วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.2) May – August 2021 บทความวิจัย

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่น (มะยม ลูกใต้ใบ และ เตยหอม) ในการยับยั้งกระบวนการสร้างและหลั่งสารพรอสตาแกลนดิน อีทู

Anti-Inflammatory Activity of Folk Wisdom Boiled Herb and Its Ingredient Extracts (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. and *Pandanus amaryllifolius* Roxb.) on Inhibition of Prostaglandin E_2 Production and Secretion

สุภาพร ขำจันทร์[1*] และ พิมพร วงค์ราษฎร์[2]

Supaporn Khamchun[1*] and Pimporn Wongrad[2]

[1]*หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านภูมิคุ้มกันวินิจฉัยและรักษาในระดับเซลล์และโมเลกุล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา*

[2]*สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา*

[1]*Unit of Excellence on Cellular and Molecular Immunodiagnosis and Therapy, School of Allied Health Sciences, University of Phayao*

[2]*Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao*

Received : 14 May 2020

Revised : 22 July 2020

Accepted : 18 September 2020

บทคัดย่อ

การบำบัดรักษาโรคด้วยสมุนไพรจัดว่าเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่สืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่น โดยพบว่าในพื้นที่ อ.แม่ใจ จ.พะเยา มีการนำน้ำต้มสมุนไพรที่ประกอบด้วยมะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม มาบำบัดรักษาโรคในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งทั้งนี้โรคดังกล่าวมีกลไกการเกิดโรคที่สัมพันธ์กับการอักเสบของร่างกาย ดังนั้น ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ของน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่นและส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนต่อการยับยั้งการอักเสบผ่านการทำหน้าที่ของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-ทู (COX-2) ที่ส่งผลต่อการหลั่งสารพรอสตาแกลนดิน อีทู (PGE_2) โดยผู้วิจัยได้ทำการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยไลโพโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/ml แล้วจึงตรวจสอบผลของสารสกัดต่อการตายของเซลล์ การหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ด้วยวิธี trypan blue assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ COX activity assay ตามลำดับ ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดไม่ส่งผลเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนั้นสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรมะยมที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/ml สารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรลูกใต้ใบ และสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรรวมในทุกความเข้มข้นสามารถลดการหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่น อ.แม่ใจ จ.พะเยา จึงมีคุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการอักเสบจากลูกใต้ใบและมะยมที่เป็นส่วนประกอบ ซึ่งทั้งนี้สารที่ทำหน้าที่หลักในการออกฤทธิ์ของส่วนประกอบดังกล่าวอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ : น้ำต้มสมุนไพร ; เตยหอม ; ลูกใต้ใบ ; การอักเสบ ; พรอสตาแกลนดิน อีทู

Abstract

Thai traditional herb had been applied as an alternative medicine extensively in various area including Si Toi, Mae Chai, Phayao province that lastingly inherited the alleviation of disease severity with boiled herb consisted *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. and *Pandanus amaryllifolius* Roxb. in diabetes mellitus patients. However, the severity of this disease was revealed the intimate relation with inflammatory process in human body. The present study thus purposed the effect of abovementioned folk wisdom boiled herb and its gradient extracts on anti-inflammation through the reduction of cyclooxygenase-2 (COX-2) activity and prostaglandin E2 (PGE_2) secretion, respectively. RAW264.7 macrophage cell line was treated with folk wisdom boiled herb and its gradient extracts prior induction by lipopolysaccharide (LPS). The cytotoxic and anti-inflammatory effect of these extracts were subsequently evaluated by trypan blue exclusion, COX activity and PGE_2 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Our data showed the non-toxicity of folk wisdom boiled herb and its gradient extracts on macrophage cell line. Moreover, all concentrations (100, 200 and 400 µg/ml) of folk wisdom boiled herb, *Phyllanthus niruri* and *Phyllanthus acidus* at concentration of 200 and 400 µg/ml significantly inhibit PGE_2 secretion and COX-2 activity in macrophage cell line with dose dependence manner ($p<0.05$). Accordingly, this folk wisdom boiled herb had inhibitory effect on inflammation, which derived from *Phyllanthus niruri* and *Phyllanthus acidus*, respectively. The bioactive compounds in these extracts may be explored for the further development into community health product.

Keywords : boiled herb ; *Phyllanthus niruri* ; *Pandanus amaryllifolius* ; Inflammation ; Prostaglandin E_2

***Corresponding author. E-mail :** supaporn.kh@up.ac.th

บทนำ

ภูมิปัญญาท้องถิ่นจัดเป็นความรู้ความสามารถอันเกิดจากความเฉลียวฉลาด และประสบการณ์ของคนในท้องถิ่นในการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในชุมชนเพื่อประดิษฐ์คิดค้นจนกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาแก้ไขปัญหาด้านต่าง ๆ ซึ่งรวมถึงการบำบัดรักษาโรคภัยไข้เจ็บผ่านการนำสมุนไพรในท้องถิ่นมาต้มแล้วให้ผู้ป่วยหรือกลุ่มเสี่ยงของโรคดื่มน้ำต้มดังกล่าว เพื่อบรรเทาอาการของโรค ที่เรียกกันว่า “น้ำต้มสมุนไพร” ซึ่งมีมากมายหลายแบบตามแต่ละองค์ประกอบของสมุนไพรในแต่ละพื้นที่ และการสืบทอดต่อกันมาจากรุ่นสู่รุ่น จากการสำรวจพื้นที่ในจังหวัดพะเยา พบว่า ชุมชนตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ มีการใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นน้ำต้มสมุนไพรที่ประกอบไปด้วยส่วนผสมของพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ มะยม (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) ลูกใต้ใบ *(Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.) และเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) ในการบำบัดรักษาผู้ป่วยและกลุ่มเสี่ยงโรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เพื่อช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดและบำรุงร่างกาย ซึ่งจากการศึกษากลไกการเกิดและความรุนแรงของโรคเบาหวานทั้งชนิดที่ 1 และ 2 พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (inflammation) ในการทำลาย β-cell ที่ทำหน้าที่ผลิตสารอินซูลิน จึงทำให้ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยได้ (Esser *et al*., 2014; Lontchi-Yimagou *et al*., 2013) โดยการเกิดขึ้นของกระบวนการอักเสบนี้เป็นผลมาจากการกระตุ้นของสิ่งเร้าต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อ (infection) ความเครียด (stress) หรือการบาดเจ็บ (injury) ของเนื้อเยื่อภายในอวัยวะเป็นต้น ส่งผลให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์นิวโตรฟิล และแมคโครฟาจ เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองด้วยการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ และหลั่งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) หรือพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) เป็นต้น (Buckley *et al*., 2014; Serhan *et al*., 2008) ซึ่งจากความสัมพันธ์ของกระบวนการอักเสบกับกลไกการเกิดโรคเบาหวานดังกล่าว จึงทำให้มีการนำยาต้านการอักเสบมาใช้ร่วมด้วยในผู้ป่วย ทั้งนี้เพื่อช่วยลดความรุนแรงและอาการแทรกซ้อนต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นในผู้ป่วยได้ (Pollack *et al*., 2016; Sowers *et al*., 2005) อีกทั้งยาต้านการอักเสบดังกล่าวยังมีความสามารถในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อีกด้วย (Dandona & Aljada, 2002; Li *et al*., 2007) โดยยาต้านการอักเสบที่ใช้ในปัจจุบันทั้งที่เป็นแบบ สเตียรอยด์ (steroid) และไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroid) พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase, COX) ในกระบวนการย่อยกรดไขมันอะราชิโดนิก จากเยื่อหุ้มเซลล์ให้กลายเป็นพรอสตาแกลนดิน อีทู (prostaglandin E_2, PGE_2) ซึ่งมีผลชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัวในระบบไหลเวียนโลหิต เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผนังหลอดเลือดของสารน้ำต่าง ๆ ทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง ร้อน ในบริเวณที่มีการอักเสบ และอาจส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อในบริเวณนั้นร่วมด้วย (Gomez *et al*., 2013; Kawahara *et al*., 2015) ดังนั้น ยาต้านการอักเสบที่ใช้ในปัจจุบันจึงมีผลลดอาการดังกล่าว และสามารถส่งผลลดความรุนแรงของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยเฉพาะโรคเบาหวานได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยาต้านการอักเสบดังกล่าวมักมีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วย โดยทำให้เกิดการส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง และระบบทางเดินอาหาร ซึ่งสามารถทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเวียนศีรษะ ปวดท้อง และคลื่นไส้อาเจียนได้ (Sostres *et al*., 2013; Vonkeman & Van De Laar, 2010) อีกทั้งต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงมีราคาแพงส่งผลเป็นอุปสรรคในการรักษากับผู้ป่วยที่มีรายได้น้อย ดังนั้น การบำบัดรักษาโรคด้วยวิธีการอื่นที่นอกเหนือไปจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน โดยเฉพาะการใช้พืชสมุนไพรท้องถิ่น จึงได้นำมาเป็นการแพทย์ทางเลือกที่จะเป็นการกระจายโอกาสในการเข้าถึงการรักษาในประชาชนทุกกลุ่ม ทั้งนี้ เนื่องจากพืช

สมุนไพรพบว่ามีอยู่ในแต่ละท้องถิ่น จึงสามารถหามาใช้ได้ง่าย มีราคาถูก เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์น้อย รวมถึงยังถือเป็นหนึ่งในภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมา จึงทำให้ประชาชนในพื้นที่เกิดการยอมรับและให้ความร่วมมือในการบำบัดรักษาโรคเป็นอย่างดี

จากการรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดจากมะยมที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลในส่วนของใบ ผล และส่วนที่อยู่เหนือดิน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ กระบวนการอักเสบ รวมถึงการลดอาการเจ็บปวดที่เกิดขึ้นจากการอักเสบทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (Chakraborty *et al.*, 2012; Hossain *et al.*, 2016; Hossen *et al.*, 2015) ผ่านกลไกการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณ (signaling pathway) และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ที่ส่งผลให้เกิดการลดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน (Hossen *et al.*, 2015) สารสกัดจากลูกใต้ใบในส่วนของใบ ส่วนที่อยู่เหนือดิน และในทุก ๆ ส่วนที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอล เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำกลั่น สามารถต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ อาการเจ็บปวด ด้วยกลไกการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณ และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ที่ส่งผลให้เกิดการลดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ พรอสตาแกลนดิน และไซโคน์ ทั้งในหลอดทดลอง และสัตว์ทดลอง (Alagan *et al.*, 2019; Harikrishnan *et al.*, 2018; Karuna *et al.*, 2009; Kiemer *et al.*, 2003; Kiran & Rao, 2013; Ofuegbe *et al.*, 2014) อีกทั้งสารสกัดจากเตยหอมในส่วนของใบและรากที่สกัดด้วยเอาทอล เมทานอล โพรพิลีนไกลคอล และน้ำกลั่น ก็มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Ibrahim & Adniruddin, 2018; Suwannakul *et al.*, 2018) ดังนั้นจะเห็นว่าส่วนประกอบที่อยู่ในน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่นทั้งมะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม มีความเกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบทั้งสิ้น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อส่วนประกอบดังกล่าวมารวมกันเป็นผลิตภัณฑ์น้ำต้มสมุนไพรที่เป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นแล้วนั้น พบว่ายังไม่ทราบถึงประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งกระบวนการอักเสบในกลไกต่าง ๆ โดยเฉพาะการหลั่งสาร PGE_2 ผ่านการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความสามารถของน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่น รวมถึงความสามารถของส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแต่ละชนิดแยกส่วน (มะยม ลูกใต้ใบ หรือเตยหอม) ในการลดกระบวนการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์แมครโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโพโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ทั้งนี้เพื่อให้เกิดเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการระบุสรรพคุณยับยั้งการอักเสบของน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่น และทราบถึงสมุนไพรส่วนประกอบที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว ซึ่งอาจจะสามารถนำมาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน รวมถึงก่อให้เกิดการอนุรักษ์ภูมิปัญญาท้องถิ่น และการเพิ่มรายได้ให้กับชุมชนอีกทางหนึ่ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การเตรียมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม</u>

เตรียมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรตำรับบ้านต้นตะเคียน ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา ซึ่งประกอบด้วย มะยม (ส่วนใบและก้าน) ลูกใต้ใบ (ส่วนรากและลำต้น) และเตยหอม (ส่วนรากและลำต้น) ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยพืชดังกล่าวได้มีการระบุ voucher no. วงศ์ และสายพันธุ์จากองค์การสวนพฤกษศาสตร์ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ ดังนี้ ลูกใต้ใบ คือ QBG No.126494 วงศ์ PHYLLANTHACEAE และสายพันธุ์ *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. มะยม คือ QBG No.126493 วงศ์ PHYLLANTHACEAE และสายพันธุ์ *Phyllanthus acidus* (L.)

Skeels เตยหอม คือ QBG No.126495 วงศ์ PANDANACEAE และสายพันธุ์ *Pandanus amaryllifolius* Roxb. จากนั้นนำพืชทั้งหมดมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม สกัดสารด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของพืช 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน โดยการนำพืชสมุนไพรลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอมในส่วนดังกล่าวอย่างละ 100 กรัม มาเติมลงในหม้อต้มร่วมกัน แล้วเติมน้ำกลั่น 3000 มิลลิลิตรต่อหม้อต้ม ทำการต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง จะได้ส่วนของน้ำต้มสมุนไพรรวม ในขณะที่น้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน จะนำพืชสมุนไพรมะยม ลูกใต้ใบ หรือเตยหอมอย่างละ 100 กรัม มาเติมลงในหม้อต้มแยกกัน แล้วเติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรต่อหม้อต้ม ทำการต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา กรองน้ำต้มด้วยผ้าขาวบาง และนำน้ำที่กรองออกมาไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 400×g นาน 10 นาที จากนั้นทำให้น้ำต้มแห้งเป็นผงโดยการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยเครื่อง lyophilizer (Labconco, USA) นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บผงสารสกัดไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาทดสอบ

2. การเตรียมสารสกัดความเข้มข้นเริ่มต้น (stock concentration)

เตรียมสารสกัดจากน้ำต้มพืชสมุนไพรรวม (ลูกใต้ใบ มะยม เตยหอม) และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน ในความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 mg/ml โดยการชั่งสารสกัดแต่ละชนิด 0.001 g แล้วละลายด้วย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1 ml จากนั้นทำให้สารสกัดจากน้ำต้มพืชสมุนไพรรวม (ลูกใต้ใบ มะยม เตยหอม) และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนปราศจากเชื้อจุลชีพที่อาจปนเปื้อนอยู่ด้วยการนำสารสกัดไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany) แล้วทำการเก็บสารสกัดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 จาก American Type Culture Collection (ATCC, USA) เลขที่ TIB-71 เพื่อเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator (Sheldon Manufacturing, USA) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), penicillin G (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 60 U/ml และ streptomycin (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 60 µg/ml

4. การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion method

เติมเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 1×10^6 cells/ml ปริมาตร 50 µl ต่อหลุม แล้วเพาะเลี้ยงใน 96-well tissue culture plate (Corning, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 70-80% จากนั้นเติมสารสกัดน้ำต้มสมุนไพรรวม (มะยม ลูกใต้ใบ เตยหอม) และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนในความเข้มข้น 800 µg/ml เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดแต่ละชนิดเท่ากับ 400 µg/ml, LPS (Invitrogen, USA) ในความเข้มข้น 10 µg/ml และ LPS (Invitrogen, USA) ในความเข้มข้น 10 µg/ml ร่วมกับสารสกัดน้ำต้มสมุนไพรรวม (มะยม ลูกใต้ใบ เตยหอม) และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนในความเข้มข้น 800 µg/ml ปริมาตร 50 µl ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator (Sheldon Manufacturing, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วบ่มเซลล์ในแต่ละหลุมทดสอบร่วมกับ 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, USA) ใน 5% CO_2 incubator (Sheldon Manufacturing, USA) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจาก plate จากนั้นดูดเซลล์จากแต่ละหลุมทดสอบมาผสมกับ

0.4% trypan blue (Gibco, USA) ในอัตราส่วน 1:1 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี trypan blue) และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (ติดสี trypan blue) จากนั้นคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (%viability) จากสูตร

$$\%viability = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \quad (1)$$

5. *การกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ด้วย LPS*

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ใน 96-well plate tissue culture (Corning, USA) จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 70-80% แล้วก็ทำการเติมสารสกัดน้ำต้มสมุนไพรรวม (มะยม ลูกใต้ใบ เตยหอม) และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน ปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลุมทดสอบ เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดแต่ละชนิดเท่ากับ 100, 200 และ 400 µg/ml ยกเว้นหลุมที่เป็น vehicle control ให้เติม PBS ลงไปแทน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทิ้ง แล้วเติม LPS (Invitrogen, USA) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ปริมาตร 50 µl ลงในทุกหลุมทดสอบ ยกเว้นหลุมที่เป็น cell control ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS-DMEM ลงไปแทน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 incubator (Sheldon Manufacturing, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดน้ำเลี้ยงเซลล์และทำให้เซลล์หลุดออกจาก plate ด้วยการบ่มเซลล์ร่วมกับ 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, USA) ใน 5% CO_2 incubator (Sheldon Manufacturing, USA) เป็นเวลา 5 นาที ทั้งนี้เพื่อเตรียมให้เป็นตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ PGE_2 และ COX-2 ตามลำดับ ต่อไป

6. *การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดสาร PGE_2 และเอนไซม์ COX-2*

การทดสอบการหลั่งสาร PGE_2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 สามารถทำได้โดยเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทดสอบมากรองเอาเศษเซลล์ออกด้วย 0.2 µm cellulose acetate membrane (Sartorius, Germany) จากนั้นเก็บส่วนใสที่ผ่านกรองไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการทดสอบ

การทดสอบความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 สามารถทำได้โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละหลุมทดสอบเดียวกันกับการทดสอบการหลั่งสาร PGE_2 มาแตกด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 ที่ประกอบด้วย 1 mM EDTA ปริมาตรหลุมละ 200 µl ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000×g, 4°C นาน 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสภายหลังการปั่นไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการทดสอบ

7. *การตรวจวัดการหลั่งของสาร PGE_2 ด้วยวิธี competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

ทำการตรวจวัดปริมาณการหลั่งของสาร PGE_2 ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป PGE_2 parameter assay ที่อาศัยหลักการ competitive ELISA (R&D Systems, USA) ซึ่งมีรายละเอียดการทดสอบคือ เติมแอนติบอดีต่อ PGE_2 ปริมาตรหลุมละ 50 µl ลงใน ELISA plate ที่เคลือบไว้ด้วย sheep anti-mouse IgG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้าง ELISA plate ด้วย washing buffer (0.05% tween20-PBS) ทั้งหมด 4 ครั้ง จากนั้นดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ในแต่ละหลุมทดสอบมาเติมลงใน ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 50 µl แล้วเติม

PGE_2 ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ลงไปพร้อมกันในปริมาตรหลุมละ 50 µl เช่นเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้าง ELISA plate ด้วย washing buffer ทั้งหมด 4 ครั้ง จากนั้นเติม TMB substrate ปริมาตรหลุมละ 100 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเติม 1M sulfuric acid ในปริมาตรหลุมละ 100 µl แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader (Bio-Rad, USA) จากนั้นนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ PGE_2 (pg/ml) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ และคำนวณร้อยละการยับยั้งในการหลั่งสาร PGE_2 ของสารสกัดน้ำต้มสมุนไพรเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่เติมสารสกัด จากสูตร

$$\%PGE_2\ inhibition = \frac{(ความเข้มข้น\ PGE_2\ vehicle\ control - ความเข้มข้น\ PGE_2\ สารสกัด) \times 100}{ความเข้มข้น\ PGE_2\ vehicle\ control} \quad (2)$$

8. <u>การตรวจวัดความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ด้วยวิธี COX activity assay</u>

ตรวจวัดความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป COX activity assay (Cayman Chemical, USA) ซึ่งมีรายละเอียดการทดสอบ คือ นำส่วนใสที่ได้ภายหลังจากการแตกเซลล์ในแต่ละหลุมทดสอบในปริมาตร 150 µl ไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 8,000×g นาน 1 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาทำการทดสอบใน 96-well flat bottom plate ในชุดการทดสอบ ดังนี้ 1) หลุม background เติม assay buffer ปริมาตร 120 µl, hemin ปริมาตร 10 µl และส่วนใสจากตัวอย่างที่ผ่านการต้ม (inactivated sample) ปริมาตร 40 µl 2) หลุม standard เติม assay buffer ปริมาตร 150 µl, hemin ปริมาตร 10 µl และ standard solution ปริมาตร 10 µl 3) หลุมตัวอย่าง เติม assay buffer ปริมาตร 120 µl, hemin ปริมาตร 10 µl และตัวอย่างที่ไม่ผ่านการต้ม ปริมาตร 40 µl 4) หลุม inhibitor เติม assay buffer ปริมาตร 110 µl, hemin ปริมาตร 10 µl, ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการต้ม ปริมาตร 40 µl และ SC-560 ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 ปริมาตร 10 µl จากนั้นทำการเขย่า plate เบา ๆ เพื่อผสมสารที่เติมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เติม N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) substrate ปริมาตรหลุมละ 20 µl และเติม arachidonic acid solution เพื่อเริ่มปฏิกิริยาในปริมาตรหลุมละ 20 µl เขย่าเพลทเบา ๆ แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader (Bio-Rad, USA) จากนั้นนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อให้ได้ค่าการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 (U/ml) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ และคำนวณร้อยละการยับยั้งในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดน้ำต้มสมุนไพรเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่เติมสารสกัด จากสูตร

$$\%COX\text{-}2\ inhibition = \frac{(ค่าการทำหน้าที่\ COX\text{-}2\ vehicle\ control - ค่าการทำหน้าที่\ COX\text{-}2\ สารสกัด) \times 100}{ค่าการทำหน้าที่\ COX\text{-}2\ vehicle\ control} \quad (3)$$

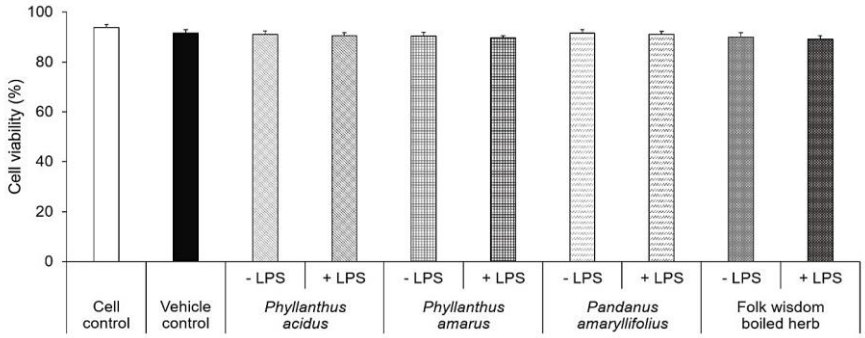
9. *การวิเคราะห์ข้อมูล*

รายงานข้อมูลในการทุกการทดสอบเป็นค่า mean±SEM จากการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และอาศัยการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Mann-Whitney U test หรือ one-way analysis of variance (ANOVA) ในการเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่ม หรือการเปรียบเทียบที่มากกว่า 2 กลุ่ม ตามลำดับ ซึ่งกำหนดค่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

ผลการวิจัย

1. *ผลของน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร (มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม) ต่อความมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ*

ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่บ่มร่วมกับ LPS ความเข้มข้น 10 µg/ml แต่ไม่เติมสารสกัด (vehicle control) และที่บ่มร่วมกับสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร ส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร (มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม) ในความเข้มข้นสุดท้าย 400 µg/ml ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันกับเซลล์ที่ไม่บ่มร่วมกับสารสกัด และ LPS (cell control) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร ส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร และ LPS ไม่ส่งให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ ดังภาพที่ 1

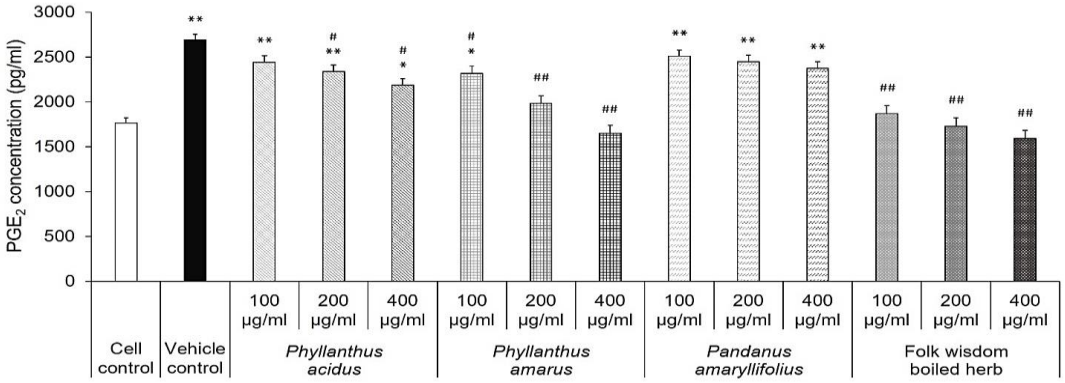


ภาพที่ 1 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งประกอบไปด้วยสภาวะ cell control, vehicle control การเติมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน (มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม) ในความเข้มข้น 400 µg/ml เพียงอย่างเดียว และการเติม LPS ร่วมกับสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนในความเข้มข้น 400 µg/ml ตามลำดับ

2. *ผลของน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร ได้แก่ มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอมต่อการหลั่ง PGE_2 ของเซลล์แมคโครฟาจ*

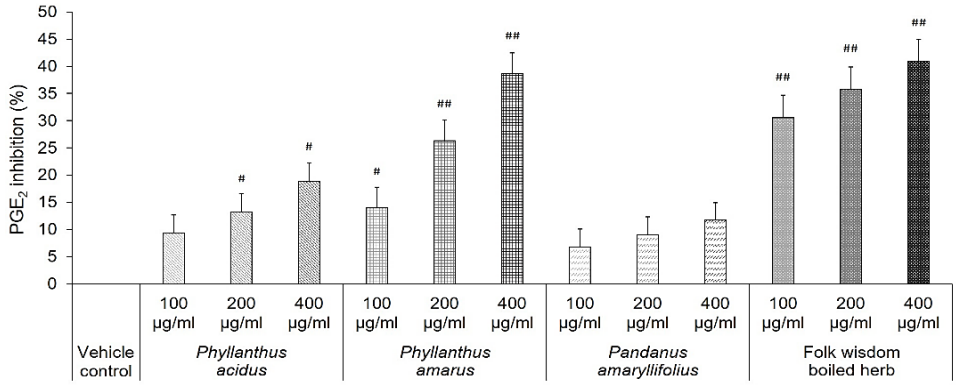
ความเข้มข้นของ PGE_2 ที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 10 µg/ml พบว่า มีค่าแตกต่างกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แสดงให้เห็นว่า LPS ในความเข้มข้นดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบผ่านการหลั่งสาร PGE_2 ได้ ดังภาพที่ 2 ในขณะที่ความเข้มข้น

ของ PGE_2 ที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เติมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนลูกใต้ใบทุก ๆ ความเข้มข้น (100, 200 และ 400 µg/ml) รวมถึงส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนมะยมที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/ml พบว่า มีค่าแตกต่างกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แสดงให้เห็นว่าน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร คือ มะยม และลูกใต้ใบในความเข้มข้นดังกล่าว สามารถลดการหลั่งสาร PGE_2 ที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ค่าความเข้มข้นของ PGE_2 (pg/ml) ที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งประกอบไปด้วยสภาวะ cell control, vehicle control การเติมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร (มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม) ในความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/ml ตามลำดับ สัญลักษณ์ *, ** แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ cell control ในขณะที่ #, ## แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ vehicle control

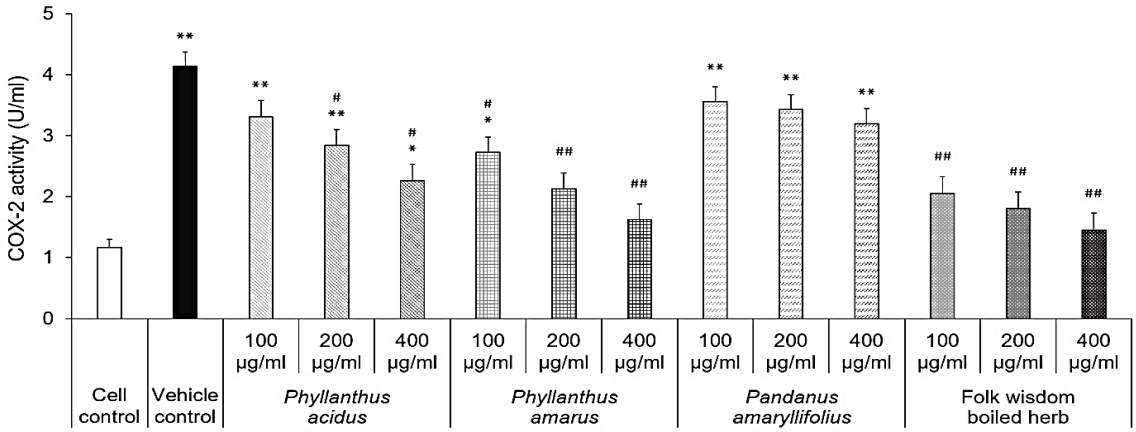
เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 กับเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรลูกใต้ใบทุก ๆ ความเข้มข้น (100, 200 และ 400 µg/ml) รวมถึงส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรมะยมในความเข้มข้น 200 และ 400 µg/ml สามารถยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และร้อยละการยับยั้งดังกล่าวเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรลูกใต้ใบและมะยมที่สูงขึ้นตามลำดับ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ร้อยละการยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะ vehicle control การเติมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร (มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม) ในความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/ml ตามลำดับ สัญลักษณ์ #, ## แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ vehicle control

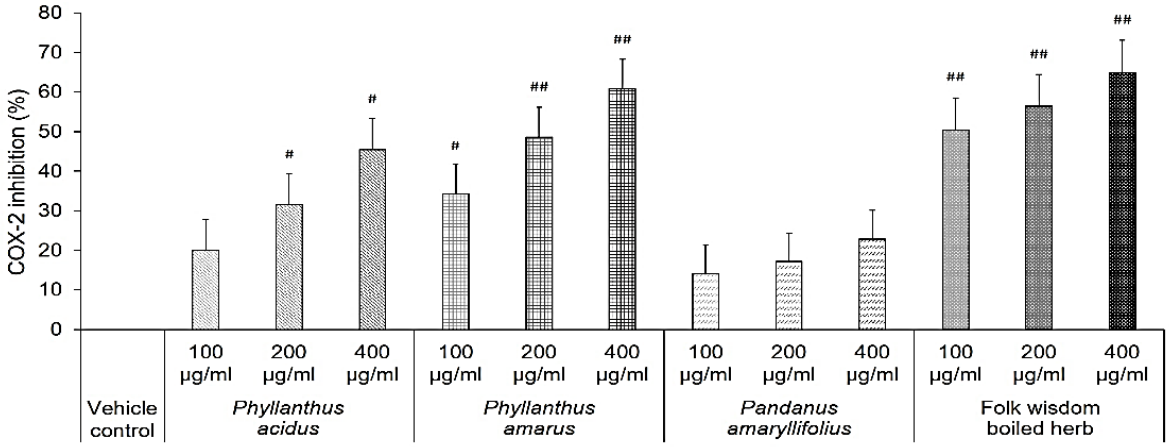
3. *<u>ผลของน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร ได้แก่ มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอมต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจ</u>*

ความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 10 µg/ml พบว่า มีค่าแตกต่างกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แสดงให้เห็นว่า LPS ในความเข้มข้นดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบผ่านการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ได้ ดังภาพที่ 4 ในขณะที่ความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เติมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนลูกใต้ใบทุก ๆ ความเข้มข้น (100, 200 และ 400 µg/ml) รวมถึงส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนมะยมที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/ml พบว่า มีค่าแตกต่างกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS แต่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แสดงให้เห็นว่าน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร คือ มะยม และลูกใต้ใบ ในความเข้มข้นดังกล่าว สามารถลดการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 (U/ml) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งประกอบไปด้วยสภาวะ cell control, vehicle control การเติมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร (มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม) ในความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/ml ตามลำดับ สัญลักษณ์ *, ** แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ cell control ในขณะที่ #, ## แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ vehicle control

เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 กับเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรลูกใต้ใบทุก ๆ ความเข้มข้น (100, 200 และ 400 µg/ml) รวมถึงส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรมะยมในความเข้มข้น 200 และ 400 µg/ml สามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และร้อยละการยับยั้งดังกล่าวเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรลูกใต้ใบและมะยมที่สูงขึ้นตามลำดับ ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ร้อยละการยับยั้งความสามารถในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยสภาวะ vehicle control การเติมสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรและส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพร (มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม) ในความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/ml ตามลำดับ สัญลักษณ์ *, ** แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ cell control ในขณะที่ #, ## แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05), 99% (p<0.01) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ vehicle control

วิจารณ์ผลการวิจัย

การพิสูจน์สรรพคุณทางยาของน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่นตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา และส่วนประกอบสมุนไพรในน้ำต้มทั้ง 3 ชนิด คือ มะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม ในการยับยั้งการอักเสบผ่านกลไกการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในการศึกษานี้ พบว่า สารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรรวม และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนที่ความเข้มข้นสุดท้ายสูงที่สุดที่ใช้ (400 µg/ml) รวมถึง LPS ความเข้มข้น 10 ug/ml ที่ใช้ในการกระตุ้นกระบวนการหลั่งสาร PGE_2 ไม่ส่งผลทำให้เซลล์เกิดความเป็นพิษ (ภาพที่ 1) จากนั้น ในการทดสอบความสามารถของสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนในการยับยั้งการการหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ผู้วิจัยได้มีการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS ซึ่งเป็นสารพิษที่พบอยู่บนผนังเซลล์ (endotoxin) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในการกระตุ้นการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune cells) เมื่อมีการได้รับเชื้อดังกล่าว โดยเฉพาะการหลั่งสาร PGE_2 ผ่านการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 (Bezugla *et al*., 2006; Díaz-Muñoz *et al*., 2012) ผลพบว่า LPS ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สามารถกระตุ้นการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในการหลั่งสาร PGE_2 ได้ (ภาพที่ 2 และ 4) และความเข้มข้นของ LPS ดังกล่าวสามารถนำมาศึกษาดูความสามารถของสารสกัดในการต้านกระบวนการอักเสบผ่านกลไกดังกล่าวต่อไปได้ ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำต้มสมุนไพร น้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนลูกใต้ใบและมะยมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการอักเสบผ่านกระบวนการลดการหลั่งสาร PGE_2 (ภาพที่ 2 และ 3) และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 (ภาพที่ 4 และ 5)

ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นได้ โดยส่วนประกอบสมุนไพรที่ทำหน้าที่ในการออกฤทธิ์ดังกล่าวนั้นเป็นผลมาจากสมุนไพรลูกใต้ใบและมะยม ซึ่งพบว่าสมุนไพรลูกใต้ใบคาดว่าจะทำหน้าที่หลักในกลไกการต้านกระบวนการอักเสบดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 (ภาพที่ 2 และ 3) และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 (ภาพที่ 4 และ 5) พบได้ทุกความเข้มข้นในการศึกษาครั้งนี้ ในขณะที่สมุนไพรมะยมพบเฉพาะที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/ml ดังนั้นการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรลูกใต้ใบจึงมีประสิทธิภาพมากกว่ามะยม อีกทั้งเมื่อพิจารณาความสามารถของน้ำต้มสมุนไพรรวมกับน้ำต้มสมุนไพรในส่วนของลูกใต้ใบและมะยม พบว่า สารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรรวมสามารถยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 (ภาพที่ 2 และ 3) และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 (ภาพที่ 4 และ 5) ได้มากกว่าน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากมะยมและลูกใต้ใบในน้ำต้มสมุนไพรอาจจะให้ผลส่งเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (synergistic effect) ในการต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว โดยการปรับเปลี่ยนส่วนประกอบของน้ำต้มสมุนไพรให้ประกอบด้วยพืชสมุนไพรมะยมและลูกใต้ใบ แล้วทำการเปรียบเทียบผลกับน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน 1 ชนิด และน้ำต้มสมุนไพที่ประกอบด้วยพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงผลการเสริมฤทธิ์ของพืชสมุนไพรมะยมและลูกใต้ใบที่ออกฤทธิ์ในการศึกษาครั้งนี้

ผลการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการลดหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ของสมุนไพรมะยมและลูกใต้ใบที่เป็นส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรในการศึกษานี้ พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งสารหรือกระบวนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ มีความสัมพันธ์กับการพบสารประกอบฟีนอลิกในการเป็นส่วนประกอบทางชีวภาพ (bioactive compounds) หลักที่อยู่ในสารสกัด โดยสารสกัดจากมะยมในส่วนของใบหรือผลจะประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟลาโนวอยด์ (flavonoids) เช่น เควอซิทิน (quercetin) และแคมพ์เฟอรอล (kaempferol) เป็นต้น (Kumar *et al.*, 2017; Tram & Cuong, 2016) ในการส่งผลให้มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ การอักเสบ และการเจ็บปวด รวมถึงการลดการหลั่งสารไนตริกออกไซด์ (Chakraborty *et al.*, 2012; Ghafar *et al.*, 2018) ในขณะที่สารสกัดจากลูกใต้ใบในส่วนที่อยู่เหนือดิน ใบ และในทุก ๆ ส่วน ก็ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) กรดแกลลิค (gallic acid) และลิกแนนส์ (lignans) รวมถึงสารในกลุ่มฟลาโนวอยด์ (ควอซิทิน แคมพ์เฟอรอล และแอนโทรไซยานิน (anthocyanins)) เป็นต้น (Kumar *et al.*, 2017; Mamza *et al.*, 2012) ในการเป็นสารประกอบหลักที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ และการเจ็บปวด (Alagan *et al.*, 2019; Harikrishnan *et al.*, 2018; Karuna *et al.*, 2009) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารในกลุ่มนี้ของน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่นทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการอักเสบในการศึกษานี้ผ่านการลดการหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 อีกทั้งจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 (ภาพที่ 2 และ 3) และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 (ภาพที่ 4 และ 5) ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้มากกว่าน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนแต่ละชนิด อาจเนื่องมาจากน้ำต้มสมุนไพรประกอบด้วยสารประกอบฟีอลิกทั้งในส่วนของมะยมและลูกใต้ใบ ซึ่งมีมากกว่าน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน จึงส่งผลให้น้ำต้มสมุนไพรสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบผ่านการลดการหลั่งสาร PGE_2 ได้ดีกว่าน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วน อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันผลของสารประกอบฟีนอลิกในการเป็นสารประกอบทางชีวภาพที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว ควรทำการศึกษาแยกชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำต้มสมุนไพรด้วยเทคนิค high performance

liquid chromatography (HPLC) หรือ gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) เพิ่มเติมต่อไป ทั้งนี้ ความสามารถในการยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจของน้ำต้มสมุนไพร น้ำต้มลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 100-400 µg/ml และน้ำต้มมะยมที่ความเข้มข้น 200-400 µg/ml พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการลดการหลั่งสาร PGE_2 ในเซลล์แมคโครฟาจของสารสกัดจากใบมะยมที่สกัดด้วยเมทานอลในความเข้มข้น 200-300 µg/ml (Hossen *et al*., 2015) และสารสกัดจากลูกใต้ใบในทุก ๆ ส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล/น้ำ และเฮกเซนในความเข้มข้น 100 และ 125 µg/ml ตามลำดับ (Kiemer *et al*., 2003) รวมถึงที่สกัดด้วยเอทานอลในความเข้มข้น 30-60 µg/ml (Harikrishnan *et al*., 2018) ในขณะที่สารสกัดจากเตยหอมในการศึกษานี้และการศึกษาก่อนหน้าก็ไม่พบความสามารถในการยับยั้งการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์แมคโครฟาจเช่นเดียวกัน ซึ่งการศึกษาก่อนหน้ามีการรายงานผลเฉพาะความสามารถของสารสกัดจากเตยหอมในการต้านอนุมูลอิสระเท่านั้น (Ibrahim & Adniruddin, 2018; Suwannakul *et al*., 2018) จึงบ่งชี้ได้ว่าการต้านการอักเสบของสารสกัดจากน้ำต้มสมุนไพร และน้ำต้มสมุนไพรแยกส่วนมะยมและลูกใต้ใบในการศึกษานี้มีฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกันกับการศึกษาก่อนหน้าในการยับยั้งกลไกการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น

PGE_2 เป็นสารสื่อกลางทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของร่างกายประเภทหนึ่ง โดยจะมีผลทำให้หลอดเลือดภายในระบบไหลเวียนโลหิตเกิดการขยายตัว และเพิ่มความสามารถของสารน้ำในการซึมผ่านผนังหลอดเลือดไปสู่เนื่อเยื่อภายในอวัยวะต่าง ๆ ส่งผลให้อวัยวะดังกล่าวเกิดความเสียหายจนเกิดพยาธิสภาพแล้วทำให้เกิดโรคในที่สุด (Gomez *et al*., 2013; Kawahara *et al*., 2015) กลไกการสร้างและหลั่งสาร PGE_2 นี้พบว่าเกิดขึ้นจากการกระตุ้นเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น โมโนไซต์ และแมคโครฟาจ เป็นต้น จากสิ่งแปลกปลอมที่ได้รับมาจากภายนอกร่างกาย หรือสารภายในร่างกายที่มีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ดังกล่าว (Gomez *et al*., 2013; Serhan *et al*., 2015) โดยส่งผลให้มีการย่อยฟอสโฟลิปิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอทู ให้กลายเป็นกรดไขมันอะราชิโดนิก จากนั้นเอนไซม์ COX ทั้งชนิด COX-1 และ COX-2 จะทำหน้าที่เปลี่ยนกรดไขมันอะราชิโดนิกดังกล่าวให้เกิดเป็นสารพรอสตาแกลนดิน ซึ่งมีด้วยกันหลายประเภท ได้แก่ PGE_2, PGD_2, PGF_2 และ PGI_2 อย่างไรก็ตาม PGE_2 พบว่าเป็นสารที่พบได้มากที่สุดและทำหน้าที่หลักในกระบวนการอักเสบของร่างกายมนุษย์ (Park *et al*., 2006; Serhan & Levy, 2003) ดังนั้น ความสามารถในการลดการสร้างและหลั่งสาร PGE_2 จึงถือกลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งในการต้านการอักเสบที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดความรุนแรงของโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าว เช่น โรคเบาหวาน หรือข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น โดยยาที่ใช้ยับยั้งกระบวนการอักเสบหรือลดความรุนแรงของโรคดังกล่าวนี้ในปัจจุบันทั้งที่เป็นแบบสเตียรอยด์ (steroid) และไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroid) เช่น แอสไพริน (aspirin), ไอบูโพรเฟน (ibuprofen) หรือไดโคลฟีแนค (diclofenac) เป็นต้น พบว่ามีการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX โดยเฉพาะ COX-2 ทั้งนี้เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่เกิดการตอบสนองเฉพาะในกรณีที่มีการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ หรือการบาดเจ็บเท่านั้น ในขณะที่ COX-1 จะมีการทำหน้าที่ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่มีการกระตุ้น (Gomez *et al*., 2013; Kawahara *et al*., 2015) ดังนั้น การลดการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในการเปลี่ยนกรดไขมันอะราชิโดนิกให้เป็นสาร PGE_2 จึงถือว่ามีบทบาทสำคัญในการต้านกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์อย่างจำเพาะ โดยวิถีการส่งสัญญาณ

(signaling pathway) ให้เกิดการกระตุ้นการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในการทำให้เกิดการหลั่งสาร PGE_2 ของเซลล์แมคโครฟาจ พบว่า เกิดขึ้นจากการส่งสัญญาณภายในเซลล์หลายวิถีด้วยกัน เช่น วิถีการส่งสัญญาณของ NF-ΚB, MAPK และ β-catenin เป็นต้น (Robertson, 2017; Sun & Li, 2018) จากผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบความสามารถของน้ำต้มสมุนไพรในการลดการหลั่งสาร PGE_2 ผ่านการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จึงอาจจะมีกลไกมาจากการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถีของ NF-ΚB และ MAPK ทั้งนี้เนื่องมาจากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากมะยมและลูกใต้ใบสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนในวิถีการส่งสัญญาณของ NF-ΚB เช่น IΚB-α, Src, Syk เป็นต้น รวมถึงวิถีการส่งสัญญาณของ MAPK เช่น ERK1/2, JNK และ p38 เป็นต้น (Harikrishnan *et al.*, 2018; Hossen *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถีต่าง ๆ ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรยังขึ้นอยู่กับส่วนประกอบทางชีวภาพหลักในพืชสมุนไพรนั้น ๆ ด้วย ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ทั้งนี้ ผลการศึกษาในครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของน้ำต้มสมุนไพรในการยับยั้งกระบวนการหลั่งสาร PGE_2 อาจจะส่งผลทำให้มีการต่อยอดนำน้ำต้มสมุนไพรที่ประกอบด้วยมะยมและลูกใต้ใบมาประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการเป็นทางเลือกสำหรับการลดอาการอักเสบในโรคต่าง ๆ ทดแทนการใช้ยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบันที่มีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์และต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตาม อาจต้องมีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านการอักเสบของน้ำต้มสมุนไพรกับยาต้านการอักเสบแผนปัจจุบันก่อนที่จะมีการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์น้ำต้มสมุนไพรดังกล่าวสำหรับต้านอาการอักเสบกับผู้ป่วยในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

น้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาชาวบ้าน ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา ที่ประกอบด้วยสมุนไพรมะยม ลูกใต้ใบ และเตยหอม พบว่าไม่ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ และสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ผ่านการลดการหลั่งสาร PGE_2 และการทำหน้าที่ของเอนไซม์ COX-2 ได้ในความเข้มข้นตั้งแต่ 100-400 µg/ml ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัด โดยส่วนประกอบในน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ทำหน้าที่หลักในการออกฤทธิ์ผ่านกลไกดังกล่าว คือ สมุนไพรลูกใต้ใบ และมะยม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าน้ำต้มสมุนไพรภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ประกอบด้วยลูกใต้ใบ และมะยม สามารถนำมาประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการลดการอักเสบที่เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดความรุนแรงของโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแหล่งทุนสนับสนุนการทำวิจัย มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย นิสิตปริญญาตรีสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ในรายวิชาภาคนิพนธ์ และสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นต่าง ๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Alagan A., Jantan I., Kumolosasi E., Ogawa S., Abdullah M. A., & Azmi N. (2019). Protective effects of Phyllanthus amarus against lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in rats. *Frontiers in Pharmacology, 10*, 632-643.

Bezugla Y., Kolada A., Kamionka S., Bernard B., Scheibe R., & Dieter P. (2006). COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 79*(1-2), 93-100.

Buckley C. D., Gilroy D. W., & Serhan C. N. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity, 40*(3), 315-327.

Chakraborty R., Biplab D., Devanna N., & Sen S. (2012). Antiinflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of Phyllanthus acidus L. extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2*(2), S953-S961.

Dandona P., & Aljada A. (2002). A rational approach to pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology, 90*(5A), 27G-33G.

Díaz-Muñoz M. D., Osma-García I. C., Fresno M., & Iñiguez M. A. (2012). Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochemical Journal, 443*(2), 451-461.

Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A. J., & Paquot N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice, 105*(2), 141-150.

Ghafar S. Z. A., Mediani A., Ramli N. S., & Abas F. (2018). Antioxidant, **α**-glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of Phyllanthus acidus and LC–MS/MS profile of the active extract. *Food Bioscience, 25*, 134-140.

Gomez I., Foudi N., Longrois D., & Norel X. (2013). The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 89*(2-3), 55-63.

Harikrishnan H., Jantan I., Haque M. A., & Kumolosasi E. (2018). Anti-inflammatory effects of Phyllanthus amarus Schum. & Thonn. through inhibition of NF-**K**B, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 18*(1), 224-236.

Hossain M. S., Akter S., Begum Y., & Bulbul I. J. (2016). Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic leaf extract of Phyllanthus acidus L. on swiss Albino mice. *European Journal of Medicinal Plants*, *13*(1), 1-10.

Hossen M. J., Jeon S. H., Kim S. C., Kim J. H., Jeong D., Sung N. Y., Cho J. Y. (2015). In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of Phyllanthus acidus methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology, 168*, 217-228.

Ibrahim U. K., & Adniruddin A. (2018). Antioxidant activity of fresh and dried extracted herbs mixture of Psidium guajava, Pteridophytes, Cymbopogon, and Pandanus amaryllifolius. *Malaysian Journal of Chemical Engineering & Technology, 1*, 8–13.

Karuna R., Reddy S. S., Baskar R., & Saralakumari D. (2009). Antioxidant potential of aqueous extract of Phyllanthus amarus in rats. *Indian Journal of Pharmacology, 41*(2), 64-67.

Kawahara K., Hohjoh H., Inazumi T., Tsuchiya S., & Sugimoto Y. (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et Biophysica Acta, 1851*(4), 414-421.

Kiemer A. K., Hartung T., Huber C., & Vollmar A. M. (2003). Phyllanthus amarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-**K**B pathway. *Journal of Hepatology*, *38*(3), 289-297.

Kiran P. M., & Rao B. G. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of different extracts and isolated lignans of Phyllanthus amarus Schum. & Thonn. Aerial parts. *International Journal of Pharma and Bio Sciences, 4*, 803-808.

Kumar S., Singh A., & Kumar B. (2017). Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of Phyllanthus species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis, 7*(4), 214-222.

Li J., Zhang N., Ye B., Ju W., Orser B., Fox J. E., . . . Lu W. Y. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase insulin release from beta cells by inhibiting ATP-sensitive potassium channels. *British Journal of Pharmacology, 151*(4), 483-493.

Lontchi-Yimagou E., Sobngwi E., Matsha T. E., & Kengne A. P. (2013). Diabetes mellitus and inflammation. *Current Diabetes Reports, 13*(3), 435-444.

Mamza U., Sodipo O., & Khan I. (2012). Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis of bioactive components of Phyllanthus amarus leaves. *International Research Journal of Plant Science*, *3*(10), 208-215.

Ofuegbe S. O., Adedapo A. A., & Adeyemi A. A. (2014). Anti-inflammatory and analgesic activities of the methanol leaf extract of Phyllanthus amarus in some laboratory animals. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 25*(2), 175-180.

Park J. Y., Pillinger M. H., & Abramson S. B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology, 119*(3), 229-240.

Pollack R. M., Donath M. Y., Leroith D., & Leibowitz G. (2016). Anti-inflammatory agents in the treatment of diabetes and its vascular complications. *Diabetes Care,* 39 *Suppl* 2, S244-252.

Robertson R. P. (2017). The COX-2/PGE2/EP3/Gi/o/cAMP/GSIS pathway in the islet: the beat goes on. *Diabetes, 66*(6), 1464-1466.

Serhan C.N., Chiang N., Dalli J., & Levy B.D. (2015). Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7*(2), a016311- a016330.

Serhan C.N., & Levy B. (2003). Success of prostaglandin E2 in structure–function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 100*(15), 8609-8611.

Serhan C.N., Yacoubian S., & Yang R. (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annual Review of Pathology, 3*, 279-312.

Sostres C., Gargallo C. J., & Lanas A. (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Research & Therapy, 15 Suppl* 3, S3- S10.

Sowers J. R., White W. B., Pitt B., Whelton A., Simon L. S., Winer N. (2005). The Effects of cyclooxygenase-2 inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory therapy on 24-hour blood pressure in patients with hypertension, osteoarthritis, and type 2 diabetes mellitus. *Archives of Internal Medicine, 165*(2), 161-168.

Sun X., & Li Q. (2018). Prostaglandin EP2 receptor: Novel therapeutic target for human cancers. *International Journal of Molecular Medicine, 42*(3), 1203-1214.

Suwannakul S., Chaibenjawong P., & Suwannakul S. (2018). Antioxidant Anti-Cancer and Antimicrobial Activities of Ethanol Pandanus amaryllifolius Roxb. leaf extract (In Vitro)-A potential medical application. *Journal of International Dental and Medical Research, 11*(2), 383-389.

Tram N. C. T., & Cuong N. M. (2016). Kaempferol and kaempferol glycosides from Phyllanthus acidus leaves. *Vietnam Journal of Chemistry, 54*(6), 790-804.

Vonkeman H. E., & Van De Laar M. A. (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Seminars in Arthritis and Rheumatism, 39*(4), 294-312.