

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวในหลอดทดลองและในร่างกายของหนูแรท

นันทยา สมภาร*, จริญญาพร เนาวบุตร*, ศุภเกต แสนทวีสุข**, อัจฉราพร แก้วหมอ***

บทคัดย่อ

- บทนำ:** การศึกษาทางวิทยาศาสตร์พบว่า ผักแพวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีสารต้านอนุมูลอิสระมากมายเป็นส่วนประกอบ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลต่อระดับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพว (*Polygonum odoratum* L.) ซึ่งเป็นผักสมุนไพรพื้นบ้านที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
- วิธีการศึกษา:** ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวที่สกัดด้วยเอทานอลในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity (DPPH) ทำการศึกษาความสามารถในการเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายในหนูพันธุ์ Sprague-Dawley โดยป้อนสารสกัดผักแพวขนาด ๕๐๐ และ ๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา ๗ วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างตับเพื่อศึกษาการแสดงออกของจีนและระดับโปรตีนของ heme oxygenase (HO-1) และ γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL) โดยวิธี Quantitative Real-Time RT-PCR และ Western blot analysis ตามลำดับ และประเมินผลของสารสกัดต่อการทำงานของตับและไตโดยวัดระดับ aspartate
- ผลการศึกษา:** ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดผักแพวมีค่า EC_{50} เท่ากับ 50.25 ± 0.61 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ vitamin E และ Butylatedhydroxytoluene (BHT) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 14.75 ± 0.78 และ 1.71 ± 0.07 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของตับและไต และการวัดระดับเอนไซม์ AST, ALT และ Cr ในซีรัมของสัตว์ทดลองไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่า สารสกัดผักแพวไม่เป็นพิษต่อตับและไตของสัตว์ทดลอง นอกจากนี้พบว่า สารสกัดผักแพวขนาดสูง (๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกายคือ heme oxygenase (HO-1) และ γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** สารสกัดผักแพวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้ การได้รับสารสกัดผักแพวน่าจะมีประโยชน์ในการเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงผลของการได้รับสารสกัดในระยะยาวและการศึกษาด้านพิษวิทยาเพิ่มเติม

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น, ผักแพว, ฮีโมออกซีจีเนส, แกรมมากูลูตามิลซิสทีนไลเอส

วันที่รับบทความ: ๑ กรกฎาคม ๒๕๕๖

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๒ ธันวาคม ๒๕๕๖

* สาขาเภสัชวิทยา สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ๑๒๑๒๐

** สาขาเภสัชวิทยา สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ๑๒๑๒๐

*** สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ๓๐๐๐๐

ผู้ให้ติดต่อ: อาจารย์ ดร.นันทยา สมภาร สาขาเภสัชวิทยา สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ๑๒๑๒๐ โทรศัพท์: ๐๖๒-๕๒๖๕๗๒๕ โทรสาร: ๐๖๒-๕๒๖๕๗๑๑ อีเมล: nuntiya_tom@hotmail.com

บทนำ

ภาวะไม่สมดุลระหว่างการสร้างอนุมูลอิสระ (free radical) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่เป็นเอนไซม์ (antioxidant defense enzymes) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ภายในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งภาวะเครียดออกซิเดชันนี้ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์และส่งผลเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ ภายในเซลล์ ทั้งดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน อนุมูลอิสระเหล่านี้ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายมนุษย์ จากการศึกษาพบว่า ภาวะเครียดออกซิเดชันสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพหลายๆ อย่าง เช่น กระบวนการชรา (ageing process) โรคเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (chronic inflammation disease) โรคหัวใจ และหลอดเลือด รวมทั้งมะเร็ง^๑ จากการศึกษาอย่างกว้างขวางในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางคลินิกพบว่า การรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันและบรรเทาพยาธิสภาพที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้^{๒-๓}

ผักและผลไม้มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ กว่าร้อยชนิด ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระเพื่อลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระดังกล่าวได้โดยตรง^{๔-๕} นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากพืชยังสามารถเพิ่มศักยภาพของระบบต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้ โดยเพิ่มการแสดงออกของจีน (gene expression) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระหรือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ (cytoprotective enzymes) ทำให้ร่างกายมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น^๖ การศึกษาจำนวนมากพบว่า การแสดงออกของจีนที่ควบคุมเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ เช่น heme oxygenase (HO-1) และ γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL) สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยผ่านการกระตุ้น redox-sensitive transcriptional factors^{๗-๘}

HO-1 เป็น rate limiting step enzyme ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของฮีม ได้ผลผลิตเป็น biliverdin จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น bilirubin ซึ่งสาร bilirubin นี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ HO-1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบสูง^๙ มีรายงานว่า HO-1 มีส่วนสำคัญในการป้องกันและบรรเทาพยาธิสภาพของโรคต่างๆ ในสัตว์ทดลอง เช่น sepsis และ ischemic reperfusion injuries จากการศึกษาพบว่า สาร phytochemical ต่างๆ เช่น caffeic acid, phenethyl ester, resveratrol และ curcumin ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จากภาวะ ischemia-reperfusion

มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของจีน HO-1^{๙, ๑๐} นอกจากเอนไซม์ HO-1 แล้ว ยังพบว่า เอนไซม์ γ -GCL มีศักยภาพในการป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันได้เช่นกัน โดยพบว่า γ -GCL เป็นเอนไซม์หลักในการควบคุมการสร้างสาร glutathione (GSH) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น curcumin และ beta-naphthoflavone สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ γ -GCL ขึ้นได้^{๑๑, ๑๒} จะเห็นได้ว่าสาร phytochemicals ต่างๆ มักจะออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของสองจีนนี้

ผักแพวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Polygonum odoratum* Lour. อยู่ในวงศ์ Polygonaceae เป็นผักพื้นบ้านจำพวกพืชล้มลุกที่มีลักษณะใบเรียวยาว และมีกลิ่นแรง ลำต้นเป็นข้อปล้องเหมือนไผ่ ในแต่ละท้องถื่นมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคอีสานเรียกว่าผักแพ้ว ผักพริกม้า ผักจันทน์โหม ภาคเหนือเรียกผักไผ่ ผักแพว เกิดเองตามธรรมชาติ สรรพคุณส่วนใหญ่ยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รับรอง เนื่องจากเป็นพืชเฉพาะถิ่น พบเฉพาะในประเทศแถบเอเชีย เช่น ประเทศเวียดนาม และประเทศไทย จึงยังไม่มีการศึกษาจำนวนมาก การศึกษาทางวิทยาศาสตร์บางส่วนพบว่า ผักแพวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระมากมายเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ rutin, catechin, quercetin, kampferol และ isorhamnetin^{๑๓} สารสกัดจากผักแพวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และมีผลในการรักษาระดับของกลูตาไธโอนในร่างกายของสัตว์ทดลอง^{๑๔} จากการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางพบว่า สาร catechins เป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เป็นสารโภชนเภสัช (nutraceutical) ที่มีศักยภาพในด้านประโยชน์กับสุขภาพ มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่จับกับอนุมูลอิสระ และเป็น chelating agent ที่รวมตัวกับไอออนของโลหะหนัก ส่วน quercetin เป็นสารฟลาโวนอยด์หรือไฟโตนิวเทรียนท์ (phytonutrients) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช มีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคได้หลายประเภท เช่น มีฤทธิ์ในการป้องกันการอักเสบ ป้องกันแบคทีเรียและไวรัส ป้องกันอาการแพ้ ปกป้องหลอดเลือด ป้องกันมะเร็ง ชะลอความชรา ป้องกันโรคที่มาพร้อมกับความเสื่อมต่างๆ รวมทั้งโรคทางระบบประสาทที่เกิดจากความเสื่อม (neurodegenerative diseases) อีกด้วย^{๑๕}

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาความสามารถของสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลในการกระตุ้นการแสดงออก

ของเอนไซม์ HO-1 และเอนไซม์ γ -GCL ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย พบว่า เมื่อให้สัตว์ทดลองได้รับสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลเป็นเวลา ๑ สัปดาห์ มีผลเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวได้

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัด

ผักแพวที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ นำมาจากตลาดไท ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน พ.ศ. ๒๕๕๕ จากนั้นนำผักแพวมาล้างทำความสะอาดแล้วตัดทั้งก้านและใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำผักแพวไปตากให้แห้ง แล้วนำไปแช่ใน ๕๐% เอทานอลเป็นเวลา ๒ วัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -๘๐ องศาเซลเซียส โดย % yield ของสารสกัดผักแพวแห้งต่อน้ำหนักพืชที่ได้คือ ร้อยละ ๑.๐๑๒

สัตว์ทดลอง

การศึกษาในสัตว์ทดลองครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (AE002/2012) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ และหลัก 3Rs โดยทำการศึกษาในหนูแรท เพศผู้พันธุ์ Sprague -Dawley อายุประมาณ ๘ สัปดาห์ น้ำหนัก ๒๕๐ - ๒๗๐ กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ ๒๕ ± ๑ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๖๐ ควบคุมแสงสว่างมืด ๑๒ ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำไม่จำกัดปริมาณ เลี้ยงสัตว์ทดลอง ๑ สัปดาห์ก่อนการทดลอง จากนั้นทำการแบ่งหนูแรทออกเป็น ๓ กลุ่มๆ ละ ๖ ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ ๑: หนูปกติควบคุม ได้รับตัวทำละลาย (น้ำกลั่น)

กลุ่มที่ ๒: หนูปกติ ได้รับสารสกัดผักแพวขนาด ๕๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ ๓: หนูปกติ ได้รับสารสกัดผักแพวขนาด ๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

ขั้นตอนการทดลอง

ซึ่งนำหนีสัตว์ทดลองทุกกลุ่มก่อนการทดลอง จากนั้นป้อนตัวทำละลาย และสารสกัดผักแพวทั้ง ๒ ขนาด แก่สัตว์ทดลองด้วย intragastric tube วันละ ๑ ครั้งเป็นเวลา ๗ วัน

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองทำการสับสัตว์ทดลองด้วยอีเทอร์ จากนั้นเก็บเลือดจากหัวใจและกำซาบ (perfuse) สัตว์ทดลองด้วยน้ำเกลือ และ 4% paraformaldehyde จากนั้นเก็บอวัยวะตับ และไต ตรึงไว้ใน 4% paraformaldehyde

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอล ทดสอบโดยวิธีการของ Okawa และคณะ^{๑๖} เตรียมสารละลายของ DPPH ที่ความเข้มข้น ๐.๐๘ มิลลิโมลาร์ ในสารละลายเอทานอล ๑๐๐% หลังจากนั้นผสมสารละลาย DPPH, tris buffer solution และ ๘๐% เอทานอล ในอัตราส่วน ๑:๑:๑ เพื่อให้ได้สารผสมปริมาตร ๑.๘ มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารสกัดจากตัวอย่างปริมาตร ๐.๖ มิลลิลิตร (ในกรณีของสารมาตรฐานจะเติมสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ลงไปแทนสารสกัดจากตัวอย่าง โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน) ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ ๒.๔ มิลลิลิตร ปั่นปฏิกิริยาไว้นาน ๓๐ นาที ในที่มืด วัดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ ๕๒๕ นาโนเมตร

Histopathology of hepatocyte and renal corpuscle

หลังจากการทดลอง ทำการเก็บตับและไตใส่ใน 4% paraformaldehyde เพื่อทำการตรึงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ และฝังชิ้นเนื้อลงในพาราฟิน แล้วตัดชิ้นเนื้อหนา ๕ ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโตม แล้วทำการย้อมสี hematoxylin และ eosin (H & E) เพื่อดูลักษณะทางจุลกายวิภาคของเซลล์ตับ และไตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การประเมินผลของสารสกัดต่อการทำงานของตับและไต

การวัดระดับของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) และ creatinine (Cr) ในซีรัม

หลังการทดลองทำการเก็บเลือดจากหัวใจ จากนั้นปั่นแยกซีรัมที่ ๒,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๐ นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวัดค่า เอนไซม์ AST, ALT และ Cr ในซีรัม โดยส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

การประเมินการแสดงออกของจีน (Gene expression analysis)

ทำการประเมินการแสดงออกของจีนด้วยวิธี Quantitative Real-Time RT-PCR โดยทำการสกัด RNA จากตับของสัตว์ทดลองด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction จากนั้น

นำ RNA ที่ได้ไปเปลี่ยนเป็น cDNA (reverse- transcription) โดยใช้ RNA ๕ ไมโครกรัม oligo (dT)₁₅ primer ๐.๕ ไมโครกรัม dNTP ๑ มิลลิโมล ribonuclease inhibitor ๒๐ ยูนิต ImProm-II™ reverse transcriptase ๑ ไมโครลิตร (Promega, Madison, WI, USA), 5X reaction buffer และ MgCl₂ ๓ มิลลิโมลาร์ จากนั้น นำ cDNA ที่ได้จำนวน ๒ ไมโครลิตร มาทำการเพิ่มจำนวน ด้วยวิธี Real time-polymerase chain reaction ด้วย SsoFast™ EvaGreen® supermix with low ROX (Bio-Rad®) โดยใช้ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) เป็น internal control คำนวณการแสดงออกของจีนในกลุ่มที่ได้รับ สารสกัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (fold changes in gene expression from control)

Western blot analysis

หลังจากป้อนสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลครบ ๗ วัน ทำการสับลัตว์ทดลองด้วยอีเทอร์ และเก็บตับจาก ลัตว์ทดลอง ล้างเลือดออกด้วย PBS buffer เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นทำการเตรียมโปรตีนโดยสกัด cytosol protein โดยใช้ cell lysis buffer จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปหาปริมาณ โปรตีนโดยใช้ Bradford reagent for protein assay แล้วนำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี Western blotting ใช้สารภูมิต้านทานที่จำเพาะต่อ HO-1 (sc-1796, Sant Cruz Biotechnology, Inc) และ γ -GCL (sc-15078, Santa Cruz Biotechnology, Inc) โดยใช้ Actin (sc-8432, Santa Cruz Biotechnology, Inc) เป็น internal control แล้วทำการตรวจสอบ โดยน้ำยา ECL และถ่ายภาพเรืองแสง chemiluminescence ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดย Gel-Pro Analyzer densitometry software

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ข้อมูลทั้งหมดจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.E.M.) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SigmaStat คำนวณค่าสถิติทางสถิติวิเคราะห์ด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) และ Student's t-test โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่น $> 95\%$ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

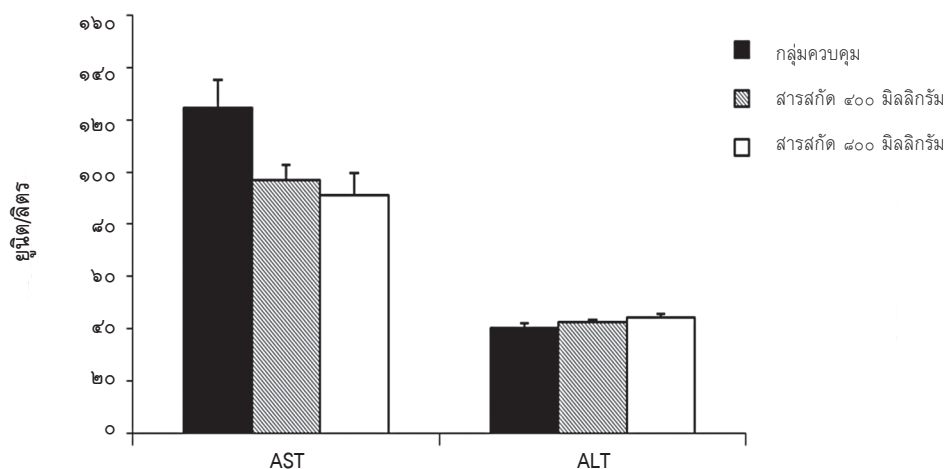
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลในหลอดทดลอง

ผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดผักแพวมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 50.25 ± 0.66 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ vitamin E และ Butylatedhydroxytoluene (BHT) มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 14.75 ± 0.77 และ 14.71 ± 0.77 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาชนิดขององค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดผักแพว โดยกลุ่มศึกษาวิจัยมาตรฐานสมุนไพร (Phytochemical research group) องค์การเภสัชกรรม พบว่า สารสกัดผักแพว ประกอบด้วย สารกลุ่ม flavonoids, alkaloids, phenolic compound และ tannin

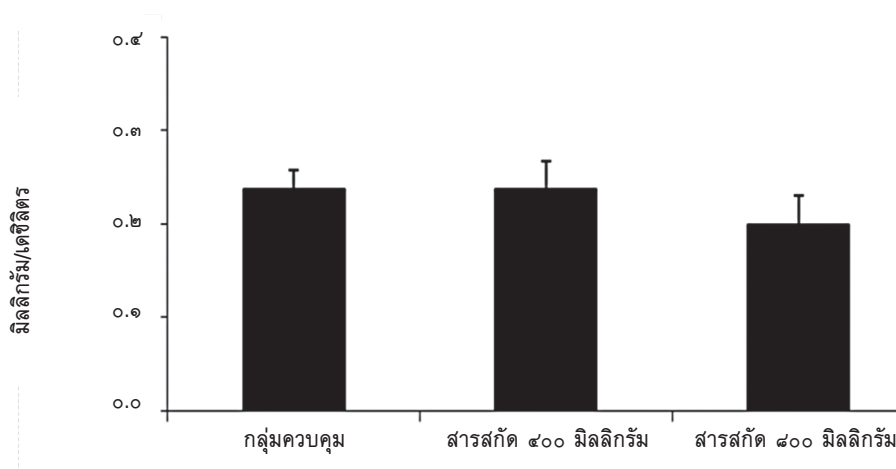
การประเมินผลของสารสกัดต่อการทำงานของตับและไต

จากการทดลองป้อนสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอล ในขนาด ๔๐๐ และ ๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ในหนูแรทเป็นเวลา ๗ วัน และเก็บซีรัม เพื่อตรวจหาค่า เอนไซม์การทำงานของตับ (AST และ ALT) และเอนไซม์การทำงานของไต (Cr) ผลการศึกษาพบว่า ระดับซีรัม AST, ALT และ Cr ของลัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา ๗ วัน ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาแสดงไว้ในแผนภูมิที่ ๑ และ ๒ นอกจากนี้ผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและไต พบว่า ลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับและไตในกลุ่มที่ได้รับ สารสกัดขนาด ๔๐๐ และ ๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีลักษณะปกติไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ ๑ และ ๒) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้ง ๒ ขนาด ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับและไต ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาระดับซีรัม AST, ALT และ Cr แสดงให้เห็นว่า การได้รับสารสกัดผักแพวที่สกัดด้วยเอทานอลทั้ง ๒ ขนาดเป็นเวลา ๗ วัน ไม่มีความเป็นพิษต่อตับและไตของลัตว์ทดลอง



ผลการทดลองแสดงในรูป mean $\pm$ S.E.M.

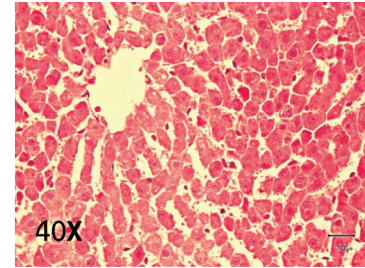
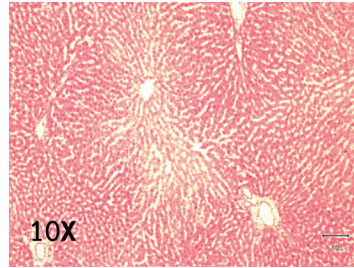
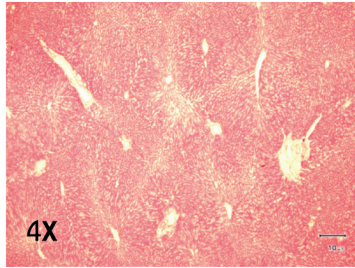
แผนภูมิที่ ๑ แสดงระดับซีรั่ม aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase ของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลเป็นเวลา ๗ วัน



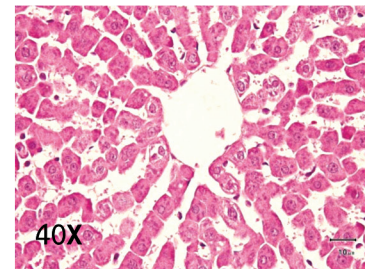
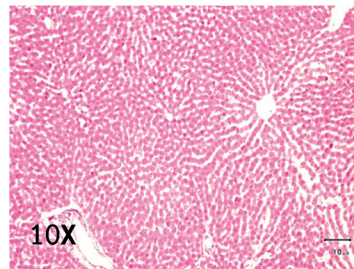
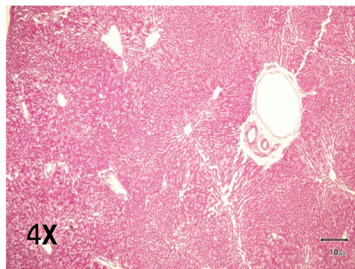
ผลการทดลองแสดงในรูป mean $\pm$ S.E.M.

แผนภูมิที่ ๒ แสดงระดับซีรั่ม creatinine ของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลเป็นเวลา ๗ วัน

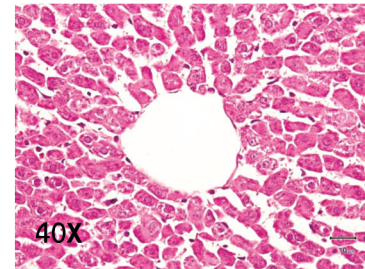
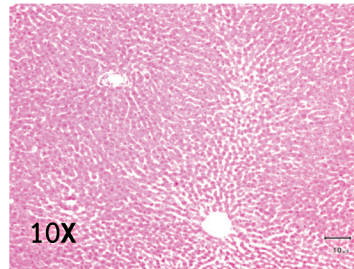
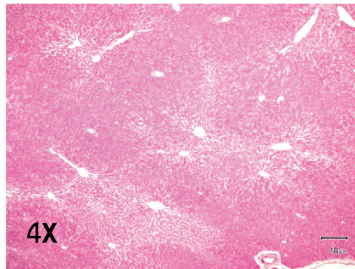
(A)



(B)

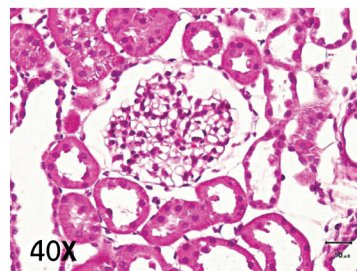
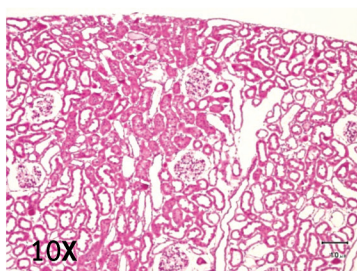
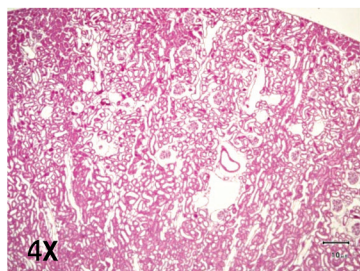


(C)

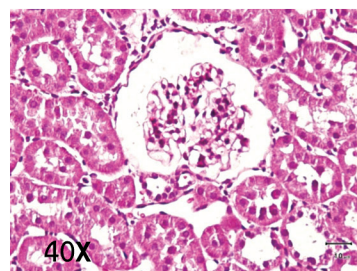
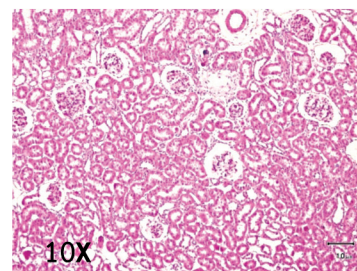
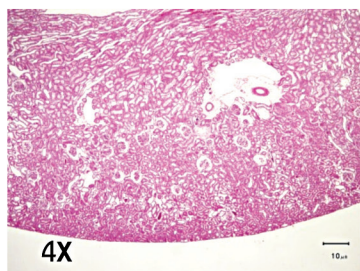


รูปที่ ๑ แสดงเนื้อเยื่อตับเปรียบเทียบระหว่างหนูปกติและหนูที่รับสารสกัดผักแพวหนูที่ได้รับตัวทำละลาย (A) หนูที่ได้รับสารสกัดผักแพวขนาด ๔๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (B) และหนูที่ได้รับสารสกัดผักแพวขนาด ๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (C) ย้อมด้วย H & E แสดงภาพกำลังขยาย 4X, 10X และ 40X

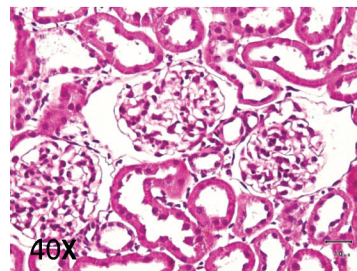
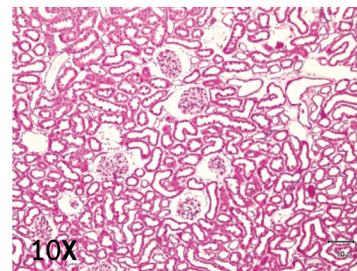
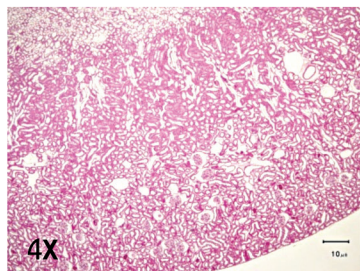
(A)



(B)



(C)



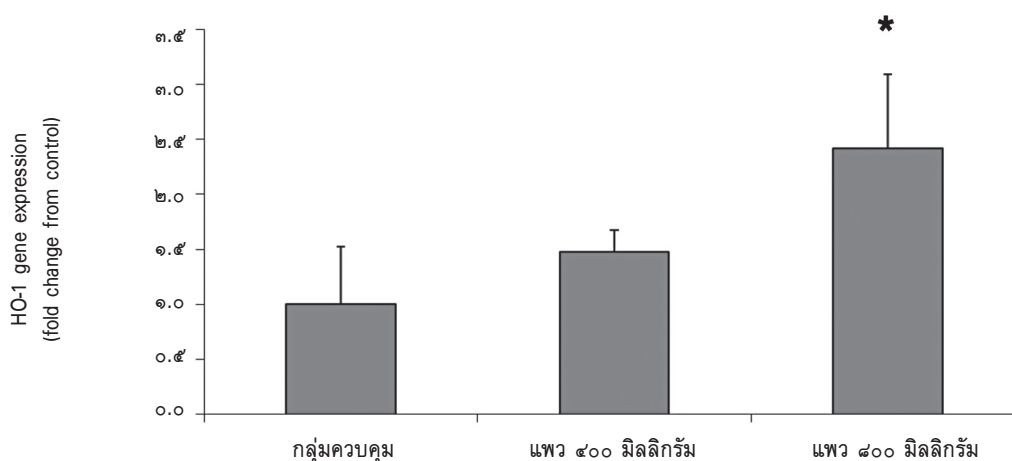
รูปที่ ๒ แสดงเนื้อเยื่อไตเปรียบเทียบระหว่างหนูปกติและหนูที่รับสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลหนูที่ได้รับตัวทำละลาย (A) หนูที่ได้รับสารสกัดผักแพวขนาด ๕๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (B) และหนูที่ได้รับสารสกัดผักแพวขนาด ๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (C) ย้อมด้วย H & E แสดงภาพกำลังขยาย 4X, 10X และ 40X

ผลการศึกษาของสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลต่อการแสดงออกของจีนและโปรตีนของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย: เอนไซม์ γ -GCL และ HO-1

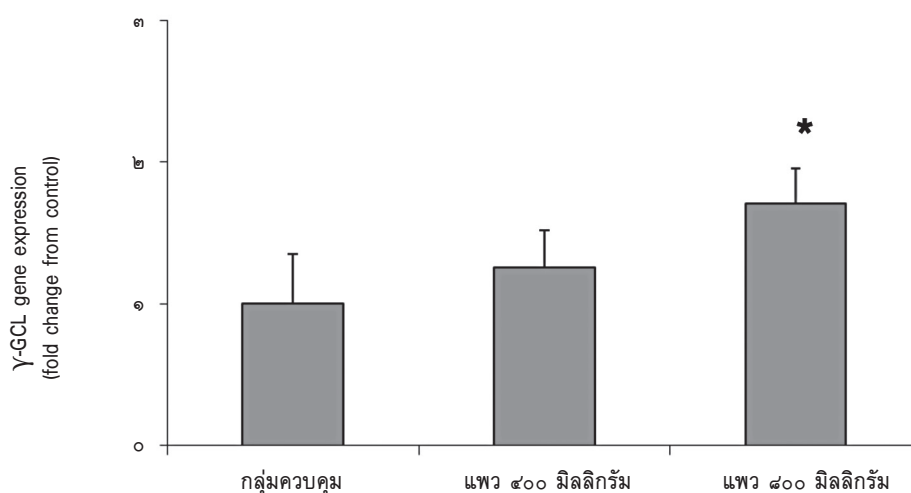
การประเมินการแสดงออกของจีน γ -GCL และ HO-1 ด้วยวิธี Quantitative Real-Time RT-PCR ผลการศึกษาพบว่า การได้รับสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลมีผลกระตุ้นการแสดงออกของจีน γ -GCL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลขนาด ๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ต่อวัน เป็นเวลา ๗ วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < ๐.๐๕$) ผลการศึกษาแสดงไว้ในแผนภูมิที่ ๓ ซึ่งการแสดงออกของจีนดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอล (รูปที่ ๓)

A: การแสดงออกของ HO-1 จีน

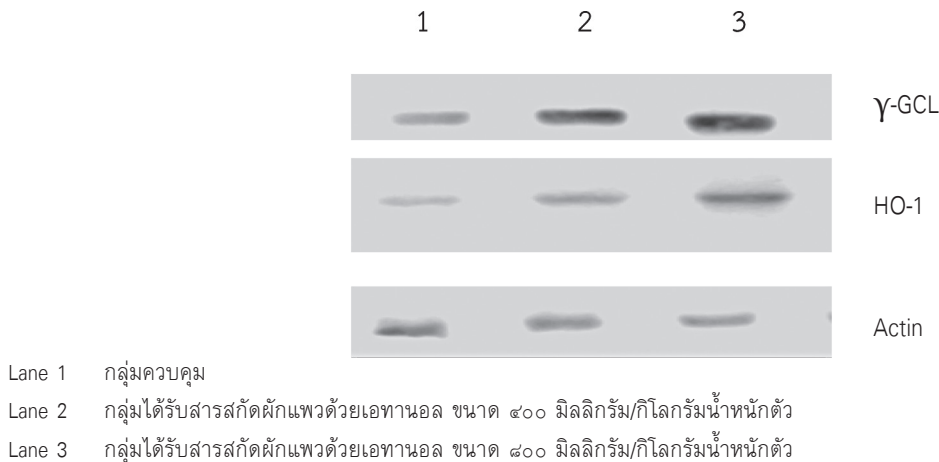


B: การแสดงออกของ γ -GCL จีน



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < ๐.๐๕$)

แผนภูมิที่ ๓ แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของ heme oxygenase (HO-1) และ γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL) จีน



รูปที่ ๓ แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของ heme oxygenase (HO-1) และ γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL) โปรตีน

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH assay พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งฤทธิ์ค่อนข้างอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับ α -Tocopherol และ BHT ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารสกัดแบบหยาบ (crude extract) ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ต่อปริมาณสารที่ใช้ในการทดลองมีน้อยเมื่อเทียบกับ α -Tocopherol และ BHT ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ การตรวจองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดผักแพวที่ใช้ในการศึกษา พบว่า ประกอบด้วยสารกลุ่ม flavonoids, alkaloids, phenolic compound และ tannin ทั้งนี้การตรวจดังกล่าวเป็นเพียงการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น ไม่สามารถบอกชนิดของสารออกฤทธิ์ในแต่ละกลุ่มรวมทั้งปริมาณของสารออกฤทธิ์ได้

γ -GCL เป็นเอนไซม์สำคัญในการควบคุมการสร้างสาร glutathione (GSH) GSH เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสำคัญในเซลล์ จากการศึกษาพบว่า การขาด GSH ส่งผลให้เซลล์บาดเจ็บจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้ง่ายขึ้น ในทางตรงกันข้ามหากเซลล์มีระดับ GSH สูงขึ้นจะสามารถปรับตัวป้องกันตนเองจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้^{๑๗, ๑๘} การทำงาน γ -GCL และการเพิ่มการทำงานหรือการแสดงออกของเอนไซม์นี้บ่งบอกถึงภาวะของร่างกายที่มีการปรับตัวต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้น^{๑๘ - ๒๔} การเพิ่มขึ้นของสาร GSH นั้นมีผลในการเพิ่มการป้องกันเซลล์จากสารพิษต่างๆ ในขณะที่ภาวะขาด GSH จะทำให้เพิ่มความไวใน

การเกิดเนื้องอกและการบาดเจ็บของเซลล์^{๒๕} การเพิ่มระดับสาร GSH โดยการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ γ -GCL ด้วยสารสกัดจากธรรมชาตินั้นได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษาในเซลล์ RAW 264 โดยให้สารเบต้าแคโรทีนพบว่า สารดังกล่าวมีผลเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ โดยการเพิ่มการสังเคราะห์สาร GSH และการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ γ -GCL^{๒๖} และการศึกษาผลของสารสกัดเบอร์รี่ประกอบไปด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอลสามารถกระตุ้น การทำงานของ γ -GCL ในหนูเมาส์ได้^{๒๗} นอกจากนี้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สามารถเพิ่มปริมาณ GSH โดยการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ γ -GCL เช่นกัน^{๒๘}

เอนไซม์ HO-1 เป็นเอนไซม์สำคัญตัวหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในระบบต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย มีการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของเอนไซม์นี้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ การแสดงออกของเอนไซม์ HO-1 สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน เช่น โลหะหนัก ภาวะเลือดมีออกซิเจนต่ำ ภาวะขาดเลือด การอักเสบ ภาวะช็อกจากความร้อน และไซโตไคน์ ซึ่งภาวะเครียดออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำของสารเหล่านี้ จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ HO-1 ซึ่งเป็นการตอบสนองของเซลล์เพื่อป้องกันการบาดเจ็บจากภาวะเครียดออกซิเดชัน^{๒๙} จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สารสกัด *Syzygium formosanum* มีส่วนประกอบของสารกลุ่มฟีนอลิก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ HO-1 ได้^{๓๐} นอกจากนี้ยังพบว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถป้องกันเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำ

ด้วยสาร tert-Butyl hydroperoxide ในเซลล์ rat primary hepatocytes ได้ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของจีน HO-1 และ γ -GCL^{๓๑} ทั้งนี้ยังพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระ quercetin ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำด้วยเอทานอลได้ ซึ่งกลไกดังกล่าว เกิดจากการกระตุ้นการแสดงออกของจีน HO-1^{๓๒}

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดผักแพวด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับ Tocopherol และ BHT ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้พบว่า สารสกัดผักแพวสามารถออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรงและสามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีน HO-1 และ γ -GCL ได้ ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า สารสกัดผักแพวจะมีประโยชน์ในการเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย อย่างไรก็ตาม การรับประทานสารสกัดผักแพวยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของผลของการได้รับสารสกัดผักแพวในระยะยาว รวมทั้งการศึกษาพิษวิทยาเต็มรูปแบบและการแยกปริมาณสารประกอบสำคัญในสารสกัดมาใช้ในการวิจัยเพื่อยืนยันผลการศึกษานี้ให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
- Kukongviriyapan V, Janyacharoen T, Kukongviriyapan U, Laupattarakasaem P, Kanokmedhakul S, Chantaranonthai P. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Tetracera loureiri*. *Phytother Res* 2003;17:717-21.
- Tesorieri L, D'Arpa D, Butera D, Allegra M, Renda D, Maggio A, et al. Oral supplements of vitamin E improve measures of oxidative stress in plasma and reduce oxidative damage to LDL and erythrocytes in beta-thalassemia intermedia patients. *Free Radic Res* 2001;34:529-40.
- Beevi SS, Narasu ML, Gowda BB. Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant Foods Hum Nutr* 2010;65:8-17.
- Hamad I, Erol-Dayi O, Pekmez M, Onay-Ucar E, Arda N. Antioxidant and cytotoxic activities of *Aphanes arvensis* extracts. *Plant Foods Hum Nutr* 2010;65:44-9.
- Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 2002;14:879-97.
- Dickinson DA, Iles KE, Zhang H, Blank V, Forman HJ. Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *FASEB J* 2003;17:473-5.
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 2004;279:8919-29.
- Scapagnini G, Foresti R, Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Green CJ, Motterlini R. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol* 2002;61:554-61.
- Ryter SW, Morse D, Choi AM. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:175-82.
- Devey L, Mohr E, Bellamy C, Simpson K, Henderson N, Harrison EM, et al. c-Jun terminal kinase-2 gene deleted mice overexpress hemoxygenase-1 and are protected from hepatic ischemia reperfusion injury. *Transplantation* 2009;88:308-16.
- Moinova HR, Mulcahy RT. An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem* 1998;273:14683-9.
- Nanasombat S, Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *JMPR* 2009;3:443-9.

๑๔. Pannangpetch P, Jaruchotikamol A, Kukongviriyapan V, Kongyingyoes B, Yutanaviboonchai W. Lipid peroxidation-inhibiting and glutathione maintaining activities of *Polygonum odoratum* Lour. The 4th International Congress of Pathophysiology; 2002; Budapest, Hungary.
๑๕. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 2012;83:6-15.
๑๖. Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Pharm Bull* 2001;24:1202-5.
๑๗. al Casey S, Brewster D, Viau C, Acosta D. Effect of glutathione depletion and oxidative stress on the in vitro cytotoxicity of velnacrine maleate. *Toxicol Lett* 1995;76:257-65.
๑๘. Jimenez I, Aracena P, Letelier ME, Navarro P, Speisky H. Chronic exposure of HepG2 cells to excess copper results in depletion of glutathione and induction of metallothionein. *Toxicol In Vitro* 2002;16:167-75.
๑๙. Woods JS, Davis HA, Baer RP. Enhancement of gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in rat kidney by methyl mercury. *Arch Biochem Biophys* 1992;296:350-3.
๒๐. Shi MM, Iwamoto T, Forman HJ. gamma-Glutamyl cysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC. *Am J Physiol* 1994; 267:L414-21.
๒๑. Mari M, Cederbaum AI. CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 2000;275:15563-71.
๒๒. Ridnour LA, Sim JE, Choi J, Dickinson DA, Forman HJ, Ahmad IM, et al. Nitric oxide-induced resistance to hydrogen peroxide stress is a glutamate cysteine ligase activity-dependent process. *PLoS Med* 2005; 38:1361-71.
๒๓. Gong P, Cederbaum AI. Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1. *Hepatology* 2006; 43:144-53.
๒๔. Aguirre P, Valdes P, Aracena-Parks P, Tapia V, Nunez MT. Upregulation of gamma-glutamate-cysteine ligase as part of the long-term adaptation process to iron accumulation in neuronal SH-SY5Y cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C2197-203.
๒๕. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *PLoS Med* 1999; 27:922-35.
๒๖. Imamura T, Bando N, Yamanishi R. Beta-carotene modulates the immunological function of RAW264, a murine macrophage cell line, by enhancing the level of intracellular glutathione. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:2112-20.
๒๗. Carlsen H, Myhrstad MC, Thoresen M, Moskaug JO, Blomhoff R. Berry intake increases the activity of the gamma-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *J Nutr* 2003;133:2137-40.
๒๘. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *PLoS Med* 2002;32:386-93.
๒๙. Eyssen-Hernandez R, Ladoux A, Frelin C. Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS letters* 1996;382:229-33.
๓๐. Lee MH, Jiang CB, Juan SH, Lin RD, Hou WC. Antioxidant and heme oxygenase-1 (HO-1)-induced effects of selected Taiwanese plants. *Fitoterapia* 2006;77:109-15.
๓๑. Huang CS, Lii CK, Lin AH, Yeh YW, Yao HT, Li CC, et al. Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes. *Arch Toxicol* 2013;87:167-78.
๓๒. Liu S, Hou W, Yao P, Li N, Zhang B, Hao L, et al. Heme oxygenase-1 mediates the protective role of quercetin against ethanol-induced rat hepatocytes oxidative damage. *Toxicol In Vitro* 2012;26:74-80.

Abstract

Study of antioxidant activity of *Polygonum odoratum* L. extract *in vitro* and *in vivo* of rat

Nuntiya Somparn*, Jarinyaporn Naowaboot*, Suphaket Saenthaweesuk**, Atcharaporn Thaeomor***

* Division of Pharmacology, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand

** Division of Anatomy, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand

*** School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology. 111 University Avenue, Suranaree Subdistrict, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Corresponding author: Nuntiya Somparn Division of Pharmacology, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Campus, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand. Phone: 662-9269729; Fax: 662-9269711; E-mail address: nuntiya_tom@hotmail.com

Introduction: *Polygonum odoratum* L. (*P. odoratum*) extract has been shown to possess antioxidant effects and contains several antioxidant compounds. The aim of this study was to determine the antioxidant activity and the effect on antioxidant enzymes level of underlying of *P. odoratum*, a dietary and herbal plant commonly found in the Southeast Asia.

Methods: The ethanolic extract of *P. odoratum* was screened for its possible antioxidant activity through DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity assays (DPPH). Moreover, study on cytoprotective enzymes induction were carried out using Sprague-Dawley rats given 400 and 800 mg/kgBW/day of *P. odoratum* extract for 7 days. Liver was collected for determination of heme oxygenase (HO-1) and γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL) genes and protein expression which performed by Quantitative Real-Time RT-PCR and Western blot analysis, respectively. Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinine (Cr) were measured as the indicator of liver and kidney function.

Results: The DPPH value of the potent antioxidants, *P. odoratum* extract, vitamin E and Butylatedhydroxytoluene (BHT) were 50.25 ± 0.61 , 14.79 ± 0.78 and 19.71 ± 0.79 mg/mL, respectively. There was no histopathological change and serum AST, ALT and Cr were not elevated. Moreover, gene and protein expression of cytoprotective enzymes, heme oxygenase (HO-1) and γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL) were significantly increased in high dose-treated animals (800 mg/kgBW/day).

Discussion and Conclusion: *P. odoratum* exhibited weak antioxidant effect compared to pure antioxidant compounds. Nevertheless, *P. odoratum* could induce gene and protein expression of antioxidant enzymes. Consumption of *P. odoratum* may provide a benefit in increasing cytoprotective enzyme level. However, studies of long term consumption of the extract and toxicology are required.

Key words: Antioxidant, *Polygonum odoratum* L., Heme oxygenase (HO-1), γ -Glutamylcysteine ligase (γ -GCL)