วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 29 ฉบับที่ 6 พฤศจิกายน - ธันวาคม 2563

Journal of Health Science
Vol. 29 No. 6, November - December 2020

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original article*

ผลของสารสกัดจากใบมะรุมต่อ Interleukin-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นการอักเสบด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์

ภัทธิยากร เทสันตะ วท.บ.
จิราพร ละภิล้า วท.บ.
ฐิติยา ลือตระกูล วท.บ., วท.ม.
กาญจนา อู่สุวรรณทิม วท.บ., วท.ม., ปร.ด.
ยอดหทัย ทองศรี วท.บ., วท.ม., ปร.ด.
พาชื่น โพทัพ วท.บ., วท.ม., ปร.ด.
หน่วยวิจัยภูมิคุ้มกันระดับเซลล์และโมเลกุล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

วันรับ: 27 มิ.ย. 2562
วันแก้ไข: 26 ก.ย. 2562
วันตอบรับ: 16 ต.ค. 2562

บทคัดย่อ การอักเสบเป็นผลจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามากระตุ้นร่างกายโดยเกิดจากการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันซึ่งจะทำให้มีการหลั่ง pro-inflammatory cytokine เช่น tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β และ IL-6 อาจส่งผลกระทบให้เกิดการอักเสบในร่างกาย โดยการรักษาการอักเสบส่วนใหญ่จะใช้ยาประเภท non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) และยาสเตียรอยด์ การใช้ยาเหล่านี้อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดธรรมชาติที่ได้จากใบมะรุมต่อการต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ที่พัฒนาเป็นแมคโครฟาจและได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยสารสกัดลิโปโพลีแซคคาไรด์จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมลบ โดยศึกษาการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ที่เซลล์หลั่งออกมาหลังจากได้รับการกระตุ้นให้อยู่ในภาวะอักเสบด้วยสารลิโปโพลีแซคคาไรด์ จากนั้นเซลล์จะได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุม ซึ่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน IL-6 โดยใช้เทคนิค quantitative reverse transcription-PCR และระดับการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ในสภาวะควบคุม ผลการวิจัยพบว่าการรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุมสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน IL-6 และลดระดับไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจหลังจากที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยสารลิโปโพลีแซคคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถลดการสร้างสารไซโตไคน์ชนิด IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารลิโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งอาจนำความรู้ต่อยอดจากงานวิจัยนี้ไปพัฒนาสารสกัดธรรมชาติที่มาจากใบมะรุมไปเป็นยาลดการอักเสบต่อไป

คำสำคัญ: **ไซโตไคน์; มะรุม; แมคโครฟาจ; ลิโปโพลีแซคคาไรด์; ฤทธิ์ต้านการอักเสบ**

บทนำ

การอักเสบเป็นผลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสิ่งเร้า หรือสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส รา ที่เข้ามาก่อโรคในร่างกาย ขณะเดียวกันการอักเสบสามารถเกิดขึ้นได้จากโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นอยู่แล้วในร่างกายผู้ป่วย การกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคจะทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์กลุ่มที่ส่งผลให้เกิดการอักเสบต่อเนื้อเยื่อ (pro-inflammatory cytokine) เช่น tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β และ interleukin-6 (IL-6) ซึ่งมีฤทธิ์ทำหน้าที่ในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้ทำหน้าที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมให้ออกไปจากร่างกาย แต่ขณะเดียวกันส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อใกล้เคียงบริเวณที่มีการเข้ามาของเชื้อโรคต่าง ๆ หรือในบริเวณที่มีการบาดเจ็บ ซึ่งหากมีการอักเสบเกิดขึ้นมากเกินไปและเกิดอย่างต่อเนื่องจะส่งผลเสียต่อร่างกายและสามารถก่อให้เกิดโรคอื่น ๆ ตามมา[1,2] IL-6 เป็นไซโตไคน์สำคัญที่สร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์กระดูก ซึ่งมีฤทธิ์หลายอย่าง ได้แก่ กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของ B cell กระตุ้นการพัฒนาของ T cell กระตุ้นการสร้าง acute phase protein ในตับ กระตุ้นการสร้างกระดูกและหลอดเลือด รวมทั้งเพิ่มการขยายตัวของหลอดเลือด นอกจากนี้ IL-6 ยังทำให้มีการอักเสบของเนื้อเยื่อในร่างกายได้อีกด้วย ตัวอย่างของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น โรคติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส โรคข้ออักเสบ โรครูมาตอยด์ โรคหอบหืด เป็นต้น[3] นอกจากนี้หากมีการอักเสบเรื้อรังจะทำให้มีโอกาสพัฒนาเป็นโรคมะเร็งได้อีกด้วย[4] จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกรายงานว่าหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในประชากรโลก มีสาเหตุมาจากโรคในกลุ่มไม่ติดต่อซึ่งรวมถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังโดยเฉพาะโรคมะเร็ง[5,6]

ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการรักษาอาการอักเสบซึ่งเป็นอาการที่สำคัญของโรคเหล่านี้ การควบคุมการอักเสบเพื่อลดอาการรุนแรงของโรคด้วยการใช้ยาต้านการอักเสบ เช่น ยาที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) และยา สเตียรอยด์ ยาเหล่านี้มักเป็นยาที่สังเคราะห์ขึ้นมาและอาจมีฤทธิ์ส่งผลกระทบข้างเคียงต่อร่างกาย เช่น มีอาการเวียนศีรษะ อาเจียน หายใจติดขัด ความดันโลหิตสูงขึ้น นอกจากนี้ยังอาจส่งผลเสียต่อไตและระบบหมุนเวียนของเลือด หากมีการใช้ยาเหล่านี้เป็นระยะเวลายาวนาน[7-8] ดังนั้น เพื่อความปลอดภัยในการรักษาการอักเสบและหลีกเลี่ยงจากยาที่สังเคราะห์ขึ้นที่มีส่วนประกอบทางเคมี โดยการนำพืชและสมุนไพรจากธรรมชาติหลากหลายชนิดมาใช้รักษาอาการอักเสบดังกล่าวที่เกิดขึ้นในร่างกาย ปัจจุบันมีหลายงานวิจัยค้นพบว่าส่วนประกอบต่าง ๆ ของมะรุม เช่น ราก เมล็ด ฝัก และใบ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน[3] และมีคุณประโยชน์ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น[9] เนื่องจากในมะรุมมีสารประกอบสำคัญที่มีประโยชน์อีกมากมาย และเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยซึ่งมักใช้เป็นอาหารรับประทานและยังใช้เป็นส่วนประกอบของยาแผนโบราณ

ซึ่งคณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุมในการรักษาการอักเสบของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (lipopolysaccharide, LPS) โดยศึกษาการแสดงออกของยีนและระดับการหลั่งโตไคน์ชนิด IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่พัฒนามาจากโมโนไซต์ของมนุษย์ งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค quantitative reverse transcription (qRT) - PCR และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในการตรวจวิเคราะห์หาระดับของการแสดงออกของยีนและโปรตีนตามลำดับ ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนของ IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS

วิธีการศึกษา

การสกัดสารจากใบของมะรุม

นำใบมะรุมแห้งที่บดละเอียดแล้ว จำนวน 2 กิโลกรัม

มาหมักด้วยเฮกเซน 99% (RCI Labscan Limited, Thailand) ปริมาณ 5 ลิตร แล้วนำมาระเหยโดยเครื่อง rotary evaporator (Heidolph, Germany) ซึ่งจะได้ส่วนสารที่อยู่ในเฮกเซน ปริมาณ 44 กรัม จากนั้นจึงนำกากที่ได้จากการระเหยมาสกัดโดยหมักด้วยเอทิลแอซีเทต 99.8% (RCI Labscan Limited, Thailand) ปริมาณ 5 ลิตร แล้วจึงนำมาระเหยเอทิลแอซีเทตด้วยเครื่อง rotary evaporator จึงได้ส่วนสารที่อยู่ในเอทิลแอซีเทต (crude EtOAc) ปริมาณ 53 กรัม จากนั้นจึงนำส่วนที่เป็นเอทิลแอซีเทตมาใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตัวอย่างเม็ดเลือดขาวที่ใช้ศึกษา

นำตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจากผู้บริจาคโลหิต ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

การแยกเซลล์โมโนไซต์

นำตัวอย่างเม็ดเลือดขาวมาปั่นเพื่อแยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดง โดยนำตัวอย่างที่ได้มาเจือจางกับบัฟเฟอร์ Hank's balanced salt solution (HBSS) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงนำมาปั่นแยกโดยใช้น้ำยา lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Norway) ด้วยความเร็ว 600 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 25 °C จากนั้นจึงนำส่วนของ peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) มาปั่นล้างด้วย HBSS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 300 x g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นจึงเติม RPMI-1640 ลงไปและนำไปปั่นแยกด้วยน้ำยา Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) ที่ 400 x g เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนของโมโนไซต์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย HBSS ที่ 300 x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำเซลล์มาทดสอบความมีชีวิตโดยผสมเซลล์กับสารละลาย 0.4% trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 นำไปนับด้วย hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงนำเซลล์โมโนไซต์ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย RPMI-1640 ที่มี 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin antibiotic เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะที่มี 5% CO_2 และอุณหภูมิ 37 °C เพื่อให้เซลล์พัฒนาเป็นเซลล์แมคโครฟาจและนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

การตรวจวัดการแสดงออกของ CD marker ของโมโนไซต์

นำเซลล์โมโนไซต์ที่แยกได้ไปทดสอบการแสดงออกของ CD marker บนผิวเซลล์ โดยนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมาปั่นล้างด้วย FACs buffer (PBS, 10% FCS, 1% sodium azide) ที่ความเร็ว 400×g เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม fluorophore conjugated antibody ต่อ CD14 หรือ CD16 (BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA) แล้วนำไป incubate บน orbital shaker ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นล้างด้วย Phosphate-Buffered Saline (PBS) จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนออก แล้วปั่นล้างอีก 2 ครั้ง ดูดส่วนใสออก จากนั้นเติม PBS และนำตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN, USA)[10]

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี neutral red uptake cytotoxicity assay

เป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุมต่อเซลล์แมคโครฟาจ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากใบมะรุมหรือยาแอสไพริน โดยการเจือจางสารสกัดจากใบมะรุมหรือยาแอสไพรินที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ถึง 10,000 µg/ml จากนั้นนำเซลล์แมคโครฟาจ ($5x10^4$ cells/wel) มาเลี้ยงใน 96 well plate และ incubate เป็นเวลา 1 คืน และนำมาทดสอบกับสารสกัดจากใบมะรุมและยาแอสไพรินที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้น incubate เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ด้วย Phosphate-Buffered Saline (PBS) จากนั้นทดสอบความมีชีวิตโดยการย้อมสี neutral red (Merck, Germany) เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งสี neutral red จะเข้าไปย้อมติด ไลโซโซม (lysosome) ของเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้น incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วดูดส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วเติม acid alcohol (1% acetic acid, 50% EtOH, DI water) เพื่อละลายสีออกจากเซลล์ และอ่านผลด้วย ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร

การทดสอบเซลล์แมคโครฟาจในสภาวะต่าง ๆ

นำเซลล์แมคโครฟาจที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์เป็นเวลา 7 วัน โดยสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ที่มีการพัฒนาเป็นเซลล์แมคโครฟาจ แล้วจึงนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใน 24-well tissue culture plate จำนวน $2x10^5$ เซลล์ต่อหลุม เพื่อที่จะทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบมะรุม โดยความเข้มข้นของสารสกัดจากใบมะรุมและยาแอสไพรินจะใช้ความเข้มข้นที่อยู่ในระดับที่เป็นพิษกับเซลล์แมคโครฟาจน้อยที่สุดคือที่ระดับของ lethal concentration 5 (LC_5) ซึ่งได้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยจะกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml[11] เป็นเวลา 12 ชั่วโมงซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ จากนั้นนำเซลล์ที่อักเสบนี้ทดสอบกับสารสกัดจากใบมะรุมเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยสภาวะที่ใส่ยาแอสไพรินซึ่งจะ incubate เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยผลการทดสอบจะเปรียบเทียบกับเซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS และไม่ได้รับการทดสอบด้วยยาและสารสกัด

การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำเซลล์ที่ผ่านการทดสอบในแต่ละสภาวะมาล้างด้วย HPSS 1 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำยา Trizol (Life Technologies Corporation, USA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร incubate เป็นเวลา 5 นาที และใช้ pipette ดูดขึ้นลง เพื่อทำให้เซลล์แตก แล้วนำไปใส่ microcentrifuge tube เติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้ของเหลวในหลอดทดลองแยกเป็น phenol-chloroform phase, interphase และ aqueous phase ดูดชั้น aqueous phase ที่มี RNA ใส่ใน microcentrifuge tube เพื่อตกตะกอน RNA โดยเติม isopropanol ปริมาตร 200 µL ลงไปในหลอดทดลอง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกตะกอน RNA จากนั้นดูดน้ำส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำไปปั่นด้วยความเร็ว 7,500 × g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง พักให้ตะกอน RNA แห้ง แล้วจึงละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำปราศจาก RNase แล้วเก็บตัวอย่าง RNA ไว้ที่ -20°C[12]

การตรวจวัดการแสดงออกของยีน

Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) เป็นการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ คือ ยีน *IL-6* ในการทดสอบตัวอย่าง RNA จะเปลี่ยนให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุดน้ำยา Tetro cDNA Synthesis (Bioline Reagents Limited, London, UK) โดยนำตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้มาผสมกับน้ำยาไพรเมอร์ ($Oligo(dT)_{18}$ Primer) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5x RT Buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร RiboSafe RNase Inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 200 U/ µl Tetro Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ RNase-free water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และนำตัวอย่าง RNA ที่ผสมกับน้ำยาดังกล่าวมาเปลี่ยนให้เป็น cDNA (Reverse transcription) ด้วยเครื่อง thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) โดยจะตั้งค่าอุณหภูมิที่ 45°C เป็นเวลา 30 นาที และที่ 85°C เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นเป็นกระบวนการ qRT-PCR โดยใช้ชุดตรวจ SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline Reagents Limited, London, UK) ซึ่งวิธีการจะนำตัวอย่าง cDNA 5 ไมโครลิตร มาผสมกับน้ำยา PCR ซึ่งประกอบด้วย 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 10 µM forward primer ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร RNase-free water 3.4 ไมโครลิตร ซึ่ง Oligonucleotide primers (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada) ที่มีความจำเพาะต่อยีน *IL-6* และ *Actin beta* (ACTB) (ตารางที่ 1) โดยการจะตรวจวัดปฏิกิริยาด้วย

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR

Gene	Sequence (5' to 3')
Interleukin-6	F : ACT CAC CTC TTC AgA ACg AAT Tg
	R : CCA TCT TTg gAA ggT TCA ggT Tg
Actin beta (ACTB)	F : CAT gTA CgT TgC TAT CCA ggC
	R : CTC CTT AAT gTC ACg CAC gAT

เครื่อง CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) ซึ่งจะตั้งค่าปฏิกิริยา initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที และ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C ตามด้วยปฏิกิริยา annealing และ elongation ที่อุณหภูมิ 60°C จำนวน 45 cycle[13]

การตรวจวัดระดับของไซโตไคน์ที่หลั่งจากแมคโครฟาจ

นำส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากการทดสอบเซลล์แมคโครฟาจในสภาวะต่าง ๆ มาตรวจวัดระดับไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากแมคโครฟาจโดยใช้ชุดทดสอบ Human IL-6/Interleukin-6 ELISA Pair Set (Sino Biological Inc., PA, USA) โดยจะเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไซโตไคน์ IL-6 ที่ก้นหลุมที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจะเป็นขั้นตอนการ Blocking เพื่อป้องกันการรบกวนปฏิกิริยาจากส่วนที่ไม่จำเพาะโดยจะเติม Blocking buffer และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS+0.05% Tween20 จากนั้นเติมส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบ incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะออกด้วย PBS+0.05% Tween20 แล้วจึงเติม detection antibody ที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์โดย incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วย PBS+0.05% Tween20 จากนั้นเติม substrate solution และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติม 2 N H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นจึงนำไปวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติ one-way analysis of variance (one way ANOVA) ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละกลุ่ม โดยมีค่าระดับความน่าเชื่อถือที่ร้อยละ 95

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รหัสโครงการ IRB 927/59

ผลการศึกษา

การทดสอบหาค่าเฉลี่ย และหาร้อยละความมีชีวิตของโมโนไซต์

ปริมาณของโมโนไซต์ที่แยกได้ โดยอาศัยหลักการการย้อมติดสีเซลล์ที่มีชีวิตของ trypan blue พบว่ามีปริมาณโมโนไซต์ 4.84 × 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร และค่าความมีชีวิตร้อยละ 99.69

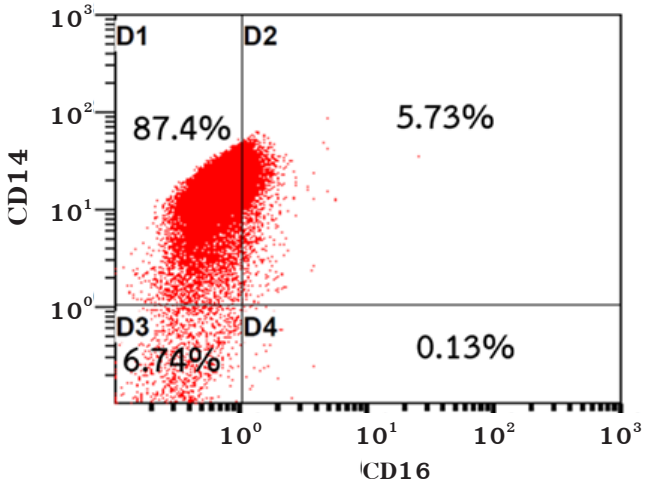
การทดสอบหาร้อยละการแสดงออกของ CD marker บนผิวเซลล์โมโนไซต์

เมื่อนำโมโนไซต์มาย้อมด้วย fluorophore conjugated antibody ต่อ CD14/CD16 โดย CD14 เป็น surface marker ของเซลล์โมโนไซต์ โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer พบว่าค่าการแสดงออกของ CD14 บนผิวเซลล์โมโนไซต์ร้อยละ 93.13 แสดงดังภาพที่ 1 ให้ผลลักษณะการแสดงออกของ surface marker ซึ่งมีความจำเพาะต่อเซลล์โมโนไซต์ จึงแสดงถึงเซลล์ที่แยกได้เป็นโมโนไซต์อย่างแท้จริง

การศึกษารูปร่างของเซลล์

นำเซลล์โมโนไซต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีส่วนผสมของ 10% fetal bovine serum

ภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์โฟลไซโทเมทรีด้วยแอนติบอดี anti-CD14/CD16 ของการแสดงออกของ CD14 บนผิวเซลล์โมโนไซต์ร้อยละ 93.13

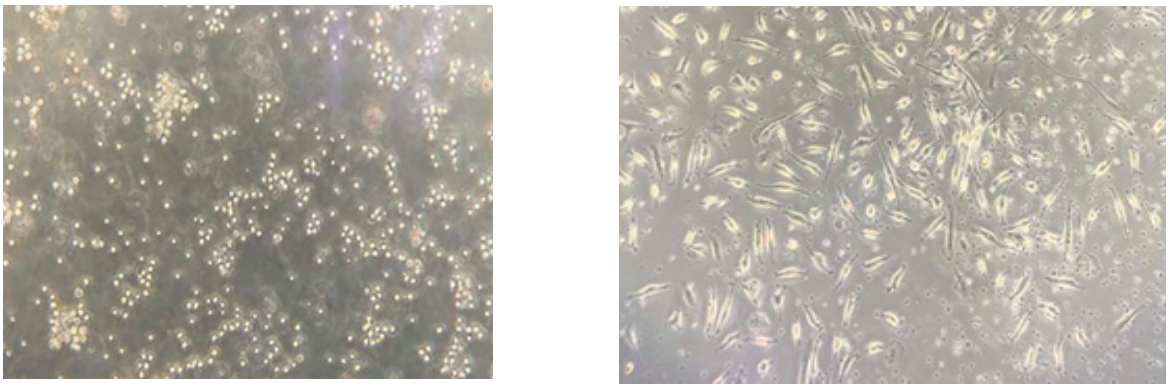


และ 1% penicillin-streptomycin antibiotic ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งจะทำให้เซลล์โมโนไซต์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์โมโนไซต์ที่แยกได้ในวันที่ 1 มีขนาดเล็กและรูปร่างกลมแสดงดังภาพที่ 2A และเซลล์โมโนไซต์ที่พัฒนาเป็นเซลล์แมคโครฟาจในวันที่ 7 พบว่าเซลล์มีรูปร่างเรียวยาว คล้ายกระสวย แสดงดังภาพที่ 2B

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุมและยาแอสไพรินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปทดสอบการต้านการอักเสบ ซึ่งจากการเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดหรือยาแอสไพรินที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ถึง 10,000 µg/ml พบผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุมในความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 50 (LC_{50}) คือความเข้มข้นของสารสกัดที่ 521.19 µg/ml และความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 95 (LC_5) คือความเข้มข้น 26.84 µg/ml แสดงดังภาพที่ 3A ขณะที่ผลการทดสอบความเป็นพิษของยาแอสไพรินในความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 50

ภาพที่ 2 รูปร่างของเซลล์โมโนไซต์มีลักษณะกลมและเกาะติดอยู่ที่ผิวของภาชนะ (A) และเซลล์แมคโครฟาจที่พัฒนามาจากโมโนไซต์เป็นระยะเวลา 7 วัน มีลักษณะยืดยาวออกไปและเกาะติดอยู่ที่ผิวของภาชนะ (B)



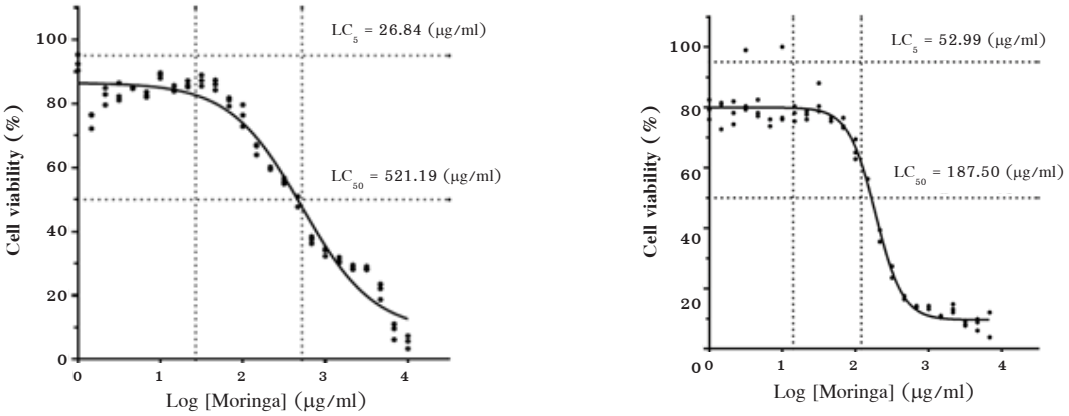
A B

(LC_{50}) คือความเข้มข้นของยาที่ 187.50 µg/ml และความเข้มข้นของยาที่ทำให้แมคโครฟาจมีชีวิตร้อยละ 95 (LC_5) คือความเข้มข้นเท่ากับ 52.99 µg/ml แสดงดังภาพที่ 3B

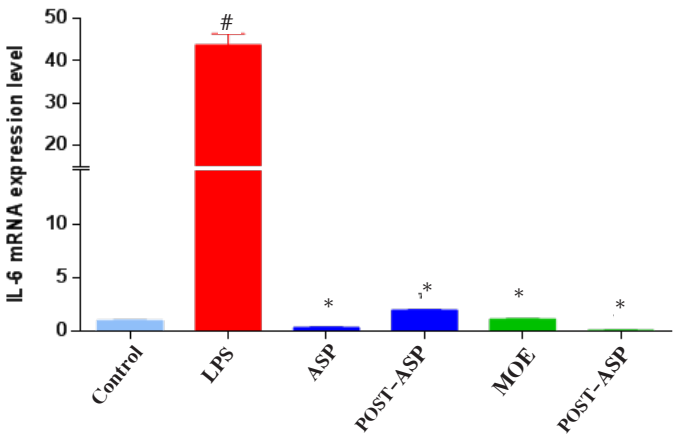
การตรวจวัดการแสดงออกของยีน IL-6 ด้วยวิธี qRT-PCR

นำเซลล์แมคโครฟาจที่ทดสอบในสภาวะต่าง ๆ มาสกัด RNA เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของยีน IL-6 โดยวิธี qRT-PCR ผลการวิเคราะห์พบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS มีระดับการแสดงออกของยีน IL-6 เท่ากับ 43.76±4.4 ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS (กลุ่มควบคุม) ที่มีค่าเท่ากับ 1±0.06 ขณะที่เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS แล้วได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุมมีระดับการแสดงออกของยีน *IL-6* ที่เท่ากับ 0.08±0.02 ซึ่งลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันกับเซลล์ที่ได้รับยาแอสไพรินที่มีค่าการแสดงออกของยีน IL-*6* เท่ากับ 1.97±0.03 แสดงดังภาพที่ 4

ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของสารต่อการมีชีวิตของเซลล์ (dose-response curves) โดยเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารสกัดจากใบมะรุม (A) และยาแอสไพริน (B) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบเซลล์ด้วยวิธี neutral red uptake cytotoxicity assay



ภาพที่ 4 ผลของสารสกัดจากใบมะรุมต่อระดับการแสดงออกของยีน IL-6 โดยเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดจากใบมะรุมมารักษาเป็นเวลา 6 ชั่วโมงและนำเซลล์ไปสกัดแยกสารพันธุกรรมและตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-6 โดยวิธี qRT-PCR. (*, $p<0.05$ as compared with LPS) LPS; lipopolysaccharide, ASP; Aspirin, MOE; Moringa oleifera leaves extract



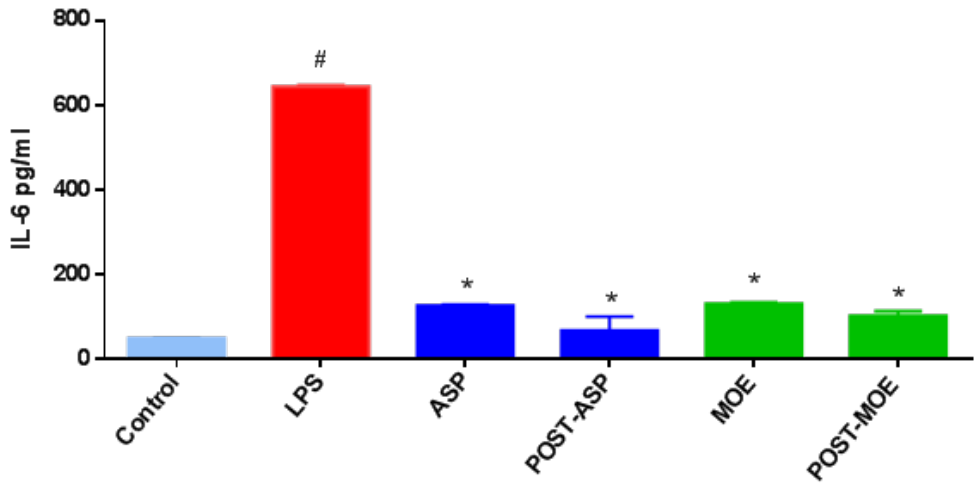
ผลการตรวจวัดระดับการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์แมคโครฟาจด้วยวิธี ELISA

เซลล์แมคโครฟาจที่ทดสอบในสภาวะต่าง ๆ แล้วนำมาเก็บส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) และนำมาตรวจวัดระดับไซโตไคน์ IL-6 ด้วยวิธี ELISA ผลการวิเคราะห์พบว่าในสภาวะที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS มีระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-6 เท่ากับ 643.36±3.93 pg/ml ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุมที่เซลล์ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งมีค่าเท่ากับ 50.6±0.66 pg/ml ขณะที่ในตัวอย่างเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS แล้วได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุมมีระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-6 ที่เท่ากับ 103.11±10.49 pg/ml ซึ่งลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว และให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับเซลล์ที่ได้รับยาแอสไพรินที่มีค่าไซโตไคน์ IL-6 เท่ากับ 49.01±0.61 pg/ml แสดงดังภาพที่ 5

วิจารณ์

มะรุมเป็นพืชที่นิยมปลูกเพื่อเป็นแหล่งอาหาร เนื่องจากเป็นพืชโตเร็ว ปลูกง่ายในเขตร้อน ต้องการอาหารในการเจริญเติบโตน้อย และผลิตใบตลอดทั้งปี[14] จากการศึกษาในปีค.ศ. 2005 พบว่าใบมะรุมอุดมไปด้วยวิตามินซีมากกว่าส้ม 7 เท่า วิตามินเอมากกว่าแครอท 4 เท่า โพแทสเซียมมากกว่ากล้วย 3 เท่า แคลเซียมมากกว่านม 4 เท่า โปรตีนมากกว่าโยเกิร์ต 2 เท่า และยังอุดมไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด[15] นอกจากมะรุมจะใช้เป็นแหล่งอาหารแล้ว ยังมีการนำส่วนต่าง ๆ ของมะรุมมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แผนโบราณในหลายพื้นที่ เช่น เมล็ดใช้เป็นยาขับปัสสาวะ และบำรุงหัวใจ ฝักช่วยลดความดันโลหิตและบรรเทาโรคเบาหวาน รากใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ และบำรุงตับ เปลือกสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย ใบช่วยบำรุงหัวใจและตับ ลดความดันโลหิต เป็นยาขับปัสสาวะ ลดระดับคลอเลสเตอรอล ใช้เป็นยาชูกำลัง[14-15] นอกจากนี้ยังพบว่ามะรุมมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านสารอนุมูลอิสระ

ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดจากใบมะรุมต่อระดับการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 โดยเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร LPS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดจากใบมะรุมมารักษาเป็นเวลา 6 ชั่วโมงและนำส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ไปวัดระดับสารไซโตไคน์ IL-6 โดยวิธี ELISA (* $p<0.05$ as compared with LPS) LPS; lipopolysaccharide, ASP; Aspirin, MOE; Moringa oleifera leaves extract, POST-ASP; post treatment with aspirin, POST-MOE; post treatment with Moringa oleifera leaves extract



ส่งเสริมการแข็งตัวของเลือด ต้านเชื้อรา และต้านเซลล์มะเร็ง[16]

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุมในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจที่พัฒนามาจากโมโนไซต์ของมนุษย์ในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ซึ่งทำให้มีการเพิ่มปริมาณการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-6 โดยได้ทดสอบร่วมกับสภาวะที่เซลล์แมคโครฟาจได้รับการรักษาด้วยยาแอสไพริน โดยมีการทดลองใช้สารสกัดจากใบมะรุมมาทดสอบหลังจากเซลล์มีการอักเสบ (post treatment) แล้วจึงวัดระดับการแสดงออกของยีน IL-6 และวัดระดับการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ที่หลั่งออกมาจากเซลล์

เมื่อเซลล์แมคโครฟาจได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งจะเข้าไปจับกับ Toll-like receptor 4 (TLR-4) แล้วส่งสัญญาณการกระตุ้นผ่านกระบวนการ NF-ΚB pathway โดยจะเติมฟอสเฟตให้กับ IΚB และเกิดกระบวนการ ubiquitination ซึ่งจะมีผลให้ IΚB ถูกย่อยสลาย ทำให้ NF-ΚB ที่ประกอบไปด้วย RelA (p65) และ p50 สามารถเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส เกิดกระบวนการ transcription และ translation ให้มีการสร้าง mRNA และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ โดยไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่หลั่งจากแมคโครฟาจได้แก่ IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 และ TNF-α เป็นต้น[17]

ในการวิจัยนี้หลังจากกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้เกิดการอักเสบด้วย LPS แล้วจึงให้การรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุมกับเซลล์ดังกล่าว เพื่อศึกษาฤทธิ์การลดการอักเสบที่เกิดจาก IL-6 ของสารสกัดจากใบมะรุมโดยวัดระดับสารไซโตไคน์ IL-6 ซึ่งใบมะรุมมีสารสำคัญ คือ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) ที่มีคุณสมบัติลดการอักเสบ โดยลดการทำงานของ transcription factor ได้แก่ NF-ΚB pathway ทำให้ NF-ΚB subunit มีการแสดงออกและมีการเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียสลดลง ส่งผลให้มีการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arulselvan และคณะ ในปี ค.ศ. 2016 ที่พบว่า สารสกัดจากใบมะรุมที่สกัดด้วย ethyl acetate สามารถต้านการอักเสบในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS โดยการลดการแสดงออกและลดการเคลื่อนที่ของ NF-ΚB subunit จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่เซลล์[18] ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกันกับงานวิจัยในปี ค.ศ. 2014 ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่สกัดด้วย ethyl acetate สามารถป้องกันการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจของคนที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสกัดจากควันบุหรี่ โดยให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่มีสารสกัดจากใบมะรุมก่อนเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมงแล้วจึงกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถป้องกันการอักเสบภายในเซลล์ได้ โดยลดการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด TNF, IL-6, IL-8 และ Rel A ซึ่งเป็นโมเลกุลส่วนประกอบของ NF-ΚB ที่มีความสำคัญในการควบคุมสารกลุ่ม pro-inflammatory cytokine โดยผ่านสัญญาณใน NF-ΚB pathway[11] ในการศึกษาของคณะผู้วิจัยเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของยีน IL-6 ด้วยวิธี qRT-PCR และระดับของ IL-6 โดยวิธี ELISA ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุมในเซลล์ที่อักเสบจากการกระตุ้นด้วยสาร LPS พบว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถใช้รักษาการอักเสบภายในเซลล์ได้ โดยลดระดับการแสดงออกของยีน IL-6 และลดปริมาณการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์แมคโครฟาจที่อักเสบจากการได้รับการกระตุ้นด้วย LPS โดยไม่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุม ซึ่งผลการรักษาด้วยสารสกัดจากใบมะรุมสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของ IL-6 ในเซลล์อักเสบที่ได้รับการรักษาด้วยยาแอสไพริน ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Woan Sean Tan ในปี ค.ศ. 2015 ที่ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดที่มาจากดอกมะรุมในแมคโครฟาจของหนู RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ผ่าน NF-ΚB pathway ที่พบว่าเมื่อทำการตรวจวัดระดับไซโตไคน์ IL-6 โดยเทคนิค ELISA มีระดับลดลง[19]

การศึกษานี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การรักษาภาวะอักเสบ

ภายในเซลล์ด้วยสารสกัดจากใบมะรุมต่อระดับไซโตไคน์ IL-6 ในหลอดทดลองของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้อักเสบด้วยสาร LPS ที่มาจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ โดยพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนของไซโตไคน์ IL-6 ที่เกิดมาจากการกระตุ้นเซลล์ด้วยสาร LPS ซึ่งคณะผู้วิจัยจะศึกษาต่อไปถึงผลของสารจากใบมะรุมต่อไซโตไคน์และเอนไซม์อื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น TNF, IL-1, IL-8 และ Cyclooxygenase เป็นต้น และศึกษากลไกการต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบมะรุมในระดับการส่งสัญญาณต้านการอักเสบ ซึ่งจะทำให้ทราบข้อมูลกลไกการต้านการอักเสบในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งฤทธิ์ต่อไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ โดยหากพบว่ามีความสามารถลดการอักเสบและพบกลไกในการลดการอักเสบที่คล้ายกับกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ลดการอักเสบ อาจมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดธรรมชาติจากใบมะรุมจะเป็นทางเลือกในการพัฒนาเป็นยาลดการอักเสบได้ต่อไป

สรุป

สารสกัดจากใบมะรุมมีฤทธิ์ในการรักษาเซลล์อักเสบโดยสามารถลดระดับไซโตไคน์ IL-6 ทั้งในระดับยีนและโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยสาร LPS ที่มาจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลอง ดังนั้น อาจพัฒนาต่อยอดผลการวิจัยจากการศึกษานี้เพื่อพัฒนาสารสกัดธรรมชาติที่มาจากใบมะรุมไปเป็นยาลดการอักเสบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์ buffy coat จากผู้บริจาคโลหิต และงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยนเรศวร และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีการศึกษา 2560

เอกสารอ้างอิง

1. Kokkas B. Tissue injury and inflammation. Ann Gen Psychiatry 2010;9(Suppl 1):S1.
2. Muangnoi C, Chingsuwanrote P, Praengamthanachoti P, Svasti S, Tuntipopipat S. *Moringa oleifera* pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell lines. Inflammation 2012;35(2):445-55.
3. Hussein SZ, Mohd Yusoff K, Makpol S, Mohd Yusof YA. Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF-kappaB pathway. PloS One 2013;8(8):e72365.
4. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell 2010;140(6):883-99.
5. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. Cancer Cell 2005;7(3):211-7.
6. Xiao H, Yang CS. Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention. Int J Cancer 2008;123(5):983-90.
7. Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanas A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2010;24(2):121-32.
8. Warrington TP, Bostwick JM. Psychiatric adverse effects of corticosteroids. Mayo Clin Proc 2006;81(10):1361-7.

9. Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM, Chen N. Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. Nutrients 2018;10(3):343.
10. Menon V, Thomas R, Ghale AR, Reinhard C, Pruszak J. Flow cytometry protocols for surface and intracellular antigen analyses of neural cell types. J Vis Exp 2014;94:e52241.
11 Kooltheat N, Sranujit RP, Chumark P, Potup P, Laytragoon-Lewin N, Usuwanthim K. An ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* Lam. inhibits human macrophage cytokine production induced by cigarette smoke. Nutrients 2014;6(2):697-710.
12. Vaidya A, Nasarabadi S, Milanovich F. Optimization of RNA purification and analysis for automated, pre-symptomatic disease diagnostics. Livermore, CA: Lawrence Livermore National Lab; 2005.
13. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2^(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath 2013;3(3):71-85.
14. Khor KZ, Lim V, Moses EJ, Abdul Samad N. The *in vitro* and *in vivo* anticancer properties of *Moringa oleifera*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2018;2:1-14.
15. Abd Rani NZ, Husain K, Kumolosasi E. Moringa genus: a review of phytochemistry and pharmacology. Frontiers in Pharmacology 2018;9(108):1-26.
16. Mansour M, Mohamed MF, Elhalwagi A, El-Itriby HA, Shawki HH, Abdelhamid IA. *Moringa peregrina* leaves extracts induce apoptosis and cell cycle arrest of hepatocellular carcinoma. Bio Med Res Int 2019:1-13.
17. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy 2017;2:1-9.
18. Arulselvan P, Tan WS, Gothai S, Muniandy K, Fakurazi S, Esa NM, et al. Anti-inflammatory potential of ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* in downregulating the NF-kappaB signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Molecules 2016;21(11):1-11.
19. Tan WS, Arulselvan P, Karthivashan G, Fakurazi S. *Moringa oleifera* flower extract suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB pathway. Mediators of Inflammation 2015;2015:1-11.

Abstract: The Effect of *Moringa oleifera* Lam. Leaves Extract on IL-6 in Inflammatory Human Macrophages Induced by Lipopolysaccharide

Pathiyakorn Tesanta, B.Sc.; Jirapporn Lapila, B.Sc. ; Thitiya Luetragoon, B.Sc., M.Sc.; Kanchana Usuwanthim, B.Sc., M.Sc., Ph.D.; Yordhathai Thongsri, B.Sc., M.Sc., Ph.D. ; Pachuen Potup, B.Sc., M.Sc., Ph.D.

Cellular and Molecular Immunology Research Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Thailand

Journal of Health Science 2020;29(6):1113-24.

Inflammation is a result of immune mechanism response to foreign organism and infection. It causes by pro-inflammatory cytokines released from the immune system such as tumor necrotic factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β and IL-6. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) and steroid are the most common drugs for inflammation treatment. However, using of this medication can cause side effects. The objective of this study was to investigate the anti-inflammatory property of *Moringa oleifera* leaves extract on human monocyte-derived macrophages induced by lipopolysaccharide of Gram-negative bacterial cell wall. Gene expression of IL-6 was evaluated by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. IL-6 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The results indicated that post-treatment of inflamed cell with Moringa leaves extract significantly reduced both IL-6 gene expression and IL-6 cytokine level ($p<0.05$) compared to the control groups. This study demonstrated that *Moringa oleifera* leaves extract reduced IL-6 in macrophages induced by lipopolysaccharide. This plant should be further investigated and the knowledge could be applied for the development of anti-inflammation drugs.

***Keywords*: cytokine; *Moringa oleifera*; macrophage; lipopolysaccharide; anti-inflammation**