ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากช่องปากของสารสกัดจากพืช

สถาพร สัตย์ซื่อ[1], **สุธาสินี ทัพพสารพงศ์**[1*], **ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง**[2]

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากช่องปากของสารสกัดจากพืช

สถาพร สัตย์ซื่อ[1], สุธาสินี ทัพพสารพงศ์[1*],ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง[2]

บทนำ: การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยง ของสารสกัดด้วยน้ำ เอทานอลของพืช 2 ชนิด คือ บัวบก และแกนสับปะรด **วิธีการดำเนินการวิจัย:** การศึกษาเป็นแบบการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro test) โดยทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay ศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Human gingival fibroblast (HGF) ด้วยวิธี MTT assay และฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ HGF โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนโดย Hydroxyproline assay **ผลการศึกษาวิจัย:** ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบบัวบกที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 88.85±1.17 µgGAE/g ส่วนฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่าสารสกัดใบบัวบกด้วย 95%เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, FRAP assay โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 207.69±6.00 µg Vit C/g และมีค่า FRAP value เท่ากับ 0.19±0.01 mM ตามลำดับ ส่วนการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์พบว่าที่ความเข้มข้น 500 µg/ml มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากกว่า 95 % ซึ่งที่ความเข้มข้น 1000 ug/ml ของสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล อาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ และการวิเคราะห์การสร้างคอลลาเจน พบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด ความเข้มข้น 500 µg/ml ของสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล, สารสกัดใบบัวบกด้วยน้ำ และสารสกัดแกนสับปะรดด้วยน้ำ มีปริมาณคอลลาเจน เท่ากับ 521.61, 435.19, 344.14 µg/ml ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม **สรุปผลการวิจัย:** สารสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยง HGF ดังนั้น จึงน่าจะสามารถนำไปประยุกต์ในการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ ยารักษาแผลในปากต่อไป

คำสำคัญ: Human gingival fibroblast (HGF) ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน DPPH assay FRAP assay

Abstract

Antioxidant and Collagen Stimulating Activities in Human Gingival Fibroblast Cell Culture of Plant Extracts

Sathaporn satsue[1], Suthasinee Thapphasaraphong[1*], Teerasak Damrongrungruang[2]

Introduction: The aim of the study was to screen the antioxidant and collagen stimulating activities in HGF cell culture from aqueous and 95 % ethanol extracts of *Centella asiatica* and aqueous extract of *Ananas comosus*. **Materials and Method** : These study were in vitro test. Total phenolic content, antioxidation activities by DPPH, FRAP assay, cell proliferation of HGF by MTT assay and stimulating activity of collagen from HGF cell culture media

[1]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2]คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***Coressponding author :** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทร 043--202378 โทรสาร 043-202379 e-mail: sutpit1@kku.ac.th

were investigated.The hydroxyproline assay was used for analysis of collagen. **Results:** The aqueous extracts of *Centella asiatica* exhibited the highest total phenolic compound content as 88.85±1.17 µg GAE/g while 95 % ethanol extract of *Centella asiatica* exhibited the highest antioxidant activity by DPPH assay and FRAP assay as IC_{50} 207.69±6.00 µg Vit C/g and FRAP value as 0.19±0.01 mM, respectively. For collagen stimulating activity in HGF cell culture at 500 µg/ml of 95 % ethanol and aqueous extract of *Centella asiatica* and aqueous extract of *Ananas comosus* showed the collagen content as 521.61, 435.19 and 344.14 µg/ml, respective. At 500 µg/ml of all extracts showed the highest stimulating activity of cell proliferation in HGF. At 1000 ug/ml 95 % ethanol extracts of *Centella asiatica* appeared cross cell type-specific cytotoxicity. **Conclusion** : From all results, we found that all extracts showed the high antioxidant activity and collagen stimulating activity in HGF cell culture, therefore these extractes could be applicable as drug development for treatment of mouth ulcers.

Keywords: Human gingival fibroblast (HGF), collagen stimulating activity, antioxidant activity**,** DPPH assay, FRAP assa

บทนำ

คอลลาเจนเป็นโปรตีนพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและยังเป็นโครงสร้างหลักของผิวหนังชั้นหนังแท้ ซึ่งปริมาณคอลเจนจะพบประมาณ 30% ของโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย มีคุณสมบัติในการทำให้ผิวมีสุขภาพแข็งแรง มีความยืดหยุ่น ลดความเหี่ยวย่นของผิวหนัง (IPST, 2010) ซึ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็นเซลล์ชนิดสำคัญในการสร้างคอลลาเจน การสร้างคอลลาเจนจะมีมากในวัยเด็กแต่เมื่ออายุมากขึ้น การสร้างคอลลาเจนจะลดลงเรื่อยๆ เหตุนี้จึงต้องมีการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนให้กับร่างกาย (IPST, 2010) ในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนเกิดได้ 2 ปัจจัย คือปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ซึ่งปัจจัยภายในจะเป็นการสร้างเพื่อทดแทนด้วยกระบวนการที่สำคัญ 2 อย่าง ได้แก่ การงอกใหม่ (regeneration) เป็นการที่เซลล์ชนิดเดิมของเนื้อเยื่อ เพิ่มจำนวนขึ้นทดแทนส่วนที่ถูกทำลาย และการสร้างพังผืดซึ่งเป็นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย โดยส่วนประกอบหลัก คือ เส้นใยคอลลาเจน (Khunamornpong, 2005) ส่วนปัจจัยภายนอกเกิดจากการที่ร่างกายได้รับสารอาหารจากผักหรือผลไม้ที่มีวิตามินต่างๆ ที่ช่วยในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนคือ วิตามินเอ วิตามินซี มีงานวิจัยที่พบว่า สับปะรด มีวิตามินเอ วิตามินซี เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยเพิ่มฤทธิ์การสร้างคอลลาเจนได้ (Boyera, 1989 and James, 2002) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการสมานบาดแผล (J Orbe, 2003) และยังมีเอนไซม์โบรมิเลนที่มีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบ ในส่วนของใบบัวบก มีสาร asiatic acid, madecassic acid และ asiaticoside ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยกระตุ้นการสร้าง DNA และโปรตีน, เร่งกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่, ลดการเกิด fibrosis ของบาดแผล รักษาแผลเป็นและ keloid, ลดการอักเสบ, เพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแผล, รักษาแผลในปาก (Cheng-jian, 2007) และสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน หรือมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่สูงด้วย เช่น วิตามินเอ วิตามินซี (Boyera *et al*., 1989) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดธรรมชาติ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของสารสกัดคือ บัวบกและแกนสับปะรด โดยทดสอบในเซลล์ HGF และวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธี Hydroxyproline Assay จากอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ทดสอบด้วยสารสกัด นอกจากนี้ยังศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์คือ การตรวจคัดกรองสารสกัดจากพืชที่มีความสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1.อุปกรณ์ และสารเคมี

Human gingival fibroblast(HGF), premium fetal bovine Serum, antibiotic, trypsin/EDTA solution (Invitrogen Cooperation (Gibco), U.S.A.), Dulbecco's modifiedeagle medium(D-MEM) (Invitrogen, U.S.A.), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (sigma), Chloramine-T, L-hydroxy proline (Sigma-aldrich, China), p-dimethylaminobenz aldehyde (Sigma, Belgium),citric acid, perchloric (APS Finechem, Australia) 2,4-dipenyl-1-picrylhydrazyl, Ferric chloride, 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine, Ferrous sulfategallic acid, Folin-Ciocalteu,

2.พืชและสารสกัด

การเตรียมสารสกัดน้ำของใบบัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urb.) และ แกนสับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) พันธุ์ปัตตาเวีย ทำโดยชั่งน้ำหนักสดของใบบัวบกและแกนสับปะรด 160 กรัม และ 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ล้างให้สะอาดเติมน้ำเข้าเครื่องปั่น บีบคั้น กรองด้วยผ้าขาว 3-4 ชั้น centrifuge ที่ 10,000 g. ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปทำแห้งด้วย Freeze-dryer ส่วนการเตรียมสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล ทำโดยชั่งน้ำหนักสดใบบัวบก 344.83 กรัม อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน หรือจนตัวอย่างแห้ง นำไปบดละเอียด หมักในเอทานอล ในอัตราส่วน 1:20 กรัม/มล. เป็นเวลา 7 วัน นำสารสกัดที่ได้ไประเหย แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำแห้งด้วย Freeze-dryer (Temrangsee, 2011)

3. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds) (Maisuthisakul *et al*., 2007) เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ml และ 710 mM Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) ผสมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/ml กับ Folin-Ciocalteu reagent และ Na_2CO_3 ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณTotal phenolic compound จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid

4.การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Kriengsak *et al*., 2006) เตรียมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นในช่วง 40-640 µg/ml เติมสารละลาย 2,4-dipenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.1 mM ในเมทธานอล ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ 517 nm ใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบคำนวณหา % inhibition(IC_{50}) จากสมการ % Inhibition = A control -A sample /A control x 100

4.2 การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Kriengsak *et al*., 2006) เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidantpower) reagent จาก 300 mM Acetate buffer pH 3.6 กับ 20 mM, Ferric chloride solution และ10 mM ของ 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine (TPTZ) ผสมในอัตราส่วน (10:1:1) ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 40 นาที เติม FRAP reagent ลงในสารสกัดที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/ml ในน้ำ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที วัดค่าการดูดกลืนของแสง ที่593 nm คำนวณค่า FRAP value เทียบการสารมาตรฐาน Trolox

5.การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Jeong-Hyun *et al*., 2012)

บ่มเซลล์ HGF 5,000 cells/well ใน 96-well ใน D-MEM 90 %, FBS 10%, Antibiotic 1% บ่ม 24 ชั่วโมง ในตู้ CO_2 incubator ที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เตรียมสารสกัดความเข้มข้นในช่วง 62.5 – 1,000 µg/ml เติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น100 µl ลงในแต่ละหลุม บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูด supernatant เก็บไว้ (เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในข้อ 6) เติม MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มในที่มืด 30 นาที ดูด supernatant ทิ้ง ละลายส่วนที่เหลือด้วย DMSO 100 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณหา %cell viability จากสูตร

$$\%\text{cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of control cell}} \times 100$$

6.การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนโดย Hydroxyproline Assay (Reddy and Enwemeka, 1996)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน hydroxyproline ที่ความเข้มข้นในช่วง 10-50 µg/ml ผสมสารละลายมาตรฐาน hydroxyproline 20 µl กับ 2N NaOH 20 µl นำไป autoclave ที่ 121°C, 20 นาที ปิเปต 10µl สารละลายมาตรฐาน hydroxyproline แต่ละความเข้มข้น ลง 96 well plate เติม 90 µL chloramine-T บ่มเป็นเวลา 25 นาที ที่

อุณหภูมิห้อง และเติม 100 µL ของEhrlich's aldehyde reagent นำไปบ่มที่ 65°C เป็นเวลา นาที 20 ทำการวิเคราะห์อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดแต่ละชนิดเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน hydroxyproline แล้ววัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm คำนวณหาปริมาณคอลลาเจน (µg/ml) จากกราฟมาตรฐานของ Hydroxyproline จากสูตร

$$\text{Collagen level} = \frac{\text{Hydroxyproline level (µg/ml)} \times 100}{13.5}$$

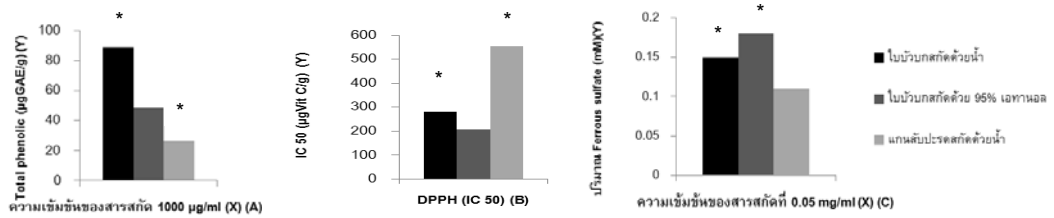
การวิเคราะห์ทางสถิติ แสดงผลเป็นค่า mean ± SD และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA ค่า $p<0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาวิจัย

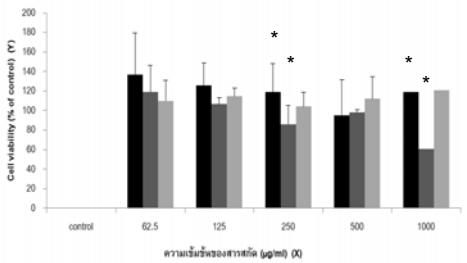
1.ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดพบว่าใบบัวบกสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมมากที่สุดเท่ากับ 88.85±1.17 µg GAE/g และการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด (ดังรูปที่ 1 และ ตารางที่1)

2.ฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าสารสกัดใบบัวบกที่สกัดด้วยน้ำ และสารสกัดจากแกนสับปะรดที่สกัดด้วยน้ำ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HGF ที่ความเข้มข้น 62.5 – 1000 ug/ml แต่ที่ความเข้มข้น 250-1000 ug/ml ของสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล มีจำนวนเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งความเข้มข้น 1000 ug/ml จำนวนเซลล์ลดลง $\leq$ 60% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและเกณฑ์มาตรฐานการเพิ่มจำนวนของเซลล์เท่ากับ 70-80% (ดังรูปที่ 2)

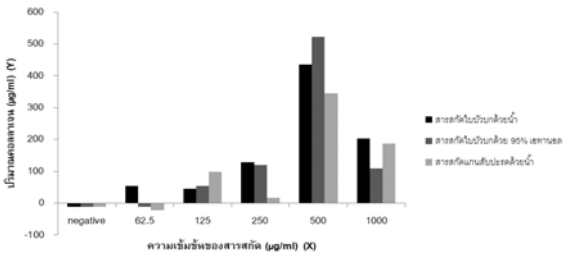
3.การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ HGF โดย hydroxyproline assay พบว่าสารสกัดใบบัวบกด้วยน้ำ, สารสกัดใบบัวบกด้วย 95 % เอทานอล และสารสกัดแกนสับปะรดด้วยน้ำ แต่ละความเข้มข้นมีปริมาณคอลลาเจนมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งที่ความเข้มข้น 500 ug/ml ของสารสกัดแต่ละชนิด มีปริมาณคอลลาเจนสูงสุด เท่ากับ 435.19, 521.61, 344.14 µg/ml ตามลำดับซึ่งสารสกัดใบบัวบกที่สกัดด้วย 95 % เอทานอล มีการสร้างคอลลาเจนมากที่สุด (ดังรูปที่ 3 และ ตารางที่ 2)



รูปที่ 1 ค่า Total phenolic compound (µg GAE/g) (A), DPPH IC_{50} (µgVit C/g) (B), FRAP value (mM) (C) ของสารสกัดจากพืช (*$p< 0.05$)



รูปที่ 2 ค่า cell viability ของเซลล์ Human gingival fibroblast ในสารสกัดจากพืช (*$p< 0.05$)



รูปที่ 3 ปริมาณคอลลาเจน (µg/ml) ของสารสกัดจากพืช (*$p<0.05$)

ตา H IC_{50} (µg Vit C/g), FRAP value (mM) ของสารสกัดจากพืช (*$p< 0.05$)

สารสกัด	Total phenolic (µg GAE/g)	DPPH IC_{50} (µg Vit C/g)	FRAP value (mM) Fe(II)g
ใบบัวบกสกัดด้วยน้ำ	88.85±1.17	280.79±5.04	0.15±0.01
ใบบัวบกสกัดด้วย 95% เอทานอล	48.60±3.44	207.69±6.00	0.18±0.01
แกนสับปะรดสกัดด้วยน้ำ	26.36±0.66	554.90±6.57	0.11±0.01

ตารางที่ 2 ปริมาณคอลลาเจนของสารสกัดจากพืช

สารสกัด	ปริมาณคอลลาเจนจาก HGF เมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ (µg/ml)				
	62.5	125	250	500	1000
ใบบัวบกสกัดด้วยน้ำ	54.01	44.74	128.09	435.19	203.70
ใบบัวบกสกัดด้วย 95% เอทานอล	-10.80	54.01	120.37	521.6	109.57
แกนสับปะรดสกัดด้วยน้ำ	-21.6	98.77	16.98	344.14	186.73

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า สารสกัดใบบัวบกด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล และสารสกัดแกนสับปะรดด้วยน้ำ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า สกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด ในการทดสอบด้วยทั้งสองวิธี คือ DPPH, FRAP assay ในขณะที่สารสกัดใบบัวบกด้วยน้ำ และสารสกัดแกนสับปะรดด้วยน้ำ มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ HGF ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 62.5–1000 ug/ml และที่ความเข้มข้น 250-1000 ug/ml ของสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล มีจำนวนเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการเพิ่มจำนวนเซลล์ เท่ากับ 70-80 % (Wanichpakorn, 2010) แต่จะพบว่าที่ความเข้มข้น 1000 ug/ml ของสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล จำนวนเซลล์ลดลง $\leq$ 60% แสดงให้เห็นว่าอาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Jeong-Hyun *et al*., 2012) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน พบว่าที่ความเข้มข้น 500 µg/ml ของใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล, ใบบัวบกด้วยน้ำ และสารสกัดแกนสับปะรดด้วยน้ำ พบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์มีปริมาณคอลลาเจน เท่ากับ 521.61, 435.19, 344.14 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสารสกัดแต่ละความเข้มข้น พบว่าที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สารสกัดทั้งสามมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ $\geq$ 95 % ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) จากการรายงานวิจัยพบว่า สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน หรือมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่สูงด้วย เช่น วิตามินเอ วิตามินซี (Boyera *et al*., 1989) และเมื่อเทียบกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่าสารสกัดใบบัวบกด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดี ซึ่งมีปริมาณความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 500 µg/ml และสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดี เป็นไปได้ว่าอาจช่วยลดการอักเสบและการสมานบาดแผลได้ดี นั้นแสดงว่าสารสกัดนี้มีศักยภาพที่จะใช้ในการศึกษาในระดับต่อไปในการพัฒนาเป็นตำรับยารักษาแผลในช่องปาก ซึ่งต้องมีการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการบ่มเพาะนักวิจัยเพื่อให้สร้างผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ ประจำปี 2556 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยและคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือสถานที่ในงานวิจัยครั้งนี้

References

Jeong-Hyun L, *et al.* Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine* 1999; 19(-), 1223– 1227.

Kriengsak T, Unaroj B, Kevin C, *et al*. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP,and ORAC assays Forestimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006; 19(-),669–675

Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 2007; 100(-), 1409–1418.

Reddy GK and Enwemeka, CS. A Simplified Method for the Analysis of Hydroxyproline in Biological Tissues. *Clinical Biochemistry* 1996; 29(3), 225-229