

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดน้ำและเอทานอลจากนกคุ้มไฟ (<i>Anoectochilus burmannicus</i>)	
ผู้เขียน	นางสาว พัทธวรรณ บุตรหลวง	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	อ.ดร. พริสริ พิกการ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	อ.ดร. อริสา บอนเนซซ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การอักเสบเป็นการตอบสนองทางชีวภาพของร่างกายมนุษย์เพื่อป้องกันร่างกายจากการบาดเจ็บและการติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม อนุมูลอิสระเป็นตัวกลางในการเกิดอักเสบเรื้อรังและนำไปสู่ผลข้างเคียงที่รุนแรงรวมถึง โรคเมอเร็ง โรคทางเมตาบอลิซึม และโรคเบาหวาน ปัจจุบันหลายการศึกษาได้ระบุว่าภาวะอ้วนได้เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในเนื้อเยื่อไขมัน โดยเซลล์แมโครฟาจมีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบของเซลล์ไขมัน จากนั้นสารก่อการอักเสบหลายชนิดโดยเฉพาะทีเอ็นเอฟ-แอลฟาสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลินในเซลล์ไขมัน การป้องกันและการรักษาการดื้อต่ออินซูลินจึงเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน พืชหลายชนิดมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในการต้านโรคเบาหวานจึงมีการใช้เป็นการแพทย์ทางเลือกในปัจจุบัน กล้วยไม้ในวงศ์นกคุ้มเช่น *Anoectochilus roxburghii* และ *Anoectochilus formosanus* มีบทบาทในการต้านการอักเสบและต้านการดื้อต่ออินซูลิน แต่กระนั้นกล้วยไม้นกคุ้มไฟ (*Anoectochilus burmannicus*) ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากล้วยไม้นกคุ้มไฟต่อการต้านการอักเสบในเซลล์แมโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วยแอลพีเอสและฤทธิ์ด้านการดื้ออินซูลินในเซลล์ไขมันที่เหนี่ยวนำด้วยทีเอ็นเอฟ-แอลฟา

สารสกัดกล้วยไม้นกคุ้มไฟถูกเตรียมโดยการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยได้สารสกัดหยาบน้ำ 16.79 เปอร์เซ็นต์ และสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ได้สารสกัดหยาบเอทานอล 17.37 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ผลการทดลองพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดน้ำและเอทานอลมีปริมาณ 19.09 ± 1.18 และ

6.82±0.62 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าสารสกัดน้ำมี กรควานิลลิก กรดคูมาลิก กรดเฟอรูลิก และ กรดโคโรจินิก ปริมาณสูงกว่าสารสกัดเอธานอลยกเว้น โคโรจินิก ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำและเอธานอลด้วยวิธีดีพีพีเอช พบว่าสารสกัดน้ำและเอธานอลที่ความเข้มข้น 4,551±357 และ 7,506±832 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสารสกัดน้ำและเอธานอลที่ความเข้มข้น 421±30 และ 834±58 สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระเอบีทีเอสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ต่อมาศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดด้วยวิธีดับบิวเอสที-1 จากนั้นศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ด้านการคืออินซูลินในเซลล์แมคโครฟาจ อาร์เอดับบิว 264.7 และ เซลล์ไขมัน 3T3-แอล1 โดยการเหนี่ยวนำด้วยแอลพีเอสและทีเอ็นเอฟ-แอลฟาในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า ทั้งสารสกัดน้ำและสารสกัดเอธานอลสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้สารสกัดน้ำที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนไนตริกออกไซด์ซินเทสและยับยั้งยีนได้เพียงเล็กน้อย ในขณะที่สารสกัดเอธานอลสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนและยีนไนตริกออกไซด์ซินเทสได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้สารสกัดน้ำสามารถยับยั้งการอักเสบโปรตีนอินเตอร์ลิวคิน-6 ได้เพียงเล็กน้อยในขณะที่สารสกัดเอธานอลสามารถยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดน้ำและเอธานอลสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้าและอินเตอร์ลิวคิน-6 อย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่มีผลต่อยีนทีเอ็นเอฟ-แอลฟา นอกจากนี้สารสกัดเอธานอลสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนและยีนไซโตไคน์ซีเจเนส-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญในขณะที่สารสกัดน้ำลดได้เพียงเล็กน้อยในระดับยีนแต่ไม่มีผลในระดับโปรตีน ต่อมาเมื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการคืออินซูลินในเซลล์ไขมัน 3T3-แอล1 พบว่าเซลล์ไขมันที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีทีเอ็นเอฟ-แอลฟาเพียงอย่างเดียวสามารถลดการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อบ่มด้วยสารสกัดหลังจากเหนี่ยวนำด้วยทีเอ็นเอฟ-แอลฟาพบว่าสารสกัดน้ำและเอธานอลที่ความเข้มข้น 50 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถเพิ่มการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ให้กลับคืนเหมือนระดับปกติได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ทั้งสารสกัดน้ำและสารสกัดเอธานอลไม่มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียสจากมนุษย์แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจะมีความปลอดภัยในการศึกษาในสัตว์ทดลองและทางคลินิกในอนาคต

ท้ายสุดนี้ งานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าที่ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำและเอธานอลของนกคุ้มไฟ (*Anoectochilus burmannicus*) ต่อการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และด้านการคืออินซูลินเมื่อเหนี่ยวนำด้วยการอักเสบ การศึกษานี้จึงเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่

พิสูจน์ว่าสารสกัดน้ำและเอธานอลสามารถยับยั้งการอักเสบและการติดเชื้อในซูลินและสามารถพัฒนาสารสกัดเพื่อเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน ส่วนประกอบของอาหาร หรืออาหารเสริมเพื่อป้องกันการอักเสบที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรื้อรังรวมไปถึงโรคเบาหวานชนิดที่ 2 การศึกษาในอนาคตอาจศึกษาถึงสารสำคัญและกลไกของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Anti-inflammatory Activities of Aqueous and Ethanolic Extracts from <i>Anoectochilus burmannicus</i>	
Author	Miss Phatcharaporn Budluang	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Advisory Committee	Lect.Dr. Pornsiri Pitchakarn	Advisor
	Lect.Dr. Arisa Bonness	Co-advisor

ABSTRACT

Inflammation is a complex biological response of human body tissues to generally protect our body from injury and infection; however, chronic inflammation which is mediated by free radicals could lead to serious adverse effects including cancer, metabolic syndromes, and diabetes mellitus. Currently, a number of studies have demonstrated the obesity-induced chronic local inflammation in adipose tissue, which is also triggered by macrophages. Subsequently, several inflammatory cytokines, especially tumor necrosis factor- α (TNF- α) could induce the insulin resistance in adipocytes. Prevention or treatment of insulin resistance would be beneficial to diabetic patients. A variety of medicinal plants with anti-diabetic activity have been used as alternative medicine. *Anoectochilus* species such as *Anoectochilus roxburghii* and *Anoectochilus formosanus* have exerted both anti-inflammation and anti-insulin resistance effects. Yet, the bioactivities of *Anoectochilus burmannicus* (AB) remain unknown. This study therefore aimed to determine whether AB inhibits inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) and TNF- α in Raw 264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes, respectively.

Whole plant extract of AB was prepared using hot water or 80% ethanol. The yields of crude AB aqueous extract (ABAE) and AB ethanolic extract (ABEE) were 16.79% and 17.37%, respectively. Phytochemical composition analysis revealed more total phenolic contents in ABAE (19.09 ± 1.18 mg/g extract) than ABEE (6.82 ± 0.62 mg/g

extract). Using HPLC, several phenolic derivatives were found that ABAE has more contents of vanillic acid, coumaric acid and ferulic acid, but less content of chlorogenic acid than ABEE. ABAE and ABEE exhibited free radical scavenging effect with SC_{50} determined by DPPH assay at $4,551 \pm 357$ and $7,506 \pm 832$ $\mu\text{g/mL}$, respectively, and SC_{50} by ABTS assay at 421 ± 30 and 834 ± 58 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Next, cytotoxicity of the extracts was determined using WST-1 assay, their anti-inflammatory activity using LPS-induced RAW 264.7 macrophages, and the anti-insulin resistant activity using $\text{TNF-}\alpha$ -treated 3T3-L1 adipocytes. The results showed that the extracts at the concentration up to 200 $\mu\text{g/mL}$ were not toxic to both RAW 264.7 and 3T3-L1 cells. ABAE and ABEE significantly inhibited the nitric oxide (NO) production in LPS-activated macrophages in a dose-dependent manner. Moreover, ABAE (200 $\mu\text{g/mL}$) markedly reduced the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein, and slightly decreased its mRNA expression in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Unlike ABAE, ABEE at lower dose (50 $\mu\text{g/mL}$) significantly inhibited the LPS-stimulated expression of iNOS at both protein and mRNA levels. In addition, ABAE slightly, while ABEE significantly reduced the LPS-induced protein expression of pro-inflammatory cytokine, interleukin-6 (IL-6). Both extracts significantly inhibited the LPS-induced mRNA expression of IL-6 and interleukin-1 β (IL-1 β) but not $\text{TNF-}\alpha$. ABEE significantly decreased both mRNA and protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), whereas ABAE slightly decreased the mRNA, but not protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Next, the model of inflammation-induced insulin resistance in obesity was performed *in vitro* by treating 3T3-L1 adipocytes with $\text{TNF-}\alpha$ leading to the reduction of glucose uptake by approximately 50%. ABAE and ABEE (50 and 200 $\mu\text{g/mL}$) significantly improved the insulin response of 3T3L-1 by increasing the cellular uptake of glucose. Furthermore, these extracts showed no cytotoxicity to normal human peripheral mononuclear cells (PBMCs) suggesting the extracts might be safe for further investigation in animal and clinical studies.

In conclusion, the present study demonstrated apparently for the first time biological effects of the ABAE and ABEE against oxidative stress, inflammation and inflammation-induced insulin resistance. Inhibition of inflammation together with reduction of inflammation-stimulated insulin resistance by *A. burmannicus* extracts

would be scientifically support usage and development of the extracts as folk medicine, food ingredient or food supplement for prevention of inflammation-related chronic diseases including diabetes mellitus type 2. Further studies should investigate the bioactive components in ABE and to provide an insight into the accuracy mechanisms of these actions.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved