg/mL, FW=394.3)**

DI water 100 mL

Ethidium Bromide 1 g

(เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง)

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

1. สารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

- **FBS/FCS (inactivated, Hyclone)**

ละลาย FBS ที่แช่แข็งใน -20°C ด้วยการนำไปแช่ใน breaker ที่เปิดน้ำไหลผ่าน

วางขวด serum ไว้ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 37°C

สังเกตให้ละลายเป็นของเหลวจนเป็นเนื้อเดียวกัน

Heat inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 20 นาที

เขย่าเบา ๆ โดยการหมุนเป็นวงกลมในน้ำทุก 5-10 นาที

Aliquot ใน 50 mL conical tube (เก็บไว้ที่ -20°C)

- **RPMI 1640 1X**

RPMI-1640 1X ด้วย L-glutamine และ phenol red

1 ชอง

NaHCO_3

2 g

ปรับปริมาตรด้วย MQ water ไปที่ 1000 mL

ปรับ pH ไปที่ 7.4 ตามด้วยการกรอง และเก็บไว้ที่ 4°C

- **RPMI 1640 1X (complete media)**

FBS (inactivated, Hyclone)

20 mL

HEPES buffer 1 M

3.75 mL

Penicillin+Streptomycin (100 X)

2 mL

RPMI-1640 1X ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น

200 mL

(เก็บไว้ที่ 4°C)

- **PBS 10X**

KH_2PO_4

0.288 g

NaCl	18	g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.5	g
MQ.water	200	mL
(Autoclave ที่ 121°C, 15 นาที, และเก็บไว้ที่ 4°C)		

- **PBS 1X**

PBS 10X	20	mL
MQ.water	180	mL
(เก็บไว้ที่ 4°C)		

- **Hepes buffer (1M)**

Hepes	23.83	g
MQ.water	100	mL
(เก็บไว้ที่ 4°C)		

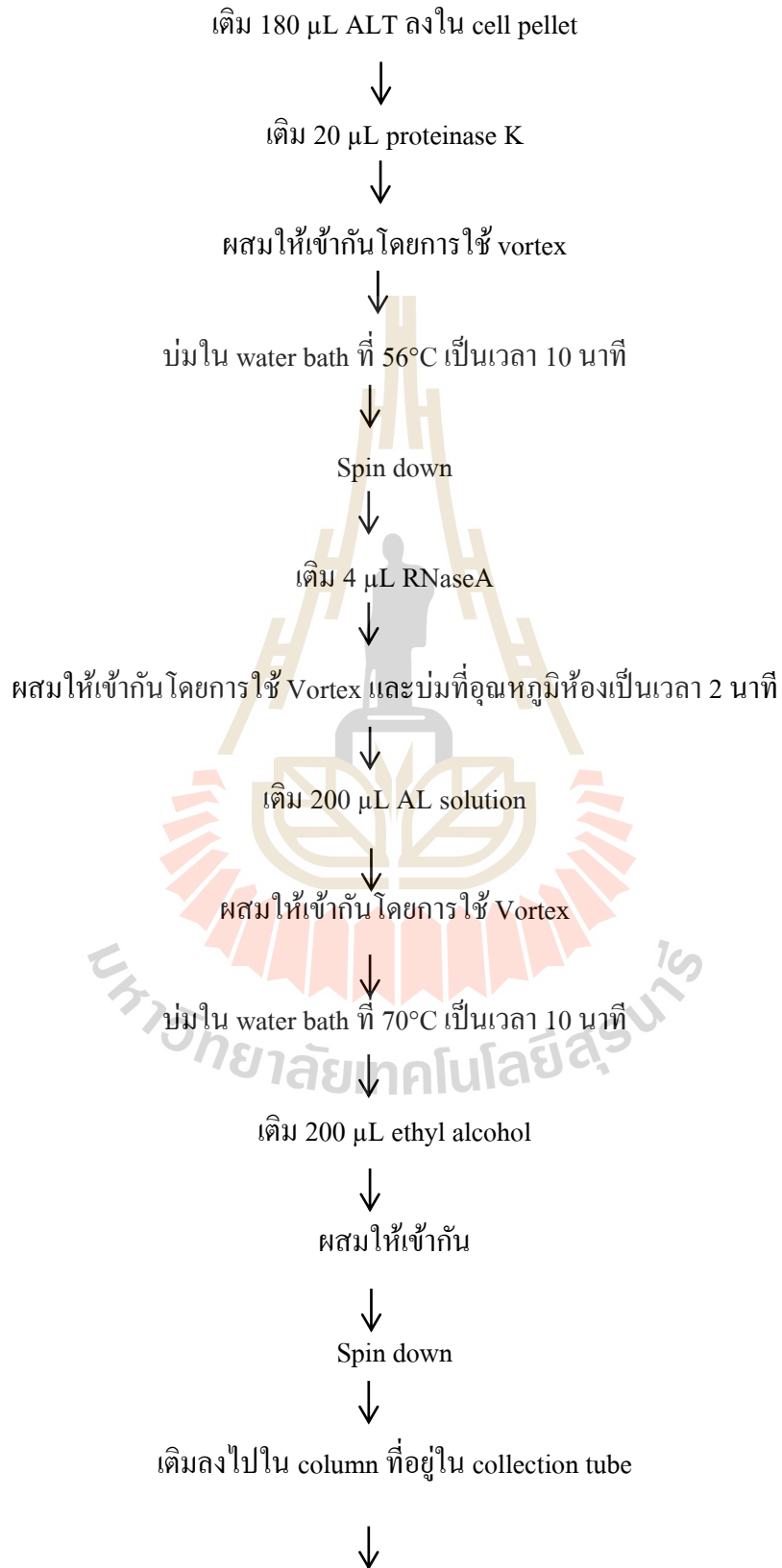
- **Penicillin/Streptomycin (100X)**

Penicillin	0.6	g
Streptomycin	1.34	g
PBS 1X	100	mL
(Aliquot และเก็บไว้ที่ -20°C)		

- **Trysin/EDTA**

Trysin	0.25	g
EDTA	0.04	g
PBS 1X	100	mL
(Aliquot และเก็บไว้ที่ -20°C)		

- DNA mini kit manufacturer's instructions



Centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที



ย้าย column ไปใส่ใน tube อันใหม่



เติม 500 μ L AW1 solution



Centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที



ย้าย column ไปใส่ใน tube อันใหม่



เติม 500 μ L AW2 solution



Centrifuge 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที



ย้าย column ไปใส่ใน tube อันใหม่



Elute ด้วย 200 μ L (100 μ L) AE buffer หรือ DDW



บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที



Centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที



Elute ด้วย 200 μ L (100 μ L) AE buffer หรือ DDW



บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที



Centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

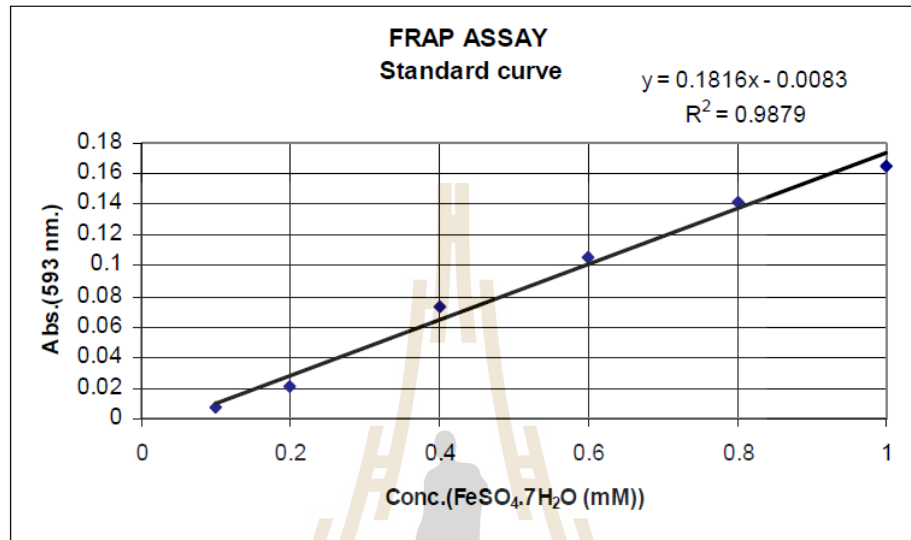


Solution นี้จะถูกใช้สำหรับการ load gel (1.2% agarose gel) 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที

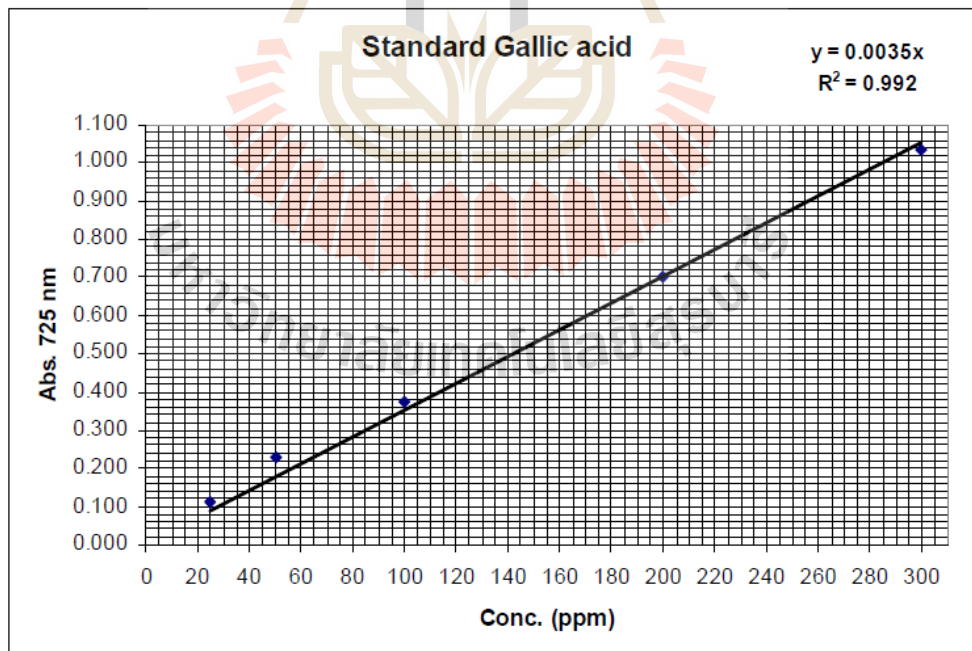
ภาคผนวก ค

Standard curve

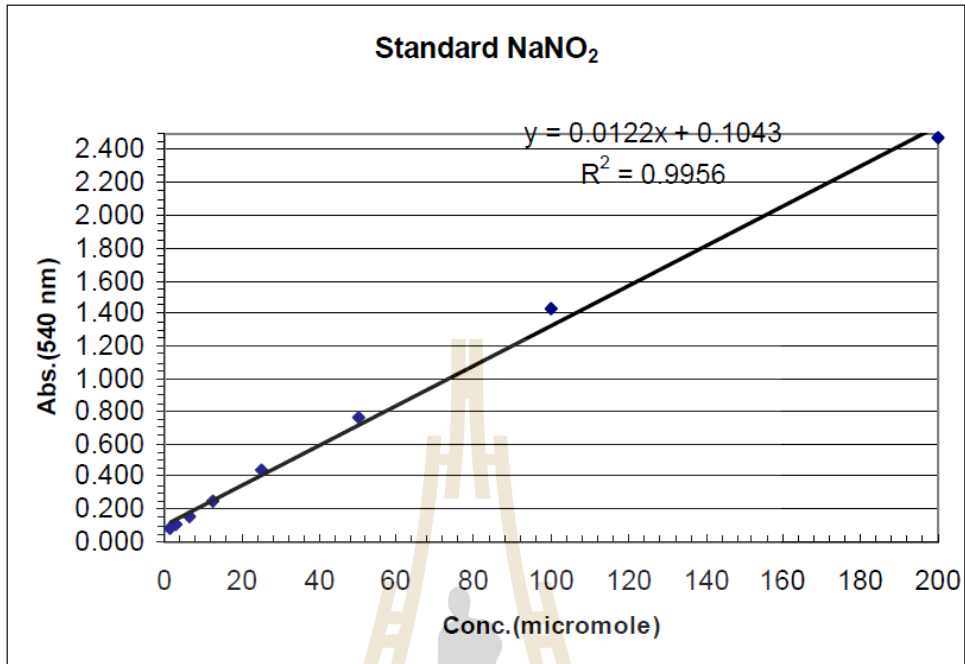
1. Standard curve ของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใน FRAP assay



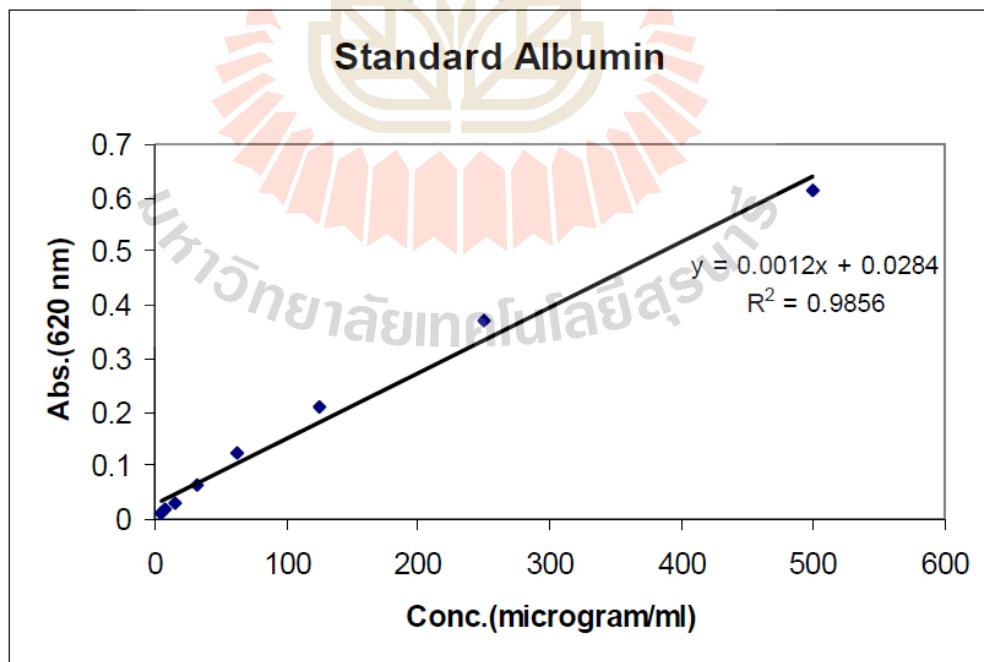
2. Standard curve ของ gallic acid ใน total phenolic content



3. Standard curve ของ NaNO_2 ใน Nitrite assay



4. Standard curve ของ Albumin ใน Lowry method



ประวัตินักวิจัย

ผศ.ดร.เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์ เกิดวันที่ 25 พฤษภาคม จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2516-2520) ได้รับทุนการศึกษารัฐบาลไทย (กรรมการข้าราชการพลเรือน) ไปศึกษาต่อระดับปริญญาโทสาขาวิชา Environmental Health (Toxicology) ที่ University of Michigan ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2521-2523) และทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชา Toxicology ของมหาวิทยาลัย Utah State University ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2525-2629) ก่อนปฏิบัติงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เคยเป็นผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล (พ.ศ. 2525-2529) นักวิจัยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2523-2525) postdoctoral fellow ที่ Medical College of Virginia (พ.ศ. 2529-2532) special fellow ที่ Cleveland Clinic Foundation (พ.ศ. 2529-2532) และ research associate ที่ Case Western Reserve University (พ.ศ. 2533-2537) ประเทศสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาชีวเวชศาสตร์ สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีความชำนาญพิเศษทางด้าน Immunology และ immunotoxicology

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี