

1-1-1990

EFFECTS OF ANDROGRAPHOLIDE, NEOANDROGRAPHOLIDE AND 14-DEOXY-11, 12-DIDEHYDRO ANDROGRAPHOLIDE ON ISOLATED RAT STOMACH SMOOTH MUSCLE CONTRACTION.(ผลของ Andrographolide, Neoandrographolide และ 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide ต่...

Vanida Sangalunkarn

Prasan Dhumma-Upakorn

Uma Kitiyaneer

Chaiyo Chaichantipyuth

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjps>

 Part of the [Pharmacology Commons](#)

Recommended Citation

Sangalunkarn, Vanida; Dhumma-Upakorn, Prasan; Kitiyaneer, Uma; and Chaichantipyuth, Chaiyo (1990) "EFFECTS OF ANDROGRAPHOLIDE, NEOANDROGRAPHOLIDE AND 14-DEOXY-11, 12-DIDEHYDRO ANDROGRAPHOLIDE ON ISOLATED RAT STOMACH SMOOTH MUSCLE CONTRACTION.(ผลของ Andrographolide, Neoandrographolide และ 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide ต่..." *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*: Vol. 15: Iss. 1, Article 1.
Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjps/vol15/iss1/1>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.



ปฐมนิพนธ์

ORIGINAL ARTICLE

ผลของ Andrographolide, Neoandrographolide และ 14-deoxy-11,
12-didehydroandrographolide ต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ
กระเพาะอาหารหนูขาว นอกร่างกาย

วนิดา แสงอสังการ*
ประสาน ธรรมอุปกรณ์**
อุมา กิตติยานี**
ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ***

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรในกลุ่ม diterpene lactone 3 ชนิด คือ Andrographolide, Neoandrographolide และ 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide ความเข้มข้น 1.5×10^{-5} และ 1.5×10^{-6} M มีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารและหนูถีบจักรได้ ผลการทดลองในหนูขาวพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด จะออกฤทธิ์เป็นแบบ non-competitive antagonist โดยยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารที่เกิดจากการให้สารกระตุ้น acetylcholine ได้ และเมื่อ depolarized กล้ามเนื้อด้วย potassium -depolarizing Tyrode's solution พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด จะให้ผลการยับยั้งการหดเกร็งที่เกิดจากการใช้สารกระตุ้น calcium chloride เป็นแบบ competitive antagonist ผลที่เกิดขึ้นนี้เหมือนกับการทดลองที่ใช้ verapamil ความเข้มข้น 5×10^{-8} M และจากผลการทดลอง พบว่าความแรงในการยับยั้งของ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจาก บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

** ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารสกัดทั้ง 3 ชนิด จะขึ้นกับขนาดที่ใช้ (dose dependent) สำหรับการทดลองที่ใช้กล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร หนูถีบจักรทั้งกระเพาะนั้นพบว่าสารสกัดจะออกฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองทั้งแบบ phasic และ tonic contraction ที่เกิดจากสารกระตุ้น acetylcholine และ calcium chloride ได้ โดยจะเห็นผลการยับยั้งชัดเจนในระยะ tonic จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด จะยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาว และหนูถีบจักรได้แบบไม่เฉพาะเจาะจงต่อสารกระตุ้น (non-specific antagonist) กลไกออกฤทธิ์ อาจเกิดขึ้นได้หลายทาง แต่ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่ากลไกแบบหนึ่งจะออกฤทธิ์โดยการป้องกันการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ (calcium entry blocker) ซึ่งการวิจัยนี้ให้ผลสนับสนุนรายงานการใช้สมุนไพร ฟัทะลายโจรในทางคลินิกและทางการแพทย์แผนโบราณ สำหรับการรักษาโรคอุจจาระร่วงและโรคในระบบทางเดินอาหาร (ไทยเภสัชสาร ปีที่ 15 (1) : หน้า 5-17 (2533))

บทนำ

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*, Wall, ex Nees,) เป็นสมุนไพรที่ขึ้นในเขตร้อน พบได้ทั่วไปตามป่าดงดิบ ป่าสน ป่าก่อ ป่าเต็งรัง⁽¹⁾ ปลูกง่ายพบได้ทุกฤดูกาล และเป็นสมุนไพรที่ใช้แพร่หลายในภาคพื้นเอเชียเข้าในเภสัชตำรับของจีน ฮังกง อินเดีย⁽²⁾ ปัจจุบันจากการศึกษาทางเคมี ทำให้ทราบว่าสารสกัดส่วนของใบและลำต้นจะพบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญพวก diterpene lactone ได้แก่ andrographolide neoandrographolide และ deoxyandrographolide ในส่วนของรากจะมีสารพวก flavonoid⁽³⁾ นักวิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ของสารในกลุ่ม diterpene lactone แล้วสรุปว่ามีฤทธิ์ลดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบบางชนิดได้^(4,5,6,7) และจากรายงานการศึกษาด้านพิษวิทยาทำให้ทราบว่าสารสกัดในส่วนของใบและลำต้นของฟ้าทะลายโจรนี้สามารถนำมาใช้ได้ อย่างปลอดภัย^(3,8,9) ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงให้ความสนใจต่อสารในกลุ่ม diterpene lactone ที่มีต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร โดยกำหนดวัตถุประสงค์ไว้ว่าจะศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดบริสุทธิ์ของฟ้าทะลายโจร 3 ชนิด ได้แก่ andrographolide, neoandrographolide และ 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide ต่อกลิ้มเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวนอกร่างกาย ซึ่งผลที่ได้จะใช้เป็นข้อมูลทางเภสัชวิทยาสำหรับงานวิจัยอื่น ๆ อันจะเป็นแนวทางประกอบการพิจารณานำไปใช้กับมนุษย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง : ใช้นุขาวพันธุ์ Wistar และหนูถีบจักรพันธุ์ Swiss Albino จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม

เครื่องมือ : ใช้ organ bath แบบ double walled Harvard type และเครื่องมือวัดแรงหดเกร็ง isotonic, isometric และ pressure transducer ใช้ของบริษัท Washington ส่วนเครื่องบันทึกผลการทดลอง (polygraph recorder) เป็นแบบ Washington 400 M.D. 2C.

สารเคมี : สารกระตุ้นการหดเกร็งใช้

- Acetylcholine chloride. Sigma
- Calcium chloride. Merck

สารยับยั้งมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบผลกับสารสกัดฟ้าทะลายโจร

- Atropine sulfate Sigma
- Verapamil hydrochloride (Isoptin[®])

สารสกัดบริสุทธิ์จากฟ้าทะลายโจร 3 ชนิด

- Andrographolide (AC₁)
- 14-deoxy-11,12 didehydroandrographolide (AC₃)
- Neoandrographolide (AC₂)

เตรียมสารสกัดฟ้าทะลายโจรในรูปสารละลาย โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

วิธีการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองนอกตัวสัตว์ทดลอง (*in vitro*) โดยกล้มเนื้อกระเพาะอาหารที่เตรียมขึ้นจะถูกปรับให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมด้วยสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต (physiological solution) ส่วนการใช้

สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรจะใส่ลงใน organ bath ให้มีความเข้มข้น 1.5×10^{-5} และ 1.5×10^{-6} M วิธีการทดลองมีดังนี้

1. ศึกษาผลของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร 3 ชนิด (AC_1 , AC_2 และ AC_3) ต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวนอกร่างกาย

เตรียมกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวตามวิธีของ Vane⁽¹⁰⁾ โดยจะใช้ส่วนของ fundus แล้วตัดให้อยู่ในรูป fundus strip แบบ longitudinal นำชิ้นเนื้อไปจัดวางอยู่ใน organ bath โดยต่อชิ้นเนื้อเข้ากับ isotonic transducer ที่ต่อกับเครื่องบันทึกผลการทดลอง ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัวประมาณ 1 กรัม incubate ไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง โดยเปลี่ยน Tyrode's solution ทุก 15 นาที แล้วหาค่า cumulative dose-response curve⁽¹¹⁾ ของ acetylcholine ต่อปลาย acetylcholine ออก และใส่สารสกัดฟ้าทะลายโจรลงใน organ bath ให้มีความเข้มข้น 1.5×10^{-5} M และ 1.5×10^{-6} M เป็นเวลา 5 นาที จึงเริ่มหาค่า cumulative dose-response curve ของ acetylcholine อีกครั้งหนึ่ง นำผลการทดลองที่ได้มา เปรียบเทียบผลการทดลองก่อนและหลังการใช้สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร

สำหรับการทดลองที่ใช้ $CaCl_2$ เป็นสารกระตุ้นจะทำเช่นเดียวกับการใช้ acetylcholine แต่เมื่อ incubate ชิ้นเนื้อด้วย Tyrode's solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วให้เปลี่ยนเป็น potassium-depolarizing Tyrode's solution โดยเปลี่ยนสารละลายนี้ต่อไปทุก 10-15 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงเริ่มทำการทดลองหาค่า cumulative dose-response curve

ต่อไปทำการศึกษาเปรียบเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน 2 ชนิด ได้แก่ atropine ความเข้มข้น 1×10^{-8} M (เมื่อใช้ acetylcholine เป็นสารกระตุ้น) และ verapamil ความเข้มข้น 5×10^{-8} M (เมื่อใช้ $CaCl_2$ เป็นสารกระตุ้น) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นสารยับยั้งมาตรฐาน atropine และ verapamil ดังกล่าวข้างต้น

2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร 3 ชนิด (AC_1 , AC_2 และ AC_3) ต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรที่แยกออกมานอกร่างกาย

ใช้หนูถีบจักร (20-22 กรัม) อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้หนูสลบ แล้วเปิดหน้าท้องแยกเอากระเพาะอาหารออกมาล้างกระเพาะอาหารภายในให้สะอาด โดยฉีด Tyrode's solution เข้าไปทางสาย polyethylene ที่ผูกติดกับกระเพาะอาหาร ส่วนที่ต่อกับหลอดอาหาร ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของสาย polyethylene จะต่อกับ three-way stop-cock ซึ่งต่อเข้ากับ pressure transducer เพื่อทำหน้าที่วัดแรงดันภายในกระเพาะอาหาร ปรับความดันภายในกระเพาะให้มีค่าประมาณ 25-30 มม.ของน้ำ แล้ว incubate ไว้ 1 ชั่วโมง วิธีการทดลองมีดังนี้

- ศึกษาฤทธิ์ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักร โดยให้กล้ามเนื้อกระเพาะอาหารได้รับสารกระตุ้น แล้วจึงล้างสารกระตุ้นออก รอจนกล้ามเนื้อคลายตัวสู่ระดับ base line แล้วจึงให้สารสกัดไปก่อน 5 นาที จึงเริ่มให้สารกระตุ้นใหม่อีกครั้งหนึ่ง เปรียบเทียบผลการหดเกร็งของกล้ามเนื้อก่อนและหลังจากที่ได้รับสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร

- ศึกษาฤทธิ์ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ที่มีต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูถีบจักรขณะเกิดการหดเกร็งสูงสุดเมื่อได้รับสารกระตุ้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมใช้ Student's paired t-test ส่วนการเปรียบเทียบผลของกลุ่มทดลองจากสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรแต่ละชนิดใช้ Student's unpaired t-test โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

การคำนวณหาค่า drug parameter ใช้วิธีของ Van Rossum⁽¹⁾ โดยค่า logarithm ของ affinity ของ competitive antagonist แสดงในรูป pA_2 สำหรับ non-competitive antagonist แสดงในรูป pD_2

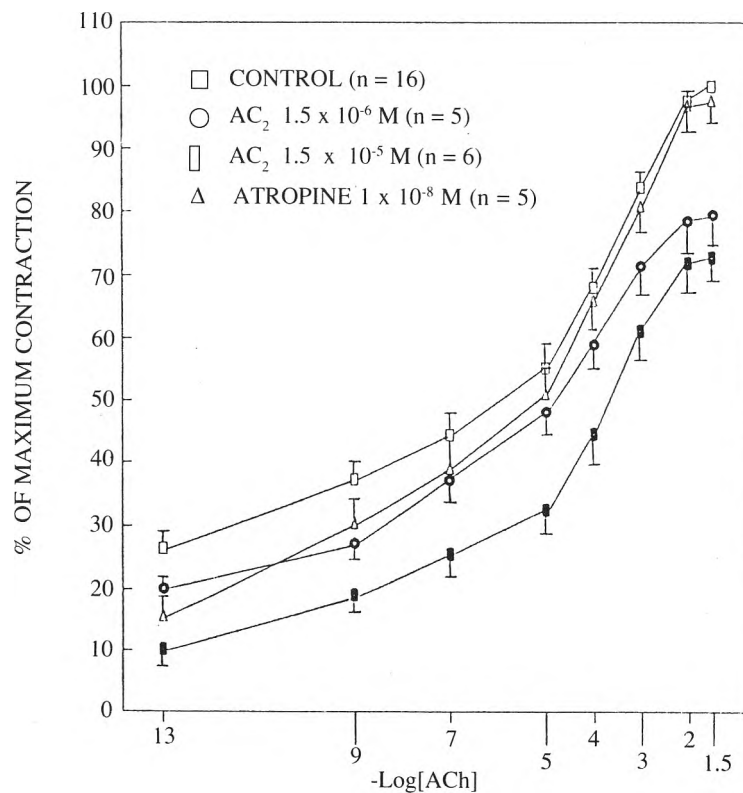
ผลการทดลอง

ผลการทดลองในกระเพาะอาหารหนูขาว

1. เมื่อใช้สารกระตุ้น acetylcholine

จากตารางที่ 1. จะพบว่าค่า pD_2 ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 จะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของสารสกัดโดยพบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ทั้ง 3 ชนิดจาก 1.5×10^{-6} เป็น 1.5×10^{-5} M ค่า pD_2 จะลดลง

สำหรับผลที่ยังจะเห็นชัดเจนเมื่อใช้ AC_2 และความแรงในการยับยั้งจะขึ้นกับขนาดที่ให้ (dose dependent) (ดูรูปที่ 1.) ซึ่งผลการทดลองเป็นเช่นเดียวกับการใช้ AC_1 และ AC_3



รูปที่ 1 แสดงผลของ AC_2 ต่อ cumulative log dose-response curve ของ acetylcholine ที่กระตุ้นการหดเกร็งกระเพาะอาหารของหนูขาว แต่ละจุดในกราฟแสดงค่า $X \pm SEM$.

ตารางที่ 1 แสดงค่า

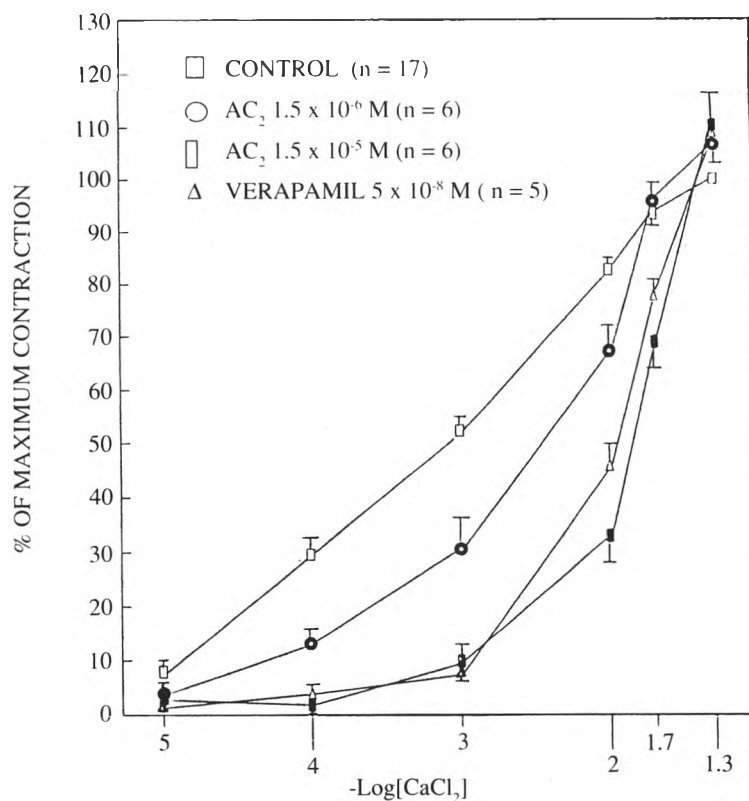
- pD₂ ของ AC₁, AC₂ และ AC₃
- pA₂ ของ ethanol และ atropine คำนวณจาก log dose-response curve ของ acetylcholine ที่กระตุ้นการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาว

| ANTAGONIST | | | LOG AFFINITY OF THE ANTAGONIST | | | |
|----------------------------|------------------------|---|--------------------------------|---|-------------|-------|
| NON-COMPETITIVE ANTAGONIST | | | MEAN ± SEM | | | |
| AC ₁ | 1.5 x 10 ⁻⁵ | M | pD ₂ | = | 3.58 ± 0.09 | (n=6) |
| AC ₁ | 1.5 x 10 ⁻⁶ | M | pD ₂ | = | 4.14 ± 0.14 | (n=5) |
| AC ₂ | 1.5 x 10 ⁻⁵ | M | pD ₂ | = | 4.38 ± 0.01 | (n=6) |
| AC ₂ | 1.5 x 10 ⁻⁶ | M | pD ₂ | = | 5.12 ± 0.19 | (n=5) |
| AC ₃ | 1.5 x 10 ⁻⁵ | M | pD ₂ | = | 4.27 ± 0.05 | (n=6) |
| AC ₃ | 1.5 x 10 ⁻⁶ | M | pD ₂ | = | 5.09 ± 0.05 | (n=5) |
| COMPETITIVE ANTAGONIST | | | | | | |
| ETHANOL | 6.9 X 10 ⁻² | M | pA ₂ | = | 1.43 ± 0.19 | (n=5) |
| ATROPINE | 1 x 10 ⁻⁸ | M | pA ₂ | = | 8.65 ± 0.39 | (n=5) |

2. เมื่อใช้สารกระตุ้น CaCl₂

ตารางที่ 2. แสดงผลเปรียบเทียบค่า pA₂ ของ AC₁, AC₂ และ AC₃ กับ Verapamil พบว่าค่า pA₂ ของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรทั้ง 3 ชนิด จะมีค่าอยู่ระหว่าง 5-6 โดยค่า pA₂ นี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P > 0.05) เมื่อความเข้มข้นของ AC₁, AC₂ และ AC₃ เปลี่ยนแปลงจาก 1.5x10⁻⁶M เป็น 1.5x10⁻⁵M

สำหรับผลการยับยั้งจะเห็นชัดเจนเมื่อใช้ AC₂ และความแรงในการยับยั้งจะขึ้นกับขนาดที่ให้ (ดูรูปที่ 2.) ซึ่งผลการทดลองเป็นเช่นเดียวกับการใช้ AC₁ และ AC₃



รูปที่ 2 แสดงผลของ AC_2 ต่อ cumulative log dose-response curve ของ $CaCl_2$ ที่กระตุ้นการหดเกร็งกระเพาะอาหารของหนูขาวแต่ละจุดในกราฟแสดงค่า $X \pm SEM$

ตารางที่ 2 แสดงค่า pA_2 ของ AC_1 , AC_2 , AC_3 , verapamil ethanol, คำนวณจาก log dose-response curve ของ $CaCl_2$, ที่กระตุ้นการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาว

| ANTAGONIST | | | | LOG AFFINITY OF THE ANTAGONIST | |
|------------------------|----------------------|---|--------|--------------------------------|-----------------------|
| COMPETITIVE ANTAGONIST | | | | MEAN \pm SEM | |
| AC_1 | 1.5×10^{-5} | M | pA_2 | = | 5.32 ± 0.05 (n=5) |
| AC_1 | 1.5×10^{-6} | M | pA_2 | = | 5.65 ± 0.14 (n=5) |
| AC_2 | 1.5×10^{-5} | M | pA_2 | = | 6.19 ± 0.08 (n=6) |
| AC_2 | 1.5×10^{-6} | M | pA_2 | = | 6.25 ± 0.13 (n=6) |
| AC_3 | 1.5×10^{-5} | M | pA_2 | = | 5.55 ± 0.07 (n=5) |
| AC_3 | 1.5×10^{-6} | M | pA_2 | = | 5.66 ± 0.18 (n=5) |
| VERAPAMIL | 5×10^{-8} | M | pA_2 | = | 8.19 ± 0.03 (n=5) |
| ETHANOL | 6.9×10^{-2} | M | pA_2 | = | 1.85 ± 0.16 (n=5) |

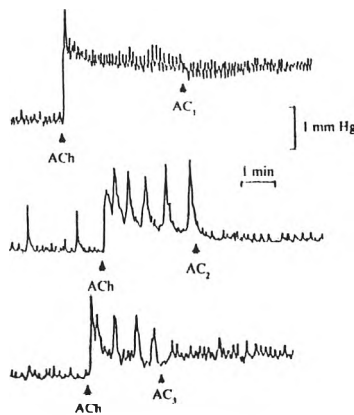
ผลการทดลองในกระเพาะอาหารหนูถีบจักรทั้งกระเพาะ

1. เมื่อใช้สารกระตุ้น acetylcholine 1×10^{-6} M

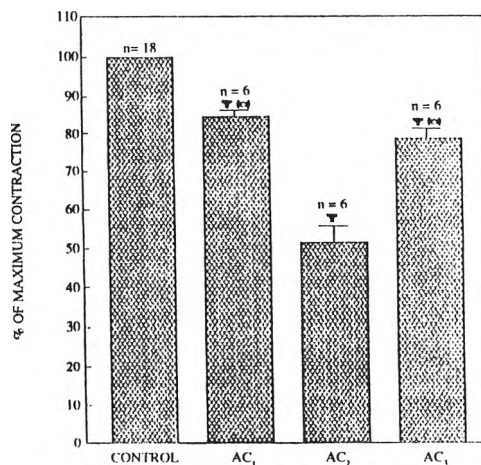
Acetylcholine ขนาดความเข้มข้น 1×10^{-6} M จะกระตุ้นกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูถีบจักรทั้งกระเพาะให้เกิดการหดเกร็งได้ โดยจะพบว่าเกิด phasic และ tonic contraction ในระยะ tonic จะพบว่าการบีบตัวมีความถี่และความแรงของการหดเกร็งเพิ่มมากขึ้นกว่าก่อนได้รับสารกระตุ้น

ผลของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ที่มีต่อการหดเกร็งของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรขณะเกิดการหดเกร็งสูงสุดเมื่อได้รับ acetylcholine 1×10^{-6} M แสดงในรูปที่ 3. ซึ่งจะเห็นผลการยับยั้งชัดเจนเมื่อใช้ AC_2

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูถีบจักรเมื่อไม่ได้รับ AC_1 , AC_2 และ AC_3 และเมื่อได้รับ AC_1 , AC_2 และ AC_3 เป็นเวลา 5 นาทีก่อนให้สารกระตุ้น acetylcholine ความเข้มข้น 1×10^{-6} M ตามลำดับนั้น ผลแสดงตามรูปที่ 4. ซึ่งจะพบว่า AC_2 ให้ผลการยับยั้งแรงที่สุด ส่วน AC_3 และ AC_1 ให้ผลรองลงมา



รูปที่ 3 แสดงผลของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ต่อการหดเกร็งของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรขณะเกิดการหดเกร็งสูงสุด โดยใช้ Acetylcholine 1×10^{-6} M



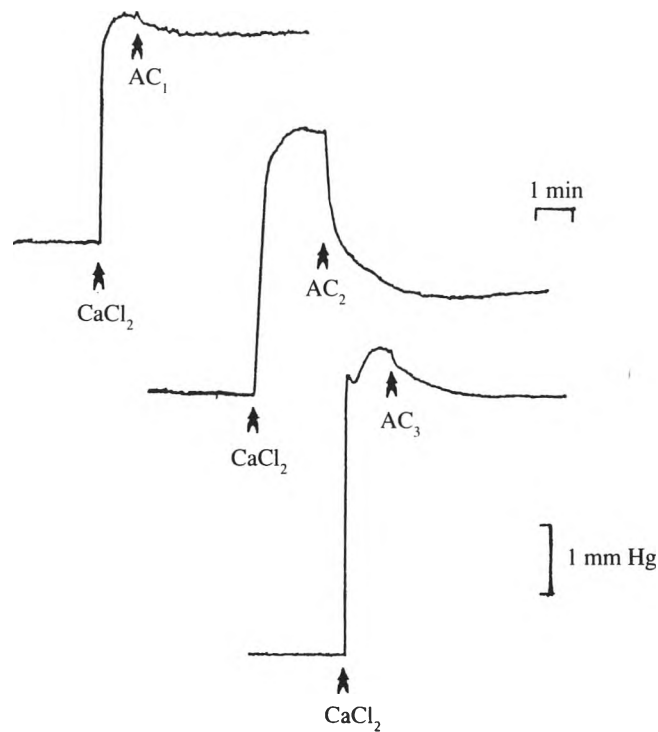
รูปที่ 4 แสดงผลเปรียบเทียบ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ที่มีต่อการหดเกร็งของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรทั้งกระเพาะนอกร่างกาย เมื่อใช้ acetylcholine 1×10^{-6} M. เป็นตัวกระตุ้นกราฟแสดงค่า $\bar{X} + SEM$.

แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

แสดงถึงความแตกต่างจาก AC_2 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

2. เมื่อใช้สารกระตุ้น CaCl_2 $1 \times 10^{-3} \text{M}$

เมื่อ depolarized กระเพาะอาหารหนูถีบจักรด้วย potassium depolarizing Tyrode's solution พบว่า spontaneous contraction จะหายไป CaCl_2 ความเข้มข้น $1 \times 10^{-3} \text{M}$ จะกระตุ้นให้เกิดการหดเกร็งแบบ phasic และ tonic contraction ได้ชัดเจน และขณะเกิดการหดเกร็งสูงสุด เมื่อได้ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ความเข้มข้น $1.5 \times 10^{-6} \text{M}$ จะพบว่าแรงหดเกร็งจะลดลงอย่างรวดเร็ว และรักษาระดับคงที่ไว้ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลายาวนานมากกว่าจะกลับคืนสู่ระดับ base line (ดูรูปที่ 5.) ผลการยับยั้ง จะเห็นชัดเจนเมื่อใช้ AC_2



รูปที่ 5 แสดงผลของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ความเข้มข้น $1.5 \times 10^{-6} \text{M}$ ที่มีต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร หนูถีบจักรทั้งกระเพาะนอกในร่างกายใน potassium depolarizing Tyrode's solution เมื่อใช้ CaCl_2 $1 \times 10^{-3} \text{M}$. เป็นตัวกระตุ้น

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่า AC_1 , AC_2 และ AC_3 มีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวและหนูถีบจักรได้ ความแรงในการยับยั้งจะขึ้นกับขนาดที่ให้ และผลการออกฤทธิ์เป็นแบบ non-specific antagonist กลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงยังไม่อาจสรุปได้ชัดเจนในขณะนี้ แต่พบว่าจะรบกวนการทำงานของ กลไกที่ควบคุม membrane permeability ได้ทั้งทาง receptor-operated calcium channel (ROC) และ potential-operated calcium channel (POC)

ผลการทดลองในกระเพาะอาหารหนูขาวพบว่า acetylcholine ในขนาดความเข้มข้นที่สูงพอจะมีผลไป depolarized cell ด้วย โดยพบว่าจะทำให้ spontaneous contraction เปลี่ยนแปลงไป โดยมีความถี่ลดลง ระยะเวลายาวนานขึ้น ซึ่งผลนี้สนับสนุนรายงานของ Bolton^(12,13) ผลจากการที่ acetylcholine ไปกระตุ้น muscarinic receptor จะทำให้ ROC เปิด และขณะเดียวกันก็มีผลใน depolarized เซลล์ด้วย จึงทำให้ POC เปิด ซึ่งจะมี Ca^{2+} ผ่าน

เข้ามาภายในเซลล์ แล้วกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อย Ca^{2+} จากแหล่งเก็บสะสมภายในเซลล์ ซึ่งทำให้ Ca^{2+} ใน cytoplasm สูงขึ้น ซึ่งจะมีผลไปกระตุ้น contractile protein (actomyosin) และเกิดการหดเกร็งขึ้นได้ กลไกของการที่ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ไปยับยั้งการหดเกร็งจากการใช้สารกระตุ้น acetylcholine นั้นอาจจะเกิดขึ้นได้หลายทางดังนี้

1. ยับยั้งการเคลื่อนที่ของแคลเซียมไอออนที่ผ่านเข้ามาทาง ROC โดยอาจจะเกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการกระตุ้น muscarinic receptor
2. ยับยั้งการเปลี่ยนแปลง membrane potential โดยป้องกันผลของ acetylcholine ที่ไป depolarized เซลล์

นอกจากนี้จากการคำนวณหาค่า pD_2 ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 พบว่าค่า pD_2 จะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของสาร ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น อาจจะไม่เป็นไปตามเงื่อนไขที่ Van Rossum และคณะ⁽¹¹⁾ เสนอสูตรนี้ไว้ Furchgott⁽¹⁴⁾ กล่าวไว้ว่ามีนักวิจัยหลายคนที่พบว่าค่า pD_2 ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสาร antagonist เพิ่มขึ้นโดยพบว่าจะเกิดขึ้นได้เมื่อสารนั้นเป็น non-specific antagonist และมี spare receptor อยู่ด้วย ดังนั้นผลการยับยั้งของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ที่ให้ผลแบบ non-competitive antagonist นั้น จึงไม่น่าจะออกฤทธิ์ที่ muscarinic receptor โดยตรง

สำหรับผลการทดลองในหนูขาวที่ใช้ $CaCl_2$ เป็นสารกระตุ้นนั้นพบว่าผลการยับยั้งเป็นแบบ competitive antagonist คล้ายกับ verapamil ความเข้มข้น $5 \times 10^{-8} M$ กลไกการออกฤทธิ์ของ verapamil พบว่าเป็นแบบ calcium entry blocker^(15,16) โดยบริเวณที่ออกฤทธิ์น่าจะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้ยังพบว่า verapamil ในขนาดความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้ามาภายในเซลล์นี้จะมีผลยับยั้ง calcium efflux ได้ด้วย⁽¹⁸⁾ ส่วนผลการยับยั้งที่เป็นแบบ reversible ได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์นี้ กลไกการเกิดไม่น่าจะเป็นแบบ true competition ที่ binding site เดียวกัน แต่ น่าจะเป็นแบบ pseudo competitive effect ที่เกิดจากการมี Ca^{2+} อิสระเพิ่มมากขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิด Ca^{2+} gradient⁽¹⁹⁾ ซึ่งจะมีผลไปลดประสิทธิภาพของ calcium entry blocker⁽¹⁵⁾ และ/หรืออาจจะมีส่วนไปเปลี่ยนแปลงทางอ้อมในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ calcium binding และ calcium translocation ก็ได้⁽²⁰⁾ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ต่อการยับยั้งการหดเกร็งจากการใช้ $CaCl_2$ อาจคล้ายกับ verapamil ก็ได้

ผลการทดลองที่ใช้กล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูถีบจักรทั้งกระเพาะพบว่า AC_1 , AC_2 และ AC_3 จะยับยั้งการหดเกร็งของกล้ามเนื้อที่เกิดจากการใช้สารกระตุ้น acetylcholine และ calcium chloride ได้ โดยจะเห็นผลชัดเจนใน tonic phase Hurwitz^(21,22) อธิบายการตอบสนองของกล้ามเนื้อแบบ phasic และ tonic phase เมื่อได้รับสารกระตุ้น Ca^{2+} ในขณะที่กล้ามเนื้อถูก depolarized ว่าการควบคุมการทำงานใน POC มี channel ที่ควบคุมอยู่ 2 subtype ชนิดแรกควบคุมการเกิด phasic contraction โดยจะถูกกระตุ้นเมื่อมี K^+ ภายนอกเซลล์ในปริมาณสูง ๆ และถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณ Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ในความเข้มข้นสูง ส่วน channel อีกชนิดหนึ่งควบคุม tonic contraction โดยจะถูกยับยั้ง เมื่อมี K^+ ภายนอกเซลล์ในปริมาณสูง ๆ และถูกกระตุ้นเมื่อมี Ca^{2+} ภายนอกเซลล์ ความเข้มข้นสูง ๆ ดังนั้นเมื่อ channel ชนิดแรกที่ควบคุม phasic contraction เปิด channel ที่ควบคุม tonic contraction จะถูกยับยั้งและเมื่อ channel ชนิดแรกถูกยับยั้ง channel ชนิดหลังจะถูกกระตุ้น ดังนั้นการที่ AC_1 , AC_2 และ AC_3 สามารถยับยั้งการหดเกร็งในระยะ tonic phase ได้ชัดเจน (รูปที่ 5) นั้น จึงอาจจะกล่าวได้ว่า กลไกการออกฤทธิ์ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ควรเป็นแบบ calcium entry blocker โดยบริเวณที่ออกฤทธิ์อาจจะ

จับกับ macromolecule ใน channel ของ POC ที่ควบคุม tonic contraction ซึ่งผลที่ได้สนับสนุนกลไกการออกฤทธิ์ของ AC_1 , AC_2 และ AC_3 ที่มีต่อกล้ามเนื้อกระเพาะปัสสาวะที่ทำการทดลองเปรียบเทียบกับ verapamil ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว

จากผลการวิจัยทั้งหมดที่กล่าวมานี้คงจะเป็นข้อมูลส่วนหนึ่งเพื่อประกอบการพิจารณาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรต่อไป ซึ่งข้อมูลที่ได้ ให้ผลสนับสนุนรายงานการใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจร สำหรับรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารทั้งจากรายงานในคลินิกและจากแพทย์แผนโบราณโดยเฉพาะผลของ AC_2 ซึ่งเห็นฤทธิ์ยับยั้งชัดเจนมาก คาดว่าผลการวิจัยนี้คงจะเกิดประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยสมุนไพรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. บุศบรรณ ฅ สงขลา. (2525). *สมุนไพรไทยตอนที่ 1*. กรุงเทพมหานคร : หจก. พันธุ์พืชลิ่ง.
2. เพียววี เหมือนนวงษ์ญาติ. (2529). *ตำราสมุนไพรวิทยาศาสตร์*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ เมดิคัลมีเดีย.
3. มหาวิทยาลัยมหิดล. คณะเภสัชศาสตร์. หน่วยข้อมูลสมุนไพร. (2532). *สมุนไพรไม่ใช่ยาหม้อ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : หน่วยข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.
4. Nazimudeen, S.K., Ramaswamy, S., and Kameswaran, L. (1978). Effect of *Andrographis paniculata* on Snake Venom Induced Death and its Mechanism. *Indian J. Pharm. Sci.* 40, 132-133.
5. Garcia, L.L., Kintanar, Q.L., Fojas, F.R., Sison, F.M., Chua N.G., and Villanueva, B.A. (1980). Pharmacologic studies on the leaves of *Andrographis paniculata* Nees. plant grown in the Philippines. *Acta Med. Philipp.* 16(2), 59-68.
6. เพชรรัตน์ พงศ์จรรยากุล. ฤทธิ์ของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาสรีรวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. ผจงศิลป์ เพ็งมาก. (2531) ผลของ 14-ดีออกซี-11, 12- ไดดีไฮโดรแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็กนอกร่างกาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาสรีรวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
8. Nakanishi, K., et al. (1965). Phytochemical Survey of Malaysian Plants Preliminary Chemical and Pharmacological Screening. *Chem. Pharm. Bull.* 13(7), 882-890.
9. Dutta, A., and Sukul, N.C. (1982). Filaricidal properties of a wild herb, *Andrographis paniculata*. *J. Helminthol.* 56, 81-84.
10. Vane, J.R. (1957). A Sensitivity Method for the Assay of 5-HT. *Br. J. Pharmacol.* 12, 344-349.
11. Van Rossum, J.M., Hurkmans, J.A. Th. M., and Wolters, C. J. J. (1963). Cumulative dose-response curves. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. int. Pharmacodyn.* 143 (3-4), 299-330.
12. Bolton, T.B. (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59, 606-718. a.
13. ——— (1979). Cholinergic mechanisms in smooth muscle. *Br. Med. Bull.* 35 (3), 275-283. b.
14. Furchgott, P.F. (1964). Receptor mechanism. *Ann. Rev. Pharmacol.* 4, 21-50.
15. Godfraind, T., Miller, R., and Wibo, M. (1986). Calcium antagonism and Calcium Entry Blocker. *Pharmacol. Rev.* 38(4), 321-416.
16. Hausler, G. (1972). Differential effect of verapamil on excitation contraction coupling in smooth muscle on excitation-secretion coupling in adrenergic nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 180, 672-682.

17. Bohr, D.F. (1964.) Electrolytes and smooth muscle contraction. *Pharmacol. Rev.* 16, 85-111.
18. Speeding, M. (1963). Direct inhibitory effect of some "calcium antagonists" and trifluoperazine on the contractile proteins in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 79, 225-231.
19. Arunlakshana, O., and Schild, H.O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonist *Br. J. Pharmacol.* 14, 48-58.
20. Rosenberger, L.B., Ticku, M.K., and Triggle, D.J. (1979). The effect of Ca^{2+} antagonists on mechanical responses and Ca^{2+} movement in quinea pig ileal longitudinal smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57(4), 333-347.
21. Hurwitz, L., Mc Guffee, L.J., Little, S.A. and Blumberg, H. (1980). Evidence for Two distinct Types of Potassium Activated Calcium Channels in an Intestinal Smooth Muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241, 574-580.
22. Hurwitz, L. (1986). Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 225-258.

EFFECTS OF ANDROGRAPHOLIDE, NEOANDROGRAPHOLIDE AND 14-DEOXY-11, 12-DIDEHYDRO ANDROGRAPHOLIDE ON ISOLATED RAT STOMACH SMOOTH MUSCLE CONTRACTION.

*Vanida Sangalunkarn**
*Prasan Dhumma-Upakorn***
*Uma Kitiyanee***
*Chaiyo Chaichantipyuth****

ABSTRACT

This report presents the *in vitro* study of pharmacological effects of three members in the diterpenoid lactone group (andrographolide, neoandrographolide and 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide) which were extracted from a native Thai plant named *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees. In the dose of 1.5×10^{-5} and 1.5×10^{-6} M. they had antispasmodic effect on isolated rat and mice stomach smooth muscle preparation. Their effects on rat stomach strips showed non-competitive antagonism to spasmogenic activity of acetylcholine and in rat stomach strips depolarized by potassium chloride in high concentration, they showed competitive antagonism to spasmogenic activity of calcium chloride. In depolarizing condition, their competitive antagonistic effects were the same as those obtained from 5×10^{-8} M. verapamil. The inhibitory potencies were dose-dependent. In whole isolated mice stomach, the extracts reduced phasic and tonic contraction, especially in tonic phase, induced by acetylcholine and calcium chloride. The results of the present study indicated that the extracts were non-specific antagonist. Although several mechanisms are possible, the results suggest that they may act as calcium-entry blocker. The antispasmodic effect supports the clinical use of this native plant in diarrheal disorder of the gastrointestinal tract. (Th. J. Pharm. Sci. Vol.15 No.1 5-17 (1990))

This research work was partially supported by Graduate School, Chulalongkorn University.

*Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Mahidol University.

**Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

***Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.