ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล

Effect of Herb Extracts on Neutrophil Mediated Phagocytosis

ณัฐริณี หอระตะ*, ทวีพร พันธุ์พาณิชย์, ศราวุธ สุทธิรัตน์, อิสสริยา เอี่ยมสุวรรณ, กานต์สินี ศรีสวัสดิ์, อรปรียา ทองใบ, กัญณัฏฐ์ โฆษิตฤทธิเดช, พร้อมกมล ศิวะยิ่งสุวรรณ

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

*Email : h_natharinee@hotmail.com

บทคัดย่อ

สมุนไพรสามารถใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าสามารถช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพร 20 ชนิด ที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายต่อกระบวนการจับกินของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลที่จับกินเชื้อ *Escherichia coli* โดยทดสอบ phagocytic activity และ nitroblue tetrazolium test (NBT) พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกสารภี เปลือกจันทน์เทศ โกฐกะกลิ้ง ผลเบญกานี เปลือกจันทน์ผา เปลือกแกแล หัวกระเทียม รากคนทีสอ เปลือกกำแพงเจ็ดชั้น เปลือกสีเสียดเปลือก มีความสามารถในการกระตุ้นกระบวนการจับกิน ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลได้ดี ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่สารสกัดจากใบสะเดา ลำต้นอ้อยแดง เหง้าขมิ้นชัน เปลือกมะกรูด และใบโหระพา สามารถกระตุ้นการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาเชิงลึกเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่อไป

คำสำคัญ : กระบวนการจับกิน สารสกัดสมุนไพรไทย นิวโทรฟิล

Abstract

Herb can be used as the ingredients for cooking and that can stimulate immune response. The aim of the study is to investigate the effect on neutrophil mediated phagocytosis of 20 Thai herbs ethanol extract which ingested *Escherichia coli*. Phagocytic activity and nitroblue tetrazolium test (NBT) assays were determined. The results showed that crude extract of *Mammea siamensis* Kostern flower, *Myristica fragrans* Houtt bark, *Strychnos nux-vomica* L seed, *Quercus infectoria* fruit, *Dracaena loureiri* Gagnep bark, *Maclura cochinchinensis* (Lour.) bark, *Allium sativum* L. bulb, *Vitex trifolia* L. root, *Salacia chinensis* L. bark and *Pentace burmanica* Kurz bark can stimulate neutrophil mediated phagocytosis when compared to control group. While, crude extract from *Azadirachta indica* A. leave, *Saccharum sinense* Roxb. bark, *Curcuma longa* Linn. rhizome, *Citrus hystrix* DC. fruit and *Ocimum*

basilicum Linn. leave significantly increase phagocytic activity when that compared to control group. However, this is a preliminary study, further in-depth study for investigating the active compounds from Thai herbs need to be performed.

Keyword : phagocytosis, Thai herb extracts, neutrophil

บทนำ

ระบบภูมิคุ้มกันเปรียบเสมือนเกราะป้องกันของร่างกาย ซึ่งระบบนี้จะมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายรวมทั้งยังมีหน้าที่ในการปกป้องร่างกายและรักษาร่างกายไม่ให้เกิดโรคต่าง ๆ โดยการตอบสนองครั้งแรกจะเป็นการตอบสนองแบบที่ไม่มีความจำเพาะ (innate immunity หรือ nonspecific immunity) แต่ในขณะเดียวกันก็มีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมนั้นด้วยสนองแบบจำเพาะ (specific immunity) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปในร่างกายออกจากร่างกายโดยกระบวนการต่าง ๆ ปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรกันอย่างแพร่หลายทั้งในการรักษาโรคต่าง ๆ และเพื่อเสริมภูมิต้านทานให้กับร่างกาย และมีงานวิจัยสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว (ณัฐจีรา อินต๊ะใส และคณะ, 2544: 180) และสารสกัดจากถั่วเหลืองต่อกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวได้ (วันเช็ง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข, 2554: 47-55) ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยในการเสริมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจึงเป็นหัวข้อที่น่าสนใจ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 20 ชนิดต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) และทดสอบการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ด้วยวิธี Nitrobule Tetrasolium Salt test (NBT)

ทบทวนวรรณกรรม หนึ่งในกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เป็นด่านแรกในการป้องร่างกายเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเรียกว่า innate immunity นั้นคือกระบวนการ phagocytosis เป็นกระบวนการกำจัดจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมในอันดับแรก ๆ เมื่อจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมนั้นเข้าสู่ร่างกายและที่สำคัญต่อการกำจัดจุลชีพที่เจริญภายในเซลล์ โดยอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดขาวจำพวกที่เรียกว่าฟาโกไซต์ (phagocyte) ได้แก่ เม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสหลาย lobe (polymorphonuclear cell, PMN) ประกอบด้วย neutrophil, eosinophil และ basophil และเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีนิวเคลียส lobe เดียว ได้แก่ monocyte และ macrophage ทำการโอบล้อม การกลืนกินและทำลายจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอม

สารสกัดจากสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักและคนส่วนใหญ่มักรับประทานในชีวิตประจำวัน มีประโยชน์มากมายทั้งใช้ประกอบในการทำอาหาร ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตตัวยาสำคัญ และในสมุนไพรแต่ละชนิดยังประกอบไปด้วยสารที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระบวนการ phagocytosis ให้มีความสามรถในการจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างได้ จากงานวิจัยของณัฐจีรา อินต๊ะใส และคณะ ในปีพ.ศ. 2544 พบว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองสามารถกระตุ้นการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาวต่อเชื้อ *E. coli* ได้

ต่อมาในปี พ.ศ. 2550 Ah Jin Kim และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากว่านชักมดลูก พบว่าเซลล์ macrophages มีการจับกินสิ่งแปลกปลอมเพิ่มมากขึ้น โดยจะเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ว่ามีเชื้อ *E. coli* อยู่ภายในเซลล์ macrophages มากขึ้น (Kim et al., 2007: 1428–1438) ในปี พ.ศ. 2552 Abhishek S. Shah และคณะ พบว่าใบสะเดามีฤทธิ์ช่วยเพิ่มการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์ macrophages ในช่องท้องของหนูในหลอดทดลอง (Shah et al., 2009:35-42) ในขณะเดียวกัน Chaurasia S พบว่า สารสกัดโกฐกะกลิ้งที่สกัดด้วยเอทานอลนั้นมีฤทธิ์การต้านการอักเสบและต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระได้ (Chaurasia et al, 2009 :244-252) และในปี 2555 จากการศึกษาของ Sumalatha และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรกำแพงเจ็ดชั้นในอินเดีย ช่วยเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของหนูขาวได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sumalatha et al., 2012: 98–107) ต่อมาในปี พ.ศ. 2556 Amit K. Shrivastava และคณะ ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากสมุนไพรในอินเดีย พบว่าเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ(Shrivastava et al., 2014: 1192-1207) และ Aloysius M.B. Lubega และคณะ พบว่าสารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบแดงมีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils, monocytes, basophils และ eosinophils มีจำนวนเพิ่มขึ้นในหนูทดลอง (Lubega et al., 2013: 1942-1949) และจากงานวิจัยของสุภาพร ขำจันทร์ และคณะ ในปีพ.ศ.2558 ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ภูมิปัญญาชาวบ้าน ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของ neutrophil เซลล์เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด พบว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ในการเพิ่มการทำหน้าที่ของ neutrophil ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (สุภาพร ขำจันทร์ และคณะ , 2558:144-153) และในปี 2560 จากการศึกษาของ Hata J และคณะพบกว่าแกแลเป็นสมุนไพรที่ช่วยรักษาความดันโลหิตสูง โรคที่เกี่ยวกับการอักเสบ มะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ และมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (Hata et al., 2017) ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ในการเสริมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจึงเป็นหัวข้อที่น่าสนใจ คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพร 20 ชนิด ต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ประกอบด้วยสารสกัดจาก ผลเบญกานี เปลือกจันทน์เทศ โกฐกะกลิ้ง เปลือกกำแพงเจ็ดชั้น เปลือกแกแล เปลือกสีเสียดเปลือก ดอกสารภี รากคนทีสอ รากเจตมูลเพลิงแดง เปลือกจันทน์ผา ใบสะเดา ลำต้นอ้อยแดง เหง้าขมิ้นชัน เหง้าว่านชักมดลูก เหง้าไพล เปลือกมะกรูด ดอกกระเจี๊ยบแดง ใบกะเพราแดง ใบโหระพา และหัวกระเทียม

วิธีการวิจัย

จริยธรรมการวิจัย การศึกษาครั้งนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เลขที่รับรอง อ.566/2560

สารสกัดจากสมุนไพร สารสกัดสมุนไพรที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายซึ่งทำการสกัดโดยวิธีการหมัก (Maceration) ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.เกียรติทวี ชูวงศ์กมล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยสารสกัดสมุนไพรที่นำมาทำการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชื่อและส่วนของสมุนไพรที่ใช้ทดสอบ

ลำดับที่	ชื่อ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำไปสกัด
1	เบญกานี	*Quercus infectoria*	ผล
2	จันทน์เทศ	*Myristica fragrans* Houtt	เปลือก
3	โกฐกะกลิ้ง	*Strychnos nux-vomica* L.	เหง้า
4	กำแพงเจ็ดชั้น	*Salacia chinensis* L.	เปลือก
5	แกแล	*Maclura cochinchinensis* (Lour.)	เปลือก
6	สีเสียดเปลือก	*Pentace burmanica* Kurz.	เปลือก
7	สารภี	*Mammea siamensis* Kostern	ดอก
8	คนทีสอ	*Vitex trifolia* L.	ราก
9	เจตมูลเพลิงแดง	*Plumbago indica* L.	ราก
10	จันทน์ผา	*Dracaena loureiri* Gagnep.	เปลือก
11	สะเดา	*Azadirachta indica* A.	ใบ
12	อ้อยแดง	*Saccharum sinense* Roxb.	ลำต้น
13	ขมิ้นชัน	*Curcuma longa* Linn.	เหง้า
14	ว่านชักมดลูก	*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.	เหง้า
15	ไพล	*Zingiber cassumunar* Roxb.	เหง้า
16	มะกรูด	*Citrus hystrix* DC.	เปลือก
17	กระเจี๊ยบแดง	*Hibiscus sabdariffa* L.	ดอก
18	กะเพราะแดง	*Ocimum sanctum* Linn.	ใบ
19	โหระพา	*Ocimum basilicum* Linn.	ใบ
20	กระเทียม	*Allium sativum* L.	หัว

การทดสอบกระบวนการ phagocytosis ทำการทดสอบกระบวนการ phagocytosis กับเลือดที่เก็บจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี จำนวน 8 ราย โดยแต่ละตัวอย่าง นำตัวอย่างเลือดครบส่วนที่ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ตัวอย่างละ 200 µl. ผสมกับสารสกัดความเข้มข้น 300 µg/ml ปริมาตร 200 µl. และ normal saline ปริมาตร 200 µl. ใส่หลอดขนาด 1 ml. (ทำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างทั้งหมด) จากนั้นนำหลอดไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมเชื้อ *E. coli* (0.5 MacFarland) ปริมาตร 200 µl จากนั้นนำหลอดทั้งหมดไป incubate ใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 30 นาที แล้วนำมา smear บนแผ่น slide ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งและย้อมด้วยสี Wright-Geimsa's stain ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (100X) นับจำนวน neutrophil ที่กิน *E. coli* เทียบกับจำนวน neutrophil ทั้งหมด และนำมาคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์ของ phagocytic cell ดังสูตร โดยทำการทดสอบแบบ 2 ซ้ำ (duplicate) (ณัฐจีรา อินต๊ะใส และคณะ, 2544: 180)

สูตรคำนวณ

$$\text{Phagocytic cell (\%)} = \frac{\text{จำนวน phagocyte ที่กินจุลินทรีย์}}{\text{จำนวน phagocyte ที่นับได้ทั้งหมด}}$$

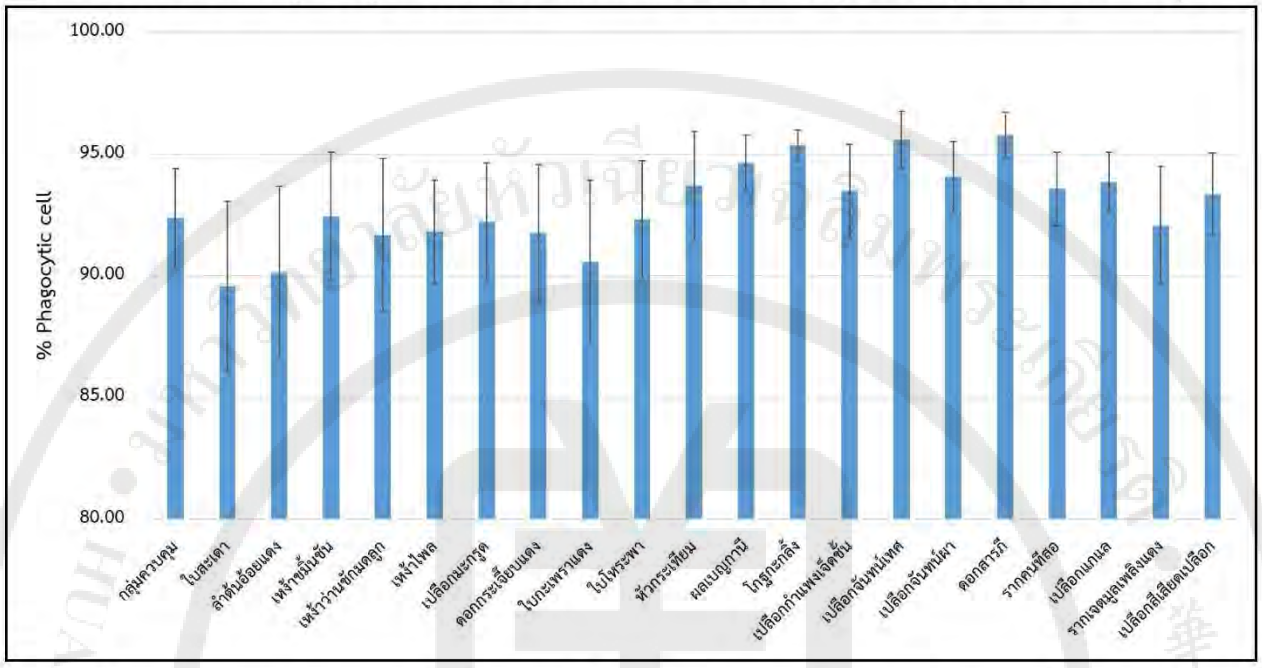
การทดสอบ Nitrobule tetrazolium salt (NBT) test เพื่อประเมินความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยทำการทดสอบกับตัวอย่างที่เก็บจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี จำนวน 8 ราย โดยแต่ละตัวอย่างนำเลือดครบส่วนที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ปริมาตร 100 µl. ผสมกับสารสกัดความเข้มข้น 300 µg/ml ปริมาตร 100 µl. และ normal saline ปริมาตร 100 µl. ใส่หลอด 1 ml. จากนั้นนำหลอดทั้งหมดไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นเติมเชื้อ *E. coli* (0.5 MacFarland) ปริมาตร 100 µl. และเติมสี NBT 100 µl. นำหลอดไป incubate ต่ออีก 10 นาที แล้วนำมา smear บนแผ่น slide ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งและย้อมด้วยสี Wright-Geimsa's stain ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (100X) นับจำนวนเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่มีตะกอนสีน้ำเงินเข้มภายใน cytoplasm โดยการอ่านและแปลผลจะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของ neutrophil ที่มีตะกอนสีน้ำเงินเข้มของ formazan blue เทียบกับจำนวน neutrophil ทั้งหมดที่นับได้ โดยทำการทดสอบแบบ 2 ซ้ำ (duplicate) (ณัฐจีรา อินต๊ะใส และคณะ, 2544: 180)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม ของทุกการทดสอบ ด้วยสถิติ Man-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

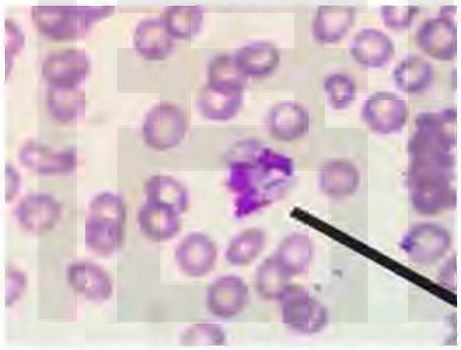
ผลการวิจัย

ผลการทดสอบกระบวนการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ทดสอบกระบวนการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil โดยการตรวจดู smear เลือดที่นำมาทำการย้อมสี Wright-Giemsa's ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 min เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จะมีการจับกินเชื้อ *E.coli* เข้าไปภายในเซลล์ ดังรูปที่ 2 โดยเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จะมีการจับกินเชื้อ *E.coli* ให้เข้ามาอยู่ในไซโตพลาสมประมาณ 1-6 ตัว การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จะเป็นการโอบล้อมสิ่งแปลกปลอมให้เข้าไปอยู่ภายในไซโตพลาสม ซึ่งจะทำการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จำนวน 100 เซลล์ โดยแยกเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่มีการจับกินเชื้อ *E.coli* และไม่จับกินเชื้อ *E.coli* และคำนวณเป็นร้อยละการจับกิน (% phagocytic cell) โดยเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (กลุ่มควบคุม) มีค่า % phagocytic cell เท่ากับ 92.36% และเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 300 µg/ml พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีผลในการกระตุ้นการ phagocytosis สูงที่สุดได้แก่ ดอกสารภี (95.79%) เปลือกจันทน์เทศ (95.97%) โกฐกะกลิ้ง (95.36%) ผลเบญกานี (94.64%) เปลือกจันทน์ผา (94.07%) เปลือกแกแล (93.86%) หัวกระเทียม (93.69%) รากคนทีสอ (93.57%) เปลือกกำแพงเจ็ดชั้น (93.50%) เปลือกสีเสียดเปลือก (93.36%) เหง้าขมิ้นชัน (92.44%) ใบโหระพา (92.31%) เปลือกมะกรูด (92.91%) ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจาก รากเจตมูลเพลิงแดง (92.07%) เหง้าไพล(91.81%) ดอกกระเจี๊ยบแดง (91.75%) เหง้าว่านชักมดลูก (91.69%) ใบกะเพราแดง (90.56%) ลำต้นอ้อยแดง (90.13%) ใบสะเดา (89.56%) ให้ผลของ % phagocytic cell น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (92.36%) แสดงให้

เห็นว่ามีการยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และเมื่อนำ % phagocytic cell จากสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 1



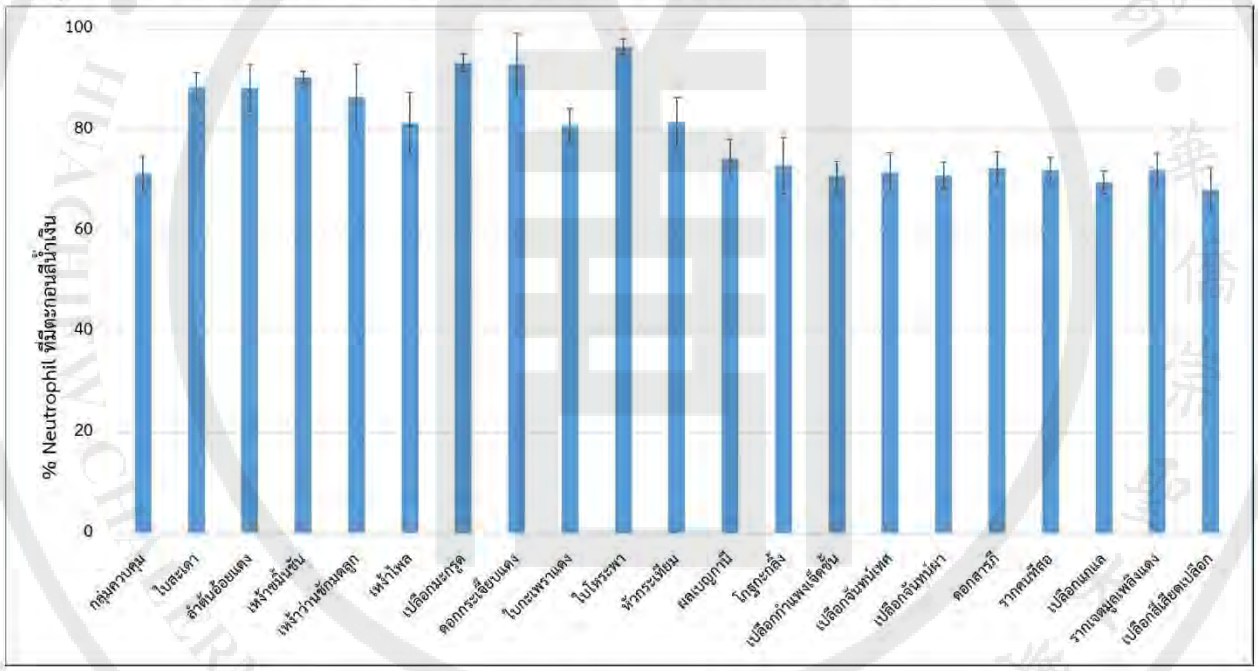
รูปที่ 1 % phagocytic cell ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ที่ถูกกระตุ้นจากสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิด



รูปที่ 2 การจับกินเชื้อ *E.coli* ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil

ผลการตรวจประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil โดยวิธี NBT การตรวจประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ศึกษาโดยการตรวจดู smear เลือดที่ย้อมด้วยสี NBT และ Wright-Giemsa's แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จะมีการทำลายเชื้อ *E.coli* เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จะเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ทำให้เกิดเป็นก๊าซออกซิเจนมาจับกับสี NBT เมื่อย้อมด้วยสี Wright-Giemsa's stain จะเห็นเป็นตะกอนสีน้ำเงินอยู่ภายในไซโตพลาสม ทำการตรวจนับเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จำนวน 100 เซลล์ โดยแยกเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่มีการติดสีและไม่ติดสี และนำผลการตรวจนับมาคำนวณ % neutrophil ที่มีตะกอนสีน้ำเงิน พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพรให้ค่าเฉลี่ย % neutrophil ที่มี

ตะกอนสีน้ำเงิน เท่ากับ 71.25% และเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 300 µg/ml พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีผลในการกระตุ้นการทำลายเชื้อ *E.coli* สูงที่สุด (แสดงดังรูปที่ 3) ได้แก่ ใบโหระพา (96.50%) เปลือกมะกรูด (93.33%) ดอกกระเจี๊ยบแดง (93.00%) เหง้าขมิ้นชัน (90.50%) ใบสะเดา (88.50%) ลำต้นอ้อยแดง (88.33%) เหง้าว่านชักมดลูก (86.50%) หัวกระเทียม (81.50%) เหง้าไพล (81.33%) ใบกะเพราแดง (81.00%) ผลเบญกานี (74.33%) โกฐกะกลิ้ง (73.00%) ดอกสารภี (72.40%) รากคนทีสอ (72.00%) รากเจตมูลเพลิงแดง (72.00%) และเปลือกจันทน์เทศ (71.60%) ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเปลือกจันทน์ผา (71.00%) เปลือกกำแพงเจ็ดชั้น (70.80%) เปลือกแกแล (69.60%) และเปลือกสีเสียดเปลือก (68.20%) ให้ผลของ %neutrophil ที่มีตะกอนสีน้ำเงินน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ามีการยับยั้งการทำลายเชื้อ *E.coli* ของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และเมื่อนำผล % เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่ติดมีตะกอนสีน้ำเงินของ NBT จากสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า สารสกัดจากใบสะเดา (p = 0.034) ลำต้นอ้อยแดง (p = 0.021) เหง้าขมิ้นชัน (p = 0.034) เปลือกมะกรูด (p = 0.020) ใบโหระพา (p = 0.034) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3 ผลการทดสอบกระบวนการ nitrobule tetrasolium salt test (NBT)

สรุปและอภิปรายผล

การวิจัยครั้งนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความสามารถของสมุนไพรในการกระตุ้น หรือยับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในการจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยใช้เชื้อ *E. coli* และสารสกัดสมุนไพรไทย 20 ชนิด ดังนี้ สารสกัดจากผลเบญกานี เปลือกจันทน์เทศ โกฐกะกลิ้ง ดอกสารภี เปลือกแกแล เปลือกสีเสียดเปลือก เปลือกกำแพงเจ็ดชั้น รากคนทีสอ รากเจตมูลเพลิงแดง เปลือกจันทน์ผา ใบสะเดา ลำต้นอ้อยแดง เหง้าขมิ้นชัน เหง้าว่านชักมดลูก เหง้าไพล เปลือกมะกรูด ดอกกระเจี๊ยบแดง ใบกะเพราแดง ใบโหระพา และหัวกระเทียม สกัดสารโดยใช้ ethanol

เป็นตัวทำละลายโดยใช้สารสกัดสมุนไพรเข้มข้น 300 µg/ml ทดสอบความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม โดยวิธี phagocytosis และทดสอบความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี nitrobule tetrasolium salt (NBT) test สรุปได้ว่า สารสกัดพืชสมุนไพรไทย 10 ชนิด ได้แก่ ดอกสารภี เปลือกจันทน์เทศ โกฐกะกลิ้ง ผลเบญกานี เปลือกจันทน์ผา เปลือกแกแล หัวกระเทียม รากคนทีสอ เปลือกกำแพงเจ็ดชั้น เปลือกสีเสียดเปลือก มีความสามารถในการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 16 ชนิด ใบโหระพา เปลือกมะกรูด ดอกกระเจี๊ยบแดง เหง้าขมิ้นชัน ใบสะเดา ลำต้นอ้อยแดง เหง้าว่านชักมดลูก หัวกระเทียม เหง้าไพล ใบกะเพราแดง ผลเบญกานี โกฐกะกลิ้ง ดอกสารภี รากคนทีสอ รากเจตมูลเพลิงแดง และเปลือกจันทน์เทศ สามารถกระตุ้นการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งผลการศึกษาของเหง้าว่านชักมดลูกสอดคล้องกับสรรพคุณที่หลากหลายของว่านชักมดลูกที่ มีฤทธิ์เป็นสารต้านการอักเสบ ต้านการเจริญเติบโตของมะเร็ง ลดไขมันชนิดคลอเรสเตอรอลในซีรัม รวมถึงสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาโดย Ah-Jin kim และคณะ(Kim et al., 2007: 1428–1438) ที่รายงานว่าสารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกสามารถกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์ RAW 264.7 (macrophage cell line) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง NO, H_2O_2 , TNFα, และ iNOS ได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเทียบได้กับ LPS ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นที่สารสกัดจากเหง้าว่านชักมดลูกสามารถกระตุ้นการจับกินและการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Aloysius M.B. Lubega และคณะ (Lubega et al., 2013: 1942-1949) รายงานว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ cell mediated และ humoral-mediated immune responses รวมถึงสามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการ phagocytosis ได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ผลออกมาว่าสารสกัดจากสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงสามารถกระตุ้นการจับกินและการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Abhishek S. Shah และคณะ (Shah et al., 2009:35-42) ได้ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะของสารสกัดจากสะเดา พบว่าใบสะเดามีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าสารสกัดช่วยเพิ่มการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ (O_2–) และไนตริกออกไซด์ (NO) ในช่องท้องของหนูในหลอดทดลอง ซึ่งแตกต่างกับผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่พบว่าสารสกัดจากใบสะเดามีผลทำให้ % phagocytosis และ phagocytosis index ลดลง แต่เพิ่มความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี NBT ในการทดสอบการความสามารถในการจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมใช้วิธี nitrobule tetrasolium salt (NBT) test โดยจะเห็นตะกอนสีน้ำเงินอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil เป็นผลผลิตที่มาจากการ phagocyte เมื่อมีกระบวนการ phagocytosis จะเกิดปฏิกิริยา respiratory burst คือมีการเพิ่มของ metabolic activity และมีการสร้าง hydrogen peroxide (H_2O_2) และ superoxide free radical (O_2) ซึ่งเป็น reducing agents จะไป reduce NBT dye ซึ่งเป็นสีชนิดหนึ่ง จากสีเหลืองให้เป็น formazan ซึ่งมีสีน้ำเงิน จึงสามารถบอกได้ว่าหลังจากที่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil โอบล้อมเชื้อ *E. coli* เข้าไปได้แล้วสามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เห็นได้ว่าผลการทดสอบที่ได้มีอาจมีความแตกต่างกันได้ ซึ่งอาจเกิดจากสารสกัดสมุนไพรที่ใช้เป็นสารสกัดหยาบ ดังนั้นจึงไม่สามารถควบคุมปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ได้ นอกจากนี้วิธีที่ใช้ในการสกัด และตัวทำละลายที่ใช้แตกต่างกัน จึงทำให้สารที่สกัดได้มากน้อยต่างกัน งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าสมุนไพรมีฤทธิ์

ในการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ได้ ซึ่งควรมีการนำสารสกัดสมุนไพร มาทำการทดสอบต่อโดยการสกัดเป็นลำดับขั้น เพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์อย่างแท้จริง

เอกสารอ้างอิง

ณัฐจีรา อินต๊ะใส, กมล อยู่สุข, มงคล โชตยาภรณ์ และ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์. (2544). ผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองต่อกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่, 34(3).180

วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา,16(1), 47-55.

สุภาพร ขำจันทร์, ปารียา ใบอุบล, หนึ่งฤทัย นิลศรี. ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพรภูมิปัญญาชาวบ้าน ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทางานของเซลล์นิวโตรฟิล เซลล์เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ พฤษภาคม 2558;48(2):144-153.

Chaurasia, S. (2009). Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of *Strychnos nux vomica* Linn. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 3(2): 244-252.

Hata, J., Ratchanaporn, C., Dhar, R., Chunglok, W., & Suksamrarn, A. (2017). Nitric oxide inhibitory activities of flavonoids, xanthones and benzophenone from *Maclura cochinchinensis* in lipopolysaccharide activated RAW264.7 macrophages. *Paccon Pure Applied Chemistry International Conference*.

Kim, J. A., Kim, O.Y., Shim, S. J. & Hwang, K. J. (2007). Immunostimulating Activity of Crude Polysaccharide Extract from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Bioscience Biotechnology and Biochemical, 71(6):1428–1438.

Lubega, A. M., Bbosa, G. S., Musisi, N., Erume, J., and Ogwal-Okeng, J. (2013). Effect of the total crude extracts of *Hibiscus sabdariffa* on the immune system in the Wistar albino rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7:1942-1949.

Shah, S. A., Gunjal, A. M., & Juvekar, R. A.(2009). Immunomostimulatory activity of aqueous extract of *Azadirachta indica* flowers on specific and non-specific immune response. *Journal of Natural Remedies*, 9(1):35-42.

Shrivastava, A. K., Srivastava, A. K., & Prakash, D. (2014). Herbal immunomodulors: a review. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 5:1192-1207.

Sumalatha, R. B.P., Ballal, S. R., & Acharya, S. (2012) Studies on immunomodulatory effects of Salacia chinensis L. on albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2:98–107.