

ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดผลหนามแท่ง

จินตนา จุลทัศน์^{1*} ปิยะพร ทรจักร¹ และกัญญารัตน์ เป็งจำเมือง¹

¹สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

ผู้รับผิดชอบการติดต่อ E-mail: plara_jin@hotmail.com

บทคัดย่อ

หนามแท่ง (*Catunaregam tomentosa* (Blume ex DC.) Triveng) วงศ์ Rubiaceae ในตำรายาพื้นบ้าน ใช้ผลแก้โรคผิวหนังอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการอักเสบบริเวณหนังศีรษะ ทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ลดการหลุดร่วงของเส้นผมและช่วยให้ผมดกดำอีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหยาบของผลหนามแท่ง ที่สกัดด้วย 50% เอทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT และฤทธิ์ด้านอักเสบต่อการแสดงออกของยีนไซโคลออกซีจีเนส-2 (Cyclooxygenase -2, COX-2) และยีนทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟา (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7 Cells) ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) โดยใช้เทคนิครีเวอร์สทรานสคริปชัน โพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (RT-PCR) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มสารสกัดความเข้มข้น 0-1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ นอกจากนี้สารสกัดผลหนามแท่งที่ความเข้มข้น 50-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 และ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสูงขึ้นตามปริมาณที่ใช้ และใกล้เคียงกับยาอินโดเมทาซิน ผลจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในระดับโมเลกุลของสารสกัดผลหนามแท่ง ซึ่งช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรนี้ตามองค์ความรู้ภูมิปัญญาพื้นบ้าน

คำสำคัญ : หนามแท่ง สารสกัดหยาบของผล ไซโคลออกซีจีเนส-2 ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา เซลล์แมคโครฟาจ

Anti-inflammatory effect of *Catunaregam tomentosa* fruit extract

Jintana Junlatat^{1*}, Piyaporn Thorajak¹ and Kanyarat Peng-ngummuang¹

¹Program of Thai Traditional Medicine, Faculty of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ubon Ratchathani Rajabhat University

Corresponding Author E-mail: plara_jin@hotmail.com

Abstract

Catunaregam tomentosa is a medicinal plant that belongs to the family Rubiaceae. In traditional medicine formula, it is used as an anti-inflammatory of scalp skin, anti-fungal, anti-hair loss and hair growth promoting agent. The purpose of this study is to investigate the anti-inflammatory effects of *C. tomentosa* extract. The fruit of this plant was extracted with 50% ethanol. Then, the crude extract was tested for cytotoxicity by using MTT assay and studied anti-inflammatory effect by measuring the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in LPS-stimulated macrophages (RAW264.7 Cells) by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results of this study showed that there was no toxicity on the cells after 24 hr incubation of the extract at 0-1.25 mg/ml concentrations. Moreover, the extract at 50-200 μ g/ml concentrations significant and dose-dependent manner inhibited the expressions of COX-2 and TNF- α , and comparable to a standard drug, indomethacin. The results of this study are the first scientific evidence on the molecular effects of *C. tomentosa* as a potential anti-inflammatory agent, which support the use of this plant in traditional remedies.

Keyword: Local wisdom, Food consumption, Postpartum mothers

บทนำ

หนามแท่ง (*Catunaregam tomentosa* (Blume ex DC.) Triveng) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 4-10 เมตร ลำต้นและกิ่งก้านทรงกระบอก เปลือกสีน้ำตาล กิ่งก้านมีหนามแข็ง แหลม ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่กว้าง ดอกเดี่ยว หรือออกกระจุกที่ปลายกิ่ง ผลสดรูปไข่ ค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 เซนติเมตร มีเนื้อ มีขนเหมือนกำมะหยี่สีน้ำตาลปกคลุม นุ่ม เมื่อแห้งแล้ว ไม่แตก เมล็ดมีขนาดเล็ก จำนวนมาก รูปรี หรือรูปไข่แกมรูปรี ปลายผลมีกลีบเลี้ยงติดทนเห็นหลอดและแฉกเด่นชัด เนื้อผลด้านในเมื่อแก่จะมีสีดำเข้ม พบตามป่าเต็งรัง ป่าดิบ ป่าแล้ง ป่าละเมาะ ในตำรายาพื้นบ้านใช้ทั้งต้นเป็นยารักษาโรคเบาหวาน แก้โรคมะเร็งต่างๆ เช่น มะเร็งตับ มะเร็งในกระดุก แก้วذنโรค ผลแก่ ใช้ต้กับน้ำ เป็นยาสระผม ชักผ้า ภูมิปัญญาพื้นบ้านอีสานใช้ผลแก่ ซึ่งมีสีดำเข้มเมื่อละลายน้ำมาใช้ในการสระผม พบว่าทำให้ผมดกดำ ลดการหลุดร่วงของเส้นผมได้อย่างดี

การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาตอบสนองต่อการบาดเจ็บ แม้ว่ากระบวนการอักเสบจะก่อให้เกิดประโยชน์ และสัมพันธ์กับกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ แต่หากการเกิดกระบวนการอักเสบไม่สามารถควบคุมได้ จะนำไปสู่การเกิดอันตรายต่อร่างกาย เกิดการอักเสบเรื้อรัง โรคเรื้อรัง และรวมถึงเกิดเนื้องอกได้¹ ตามปกติการอักเสบของร่างกายมนุษย์เกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อการบาดเจ็บ เนื้อเยื่อเสียหาย แล้วเกิดการกระตุ้นเส้นประสาท nociceptor และจากการติดเชื้อ (infection)^{2,3} หากเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันจะมีการอักเสบเกิดขึ้นต่อเนื่องเป็นระยะเวลาหลายวันถึงหลายอาทิตย์ และมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นยาวนานกว่า 4 สัปดาห์ มีผลทำให้เนื้อเยื่อเสียหาย ในกระบวนการอักเสบ ขั้นตอนของการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจะผลิตและหลั่งสารสื่อกลางทางเคมี เช่น histamine, nitric oxide (NO), prostaglandins E₂ (PGE₂) และ leukotrienes ออกมา⁴ สารสื่อกลางทางเคมีเหล่านี้จะมีผลให้ leukocytes เคลื่อนตัวไปยังเนื้อเยื่อที่อักเสบ แล้วหลั่งสารกลุ่ม proinflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- α , interleukin-1 (IL-1), IL-6 เป็นต้น ทำให้บริเวณที่อักเสบเกิดอาการบวม จากการศึกษาพบว่าสารสื่อกลางทางเคมีที่สัมพันธ์กับการอักเสบ เช่น TNF- α , NO และ PGE₂ รวมถึงเอนไซม์ที่สังเคราะห์ NO และ PGE₂ ได้แก่ nitric oxide synthase (NOS) และ cyclooxygenase (COX) ตามลำดับ มีบทบาทอย่างมากในการควบคุมการอักเสบอันเนื่องมาจากระบบภูมิคุ้มกัน⁵ ดังจะเห็นได้จาก TNF- α ที่หลั่งมากเกินจาก macrophage และ T cell มีผลทำลายเนื้อเยื่อ และสามารถเร่งการผลิตสารกระตุ้นการอักเสบอื่น ๆ ที่จะนำไปสู่การอักเสบเรื้อรัง ดังจะเห็นได้จากผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อ (sepsis) จะมีระดับ TNF- α ในเลือดและในเนื้อเยื่อสูง⁶ นอกจากการหลั่งไซโตไคน์แล้ว เมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้น Membrane Phospholipids จะถูกสลายด้วยเอนไซม์ Phospholipase A₂ ปลดปล่อยกรดเอราซิโดนิกออกมา โดยจะถูกเปลี่ยนไปเป็น โพรสตาแกลนดิน จากการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ซึ่งโพรสตาแกลนดินนั้นมีฤทธิ์ต่อหลอดเลือดรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวด และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยไปกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด และปลดปล่อยสารออกจากหลอดเลือด ทำให้เกิดการบวมแดงของเนื้อเยื่อ กระตุ้นการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส กระตุ้นการละลายของกระดูก และถ้ามีปริมาณสูงจะก่อกำเนิดการสร้างแอนติบอดี ดังนั้นถ้าสามารถลดปริมาณการสร้างเอนไซม์ COX-2 ได้ จะช่วยลดปริมาณโพรสตาแกลนดิน ลดความเจ็บปวด และการอักเสบได้ COX-2 จะถูกกระตุ้นให้ทำงาน

เมื่อมีการอักเสบ โดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรีย (LPS) ทำให้มีการผลิต PGE_2 มากขึ้น โดยเพิ่มการแสดงออกของ COX-2 และยังเพิ่มการผลิต Ep4 receptors ในออสติโอเบลาสต์ ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของออสติโอคลาสต์ในการทำลายกระดูก⁷ โดย COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เสริมปฏิกิริยาการอักเสบ ซึ่งการให้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งอย่างเฉพาะต่อ COX-2 เพื่อระงับการอักเสบนั้นจะให้ผลการรักษาที่ดีและเกิดผลข้างเคียงต่ำกว่ากลุ่มที่ยับยั้ง COX ไม่เฉพาะเจาะจง⁸ ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดผลหนามแท่ง โดยผลของสารสกัดนี้ต่อการแสดงออกของยีน COX-2 และ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ของ *Escherichia coli*

ระเบียบวิธีศึกษา

1. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ Molecular Biology Agarose (Bio-Rad, Spain), 1kb DNA ladder (Promega, U.S.A.), Blue/Orange 6X loading dye (Promega, U.S.A.), primer β -actin, COX-2, TNF- α (Eurofins MWG Operon, Germany), tris base, glacial acetic acid, EDTA (Ajax/Australia), Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany), TopTaq MasterMix kit (QIAGEN, Germany), Novel Juice (GeneDirex), RNA extraction kit (GE Healthcare, UK), 3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetra-zolium bromide (Invitrogen, USA), DMEM (Invitrogen, UK), FBS (Invitrogen, UK), *Escherichia coli* LPS และ RNase free DNase Set (QIAGEN, Germany)

2. ตัวอย่างสมุนไพร และวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบ

เก็บตัวอย่างผลหนามแท่งในช่วงเดือนกรกฎาคม 2560 ในเขตอำเภอเชียงใน จังหวัดอุบลราชธานี ตรวจสอบความถูกต้องของชื่อตามหลักอนุกรมวิธานพืชโดยอาจารย์ประจำสาขาเภสัชกรรมไทย คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ผึ่งให้แห้ง นำมาอบที่ 45°C จนน้ำหนักคงที่ บดละเอียด นำผงสมุนไพรมาหมักใน 50% เอทานอลเป็นเวลา 7 วัน คนเป็นระยะๆ แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง 3-4 ชั้น กรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง No.1 (WhatmanTM) จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาระเหยเพื่อทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator (EYELA, N-100, RIKAKIKAI CO., LTD, Japan) แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer (CHRIST GAMMA 1-1 LSC, Germany) ได้สารสกัดผลหนามแท่งเพื่อใช้ในการวิจัยต่อไป

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์

เลี้ยงเซลล์ murine macrophage (RAW264.7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี Fetal Bovine Serum 10% และ penicillin-streptomycin 1% ภายใต้สภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C

จากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT assay⁹ โดยเลี้ยงเซลล์ 10,000 cells/well ใน 96 well plate จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ แล้วบ่มภายใต้สภาวะที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงและเติม methyl thiazol tetrazolium bromide (MTT) วัดสี formazan ที่เกิดจากการทำงานของ

mitochondrial dehydrogenases ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการรอดชีวิตของเซลล์ โดยใช้เครื่อง microplate reader (Anthos, 2010) ที่ 570 nm ทำซ้ำ 3 ครั้ง

4. การทดสอบผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน

นำเซลล์ RAW264.7 ความเข้มข้น 10^6 cells/ml เพาะเลี้ยงใน 12 well plate จากนั้นบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารทดสอบ ความเข้มข้นที่กำหนดและบ่มเป็นเวลา 22 ชั่วโมง เติม *E.coli* LPS และบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นสกัด RNA โดยใช้ RNA extraction kit (GE Healthcare, UK) และใช้ Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany) เปลี่ยน RNA เป็น cDNA แล้วตรวจหาปริมาณของ β -actin, COX-2 และ TNF- α ด้วยการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเครื่อง thermal cycler PCR (AB Applied Biosystems GeneAmp PCR system 2400) แต่ละยีนใช้ 27 รอบ โดยใช้ primer ที่มีความเฉพาะเจาะจง (ตารางที่ 1) และระบบในการเพิ่มปริมาณ DNA (ดังตารางที่ 2) และตรวจสอบปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) บนเจลอะกาโรส 1.5% ซึ่งมี TAE buffer 1X เป็นตัวทำละลาย วัดความเข้มของแถบด้วยเครื่อง Gel Documentation InGenius L (Gel Documentation and Analysis system) เพื่อแสดงถึงระดับการแสดงออกของ COX-2 และ TNF- α จากนั้นคำนวณเป็นสัดส่วนที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน β -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุม ทำการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

จากการเตรียมสารสกัดผลหนามแท่ง โดยการสกัดด้วย 50% เอทานอล เมื่อระเหยตัวทำละลายและทำให้แห้งจนได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นผงแห้งสีดำ ไม่เหนียว (รูปที่ 1) และพบว่าสารสกัดผลหนามแท่งให้ค่าร้อยละผลผลิตที่ได้ (%yield) เท่ากับ 17.46% และผลการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มสารสกัดผลหนามแท่ง ร่วมกับเซลล์ RAW264.7 นาน 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดผลหนามแท่ง 0-1.25 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดผลหนามแท่งที่ใช้ในการศึกษาต่อไปคือ 50-200 μ g/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตมากกว่า 80% (รูปที่ 2)

ในการศึกษาผลของสารสกัดผลหนามแท่งต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ ยีน COX-2 และยีน TNF- α หลังจากกระตุ้นเซลล์ RAW264.7 ด้วย *E.coli* LPS พบว่าเซลล์นี้มีการแสดงออกของยีนทั้งสองสูงขึ้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์นี้ร่วมกับสารสกัดผลหนามแท่งความเข้มข้น 50-200 μ g/ml นาน 22 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย *E.coli* LPS พบว่าสารสกัดผลหนามแท่งสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และยีน TNF- α ได้ในลักษณะที่เป็น dose dependent manner และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และยังมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ

ยา Indometacin อีกด้วย นอกจากนี้เมื่ออบมสารสกัดผลหนามแท่งกับเซลล์แมคโครฟาจโดยที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย *E.coli* LPS พบว่าการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ไม่ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้สารทดสอบใด ๆ นั้นแสดงถึงความปลอดภัยเบื้องต้นของการใช้สารสกัดผลหนามแท่ง (ดังรูปที่ 3)

สรุปผลการวิจัย

หนามแท่ง เป็นสมุนไพรในพื้นที่อำเภอเชียงใน จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งได้รับคัดเลือกมาศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ เนื่องจากมีรายงานการใช้เพื่อต้านการอักเสบ และผลจากการศึกษาในครั้งนี้เกี่ยวกับฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดผลหนามแท่ง พบว่าสารสกัดผลหนามแท่งความเข้มข้น 50-200 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน COX-2 และยีน TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และมีความปลอดภัยต่อเซลล์

หนามแท่งเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ และสมควรได้รับการการพัฒนาและส่งเสริมการใช้เป็นสมุนไพรต้านการอักเสบต่อไป อย่างไรก็ตามสารสกัดผลหนามแท่งควรได้รับการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารประกอบเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ รวมถึงความปลอดภัย และการควบคุมคุณภาพของสารสกัด

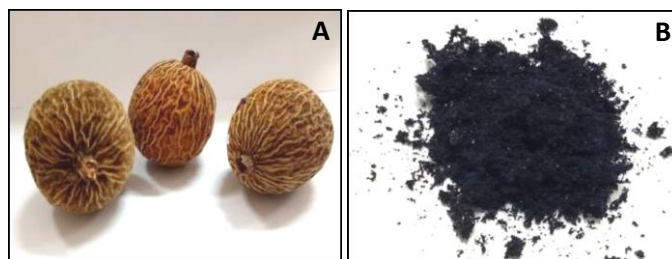
ตาราง ภาพ แผนภาพ

ตารางที่ 1 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR

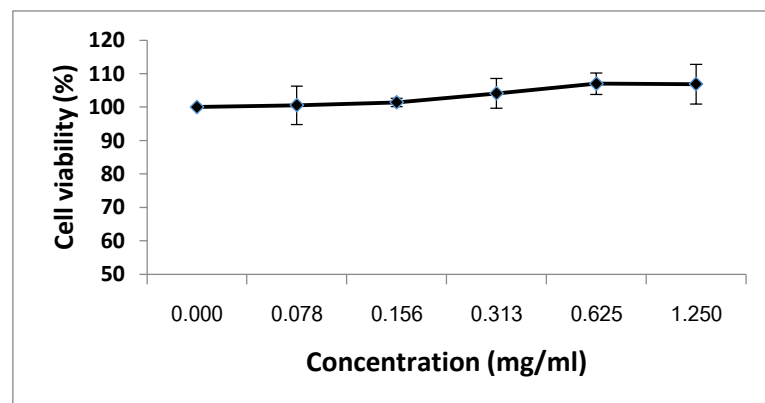
Gene	Primer	Sequence : (5'-3')	Product size (bp)
β -actin ¹⁰	Forward	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT	285
	Reverse	CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG	
COX-2 ¹⁰	Forward	GGAGAGACTATCAAGATAGT	861
	Reverse	ATGGTCAGTAGACTTTTACA	
TNF- α ¹¹	Forward	ATGAGCACAGAAAGCATGATC	276
	Reverse	TACAGGCTTGTCACCTCGAATT	

ตารางที่ 2 ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA

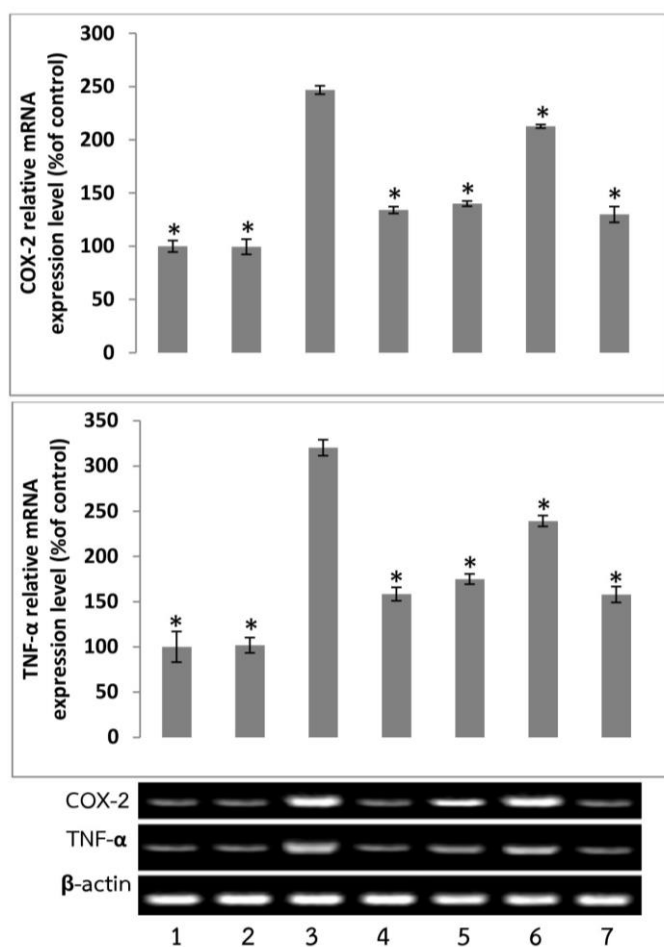
Genes	Denaturation / RT Inactivation	For Cycles			Final Extension	Hold
		Denaturation	Annealing	Extension		
β -actin	95 °C, 2 min	94 °C, 1 min	60 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 10 min	4 °C
COX-2	95 °C, 2 min	94 °C, 1 min	60 °C, 1 min	72 °C, 1 min		
TNF- α	94 °C, 2 min	94 °C, 15 Sec	60 °C, 1 min	72 °C, 1 min		



รูปที่ 1 ผลหนามแท่ง (A) และสารสกัดหยาบผลหนามแท่ง (B)



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดผลหนามแท่ง ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7



รูปที่ 3 ปริมาณการแสดงออกของยีน COX-2 (A) และ TNF- α (B) โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin

1=Unstimulated RAW264.7cells

5=RAW264.7cells+หนามแท่ง (100 μ g/ml)+*E.coli* LPS

2=RAW264.7cells+หนามแท่ง (200 μ g/ml)

6=RAW264.7cells+หนามแท่ง (50 μ g/ml)+*E.coli* LPS

3=RAW264.7cells+*E.coli* LPS

7=RAW264.7cells+Indometacin (50 μ g/ml)+*E.coli* LPS

4=RAW264.7cells+หนามแท่ง (200 μ g/ml)+*E.coli* LPS

* แตกต่างจากกลุ่ม RAW 264.7 cells+ *E.coli* LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารอ้างอิง

1. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. **Nature**. 454: 436-444.
2. Zedler S, Faist E. 2006. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. **Current Opinion in Critical Care**. 12: 595-601.
3. Mariathasan S, Monack DM. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Annual Review of Immunology**. 7: 31-40.
4. Radi ZA, Kehrli ME, Ackermann MR. 2001. Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 15: 516-529.
5. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. 2003. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. 33: 155-167.
6. Glauser MP. 1996. The inflammatory cytokines: New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. **Drugs**. 52(2): 9-17.
7. Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka H, Suzuki N, Takeichi O, Sugaya A, Maeno M. 2006. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E2 and the receptor Ep4 in osteoblast. **Life Sciences**. 78: 2012-2018.
8. Burian M, Geisslinger G. 2005. COX-dependent mechanisms involves in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. 107: 139-154.
9. Mossman T. 1993. Rapaid colorimetric assay for cellular growth and survival: applicication to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 65: 55-63.
10. Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW, Lee KT. 2006. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. **British Journal of Pharmacology**. 148: 216-225.
11. Fangkrathok N, Junlatat J, Sripanidkulchai B. 2013. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 147: 631-637.

