

การศึกษาฤทธิ์การเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ของสารสกัดสมุนไพร ในเซลล์เคราทีโนไซต์

พรสวรรค์ จันทร์ทอง¹

(วันที่รับบทความ: 14 พฤษภาคม 2564; วันที่แก้ไข 16 กรกฎาคม 2564; วันที่ตอบรับ 17 กันยายน 2564)

บทคัดย่อ

สมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการสมานแผล ซึ่งกระบวนการสมานแผลประกอบด้วยหลายกลไก ได้แก่ การแบ่งตัวของเซลล์เคราทีโนไซต์ การสร้างคอลลาเจน การอักเสบ การต้านอนุมูลอิสระ และการเคลื่อนที่ของเซลล์เพื่อปิดบาดแผล การวิจัยเชิงทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่กระตุ้นการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราทีโนไซต์ ทำการทดสอบการออกฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราทีโนไซต์มนุษย์ (HaCaT Cell) ในสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์สมานแผล 5 ชนิด ได้แก่ ใบเปล้าน้อย (*Croton Stellatopilosus*) ใบหม่อน (*Morus Alba*) ผักแพว (*Polygonum Odoratum*) ผักเป็ดขาว (*Alternanthera Sessilis*) และผักเบี้ย (*Portulaca Oleracea*) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ยกเว้นสารสกัดจากผักแพว สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของ HaCaT Cell ได้ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} < 0.05$) และสารสกัดผักเบี้ยความเข้มข้น $10 \mu\text{g/mL}$ สามารถเคลื่อนที่เพื่อเชื่อมต่อบาดแผลได้ $90.29 \pm 8.15\%$ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งดีกว่า Untreated Control ($60.01 \pm 19.59\%$) ผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้แสดงถึงศักยภาพของสารสกัดผักเบี้ยในการสมานบาดแผล โดยการกระตุ้นการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราทีโนไซต์ เพื่อสมานรอยกริดของเซลล์เคราทีโนไซต์ได้ จึงควรทำการศึกษาต่อไปในแง่กลไกการออกฤทธิ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผล หรือนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านอื่นๆต่อไป

คำสำคัญ : การเพิ่มจำนวนเซลล์, การเคลื่อนที่ของเซลล์, เซลล์เคราทีโนไซต์

¹เภสัชกรชำนาญการ, โรงพยาบาลหนองสองห้อง อำเภอนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น, E-mail: jum_oo@hotmail.com
Corresponding author: พรสวรรค์ จันทร์ทอง, E-mail: jum_oo@hotmail.com

Evaluation of Cell Proliferation and Cell Migration Effect of Medicinal Herb Extracts in Keratinocyte cell (HaCaT cell)

Pornsawan Juntong¹

(Receive 14th May 2021; Revised: 16th July 2021; Accepted 17th September 2021)

Abstract

Several Thai herbs possess wound healings properties. Wound healing process consists of many mechanisms, including stimulation of keratinocyte, collagen production, inflammation, antioxidants and wound closing by induce cell migration. This experimental study aimed to investigate *in vitro* cell proliferation and cell migration activities of medicinal herb extracts which related to wound healing processes in human keratinocyte cell (HaCaT). Regarding the experimental method, the medicinal herb extracts were prepared from fresh extracts, including *Croton stellatopilosus*, *Morus alba*, *Polygonum odoratum*, *Alternanthera sessilis* and *Portulaca oleracea*. Activity assays were then performed in human keratinocyte covered stimulation of proliferation by MTT assay and stimulation of cell migration by the scratch assay.

The results revealed that all herbs, except *Polygonum odoratum*, can stimulate proliferation of HaCaT and differ from the control group significantly ($p < 0.05$). *Portulaca oleracea* extract, at concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$, can increase cell proliferation and lead to wound closure 90.29+8.15% at 72 hours which was better than untreated control (60.01+19.59%). It could be concluded that *Portulaca oleracea* extract can possess wound healing properties by stimulation of cell proliferation and cell migration. Mechanism of action of *Portulaca oleracea* should be more for further investigation in order to find supporting data for improving health products related to wound healing or applying the knowledge to other related works.

Keywords: Cell Proliferation, Cell migration, Keratinocyte cell

¹ Professional pharmacist, Nong Song Hong Hospital, Nong Song Hong District, Khon Kaen, E-mail: jum_oo@hotmail.com
Corresponding author: Pornsawan Juntong, E-mail: jum_oo@hotmail.com

บทนำ

ผิวหนังของมนุษย์แบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นหนังกำพร้า ชั้นหนังแท้ และชั้นเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง โดยชั้นหนังกำพร้าที่อยู่ชั้นบนสุดของผิวหนังประกอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ (Keratinocyte Cell) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตและตายหลุดลอกออกไปหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลาเป็นหนังแท้ชั้นที่อยู่ใต้หนังกำพร้าประกอบด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) เส้นใยคอลลาเจน (Collagen Fiber) อีลาสติน (Elastin) อยู่มากมาย เมื่อเกิดบาดแผลที่ผิวหนัง ร่างกายจะมีการซ่อมแซมบาดแผลขึ้น โดยกระบวนการหายของแผลเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อน¹ และอาจจะคาบเกี่ยวต่อเนื่องกันไป เช่น ระยะอักเสบ (Inflammatory Phase) ระยะงอกขยาย (Proliferation Phase) และระยะปรับปรุงเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่ (Remodeling Phase) โดยระยะอักเสบ จะเริ่มใน 24 ชั่วโมงแรก หลังเกิดบาดแผล มักมีอาการ ปวด บวม แดง ร้อน บริเวณบาดแผล โดยการอักเสบมีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซม และตอบสนองต่ออันตรายของเนื้อเยื่อเพื่อให้เนื้อเยื่อกลับคืนสู่สภาพและทำหน้าที่ได้ใกล้เคียงกับของเดิม การอักเสบก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ในระยะงอกขยายของแผลอาจจะมีการคาบเกี่ยวกับระยะอักเสบ ซึ่งมีเซลล์มาโครฟาจปล่อยปัจจัยการเจริญเติบโต (Growth Factor) ออกมาเพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Proliferation ต่างๆ เช่น Angiogenesis, Epithelization, Fibroblast Proliferation and Migration และ Collagen Synthesis ซึ่งจะทำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่มาสู่บริเวณแผล ดังนั้นการกระตุ้นการเกิด Proliferation ในระยะ

งอกขยาย จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการกระตุ้นการสมานของแผลที่ดี

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีสมุนไพรที่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การกระตุ้นการสมานแผลและถูกนำมาใช้ในการรักษาแผลได้แก่ ใบเปล้าน้อย (Croton Stellatopilosus Ohba) มีฤทธิ์ลดการหลั่งของกรดในกระเพาะอาหาร ช่วยกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อในลำไส้ และช่วยสมานแผลในกระเพาะอาหารและในลำไส้ได้², ใบหม่อน (Morus Alba Linn.) มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้เพิ่มระดับภูมิคุ้มกัน และทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในหนูทดลองดีขึ้น³ และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ Escherichia Coli, Pseudomonas Aeruginosa เป็นต้น⁴ ผักแพว (Polygonum Odoratum Lour.) มีสารต้านอนุมูลอิสระ⁵ และช่วยสมานแผลในหนู โดยใช้ทาทายนอกในขนาด 200 mg/kg ทำให้บาดแผลสมานดี⁶ ผักเป็ดขาว (Alternanthera sessilis Linn.) ในตำรายาโบราณใช้เป็นยาพอกรักษาแผล⁷ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียช่วยสมานแผลโดยขนาด 200 ug/mL ทำให้การหดตัวของแผลดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁸ ผักเบี้ย (Portulaca Oleracea L.) ในตำรายาโบราณใช้รักษาแผลเป็นหนอง อักเสบ มีน้ำเหลือง นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁹ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ¹⁰ และช่วยสมานแผลได้ โดยทดสอบในเซลล์ JVI-1 พบว่าพื้นที่ผิวของแผลลดลง¹¹ จากข้อมูลเบื้องต้นแสดงถึงศักยภาพในการสมานแผลของสมุนไพร ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลผิวหนังโดยศึกษาการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยเลือกสารสกัดจากสมุนไพรดังกล่าว 5 ชนิดมาทำการทดสอบฤทธิ์

เบื้องต้นในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังเคอราติโนไซต์ เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ชั้นนอกสุดของผิวหนัง เมื่อเกิดบาดแผลจะเป็นเซลล์ชั้นแรกที่ได้รับผลกระทบเป็นชั้นแรกผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผลจากสารสกัดสมุนไพรหรือนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านอื่นๆต่อไป

วัตถุประสงค์การทำวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ ของสารสกัดสมุนไพร
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เคอราติโนไซต์ ของสารสกัดสมุนไพร

ขอบเขตการวิจัย

ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวในเซลล์เคอราติโนไซต์ (HaCaT Cell) ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ใบเปล้าน้อย (C. Stellatopilosus) ใบหม่อน (M. alba) ผักแพว (P. Odoratum) ผักเป็ดขาว (A. Sessilis) ผักเปื้อย (P.Oleracea) ด้วยวิธี MTT Assay

วิธีดำเนินการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการวิจัยแบบทดลอง (Experimental Research) ที่งานการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลหนองสองห้อง และในห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นโดยการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัว (Cell Proliferation) ของเซลล์เบื้องต้นในเคอราติโนไซต์ (HaCaT Cell) ของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด

2. แหล่งที่มาของสมุนไพร

ใบเปล้าน้อย จาก อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ใบหม่อน จากสวน อำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น

ผักแพว ซื้อจากตลาดสดอำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น

ผักเป็ด จากสวน อำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น

ผักเปื้อย จากสวน อำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น

3. เซลล์เพาะเลี้ยง

HaCaT cell (Human Adult Calcium Temperature) (CLS, Germany)

4. การเตรียมสารสกัด

1) ใบเปล้าน้อย (ภาพที่ 1A) เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น นำมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C ได้น้ำหนักแห้งรวม 54.73 กรัม จากนั้นนำไปหมักด้วย 95% Ethanol 3800 mL จำนวน 2 รอบ รอบละ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารสกัดไปกรอง จากนั้นนำมาระเหยแล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze Dryer นำสารสกัดที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ (%Yield) และนำไปใส่ขวดสีชา ปิดฝาสนิท เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C

2) ใบหม่อน (ภาพที่ 1B) เก็บจากจากสวน อำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น ผักแพว (ภาพที่ 1C) ซื้อจากตลาดสดอำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น ผักเป็ด (ภาพที่ 1D) และผักเปื้อย (ภาพที่ 1E) จากสวน อำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น นำมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C จากนั้นนำไปหมักด้วย 95% Ethanol 3800 mL จำนวน 2 รอบ รอบละ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาระเหยทำให้แห้ง และนำไปใส่ขวดสีชา ปิดฝาสนิท เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เช่นกัน



ภาพที่ 1 ชนิดของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด (A:ใบเป็ล้าน้อย, B:ใบหม่อน, C: ผักแพว, D:ผักเป็ด, E:ผักเบี้ย)

5. การศึกษาฤทธิ์ที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัว (Cell Proliferation)

เพาะเลี้ยง HaCaT cell จำนวน 5,000 cell/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Complete DMEM ที่ประกอบด้วย 10% Fetal Bovine serum (FBS), 1% Non-essential amino acid (NEAA) และ 1% Penicillin-Streptomycin ใน 96-Well Plate เลี้ยงในตู้ CO₂ Incubator ที่มีปริมาณ CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาทดสอบด้วยสารละลายของสารสกัดจากสมุนไพรตัวอย่างที่เจือจางด้วย DMEM ที่เติม 1% Penicillin-Streptomycin แต่ไม่เติม FBS (DMEM Free Serum) ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1, 10, 100, 200 และ 400 µg/mL บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยมี 2% FBS ผสม DMEM เป็น Positive Control มี DMEM free serum เป็น Untreated Control ครบเวลาดัง

เซลล์ด้วย 1xPBS (Phosphate Buffered Saline) ปริมาตร 100 µL/หลุม เติม 0.5 mg/mL MTT ที่ละลายใน 1xPBS ปริมาตร 50 µL/หลุม บ่มอีก 3 ชั่วโมงจากนั้นดูดสาร MTT ออกจนหมด แล้วใส่สารละลาย DMSO 50 µL/หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader และคำนวณค่า % Cell Proliferation¹²

การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลใน HaCaT Cell (Scratch Assay)

เลี้ยง HaCaT cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Complete DMEM ที่ประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% None Essential Amino acid (NEAA) และ 1% Penicillin-Streptomycin ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 75 cm² และนำไปเลี้ยงในตู้ CO₂ Incubator ที่มีปริมาณ CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C เมื่อทำการ Sub Culture cell แล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน 6 Well Cell

Culture Plate โดยใส่เซลล์ปริมาณ 1×10^5 เซลล์/หลุม จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่น 100% ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด ล้างเซลล์ด้วย 1xPBS ปริมาตร 1 mL/หลุม แล้วดูดทิ้งออกจนหมดทำการกรีดเซลล์ให้เป็นแผ่น โดยใช้ปลายปิเปตขนาด 1 mL กรีดเซลล์ให้เป็นเส้นตรงโดยใน 1 หลุมจะกรีด 3 แผ่น หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1xPBS ปริมาตร 1 mL/หลุม อีก 2 ครั้ง เพื่อล้างเศษเซลล์ที่ตกค้างอยู่ออกให้หมด

เตรียมสารละลายของสารสกัดสมุนไพรใน DMEM Serum Free ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ดีที่สุด กรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนใช้ Complete DMEM ที่ประกอบด้วย 1% NEAA, 1% Penicillin/Streptomycin ที่มี 2% FBS เป็น Positive Control และ DMEM serumfree เป็น Untreated Control ใส่สารละลายสารสกัดที่เตรียมไว้ลงใน 6 Well Plate ที่กรีดเซลล์ให้เป็นแผ่นไว้แล้วความเข้มข้นละ 2 mL ทำ 3 ซ้ำ บันทึกภาพเซลล์และวัดความกว้างของแผ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ใช้โปรแกรม NIS-Elements D3.2 โดยบันทึกภาพ 3 ตำแหน่งและเลือกตำแหน่งเดิม บันทึกภาพและวัดความกว้างของบาดแผล ที่เวลาเริ่มต้น จากนั้นทุก 6 ชั่วโมง

ใน 24 ชั่วโมงแรก และทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ในการทดลองจะทำการทดลองไม่น้อยกว่า 3 ซ้ำ และทำ 3 ครั้งในทุกการทดลอง นำเสนอข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Deviation, S.D.) ใช้สถิติ Independent Sample T-test และถือว่ามีความสำคัญทางสถิติเมื่อ $p\text{-value} < 0.05$

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 ผลการเตรียมสารสกัด

จากการหมักพืชสมุนไพร เปล้าน้อย (Croton Stellatopilosus) หม่อน (Morus Alba) ผักแพว (Polygonum odoratum) ผักเป็ดขาว (Alternanthera sessilis) ผักเบี้ย (Portulaca oleracea) ด้วย 95% Ethanol ได้สารสกัดพืชสมุนไพรทั้งห้าชนิดเป็นสีน้ำตาลโดยสารสกัดใบหม่อนมีลักษณะเหนียว เป็นมัน สารสกัดใบเปล้าน้อยมีลักษณะเหนียว เป็นมัน แต่น้อยกว่าสารสกัดใบหม่อน และสารสกัดผักแพวมีลักษณะไม่มันเป็นเกร็ด สารสกัดผักเป็ดขาวและสารสกัดผักเบี้ยเป็นสีน้ำตาลอ่อน โดยได้ร้อยละของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้ง (%Yield) ของสารสกัด (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ร้อยละของสารสกัดที่ได้จากการสกัดผงพืชสมุนไพรแห้งด้วย 95% Ethanol

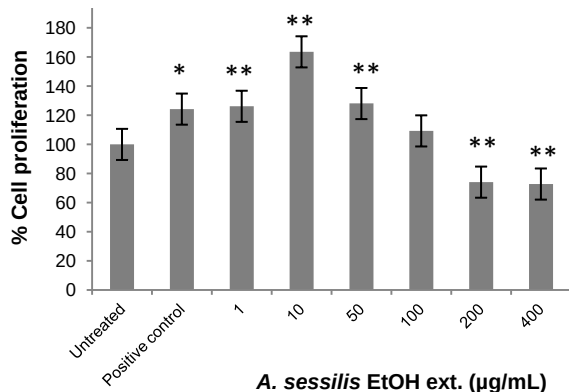
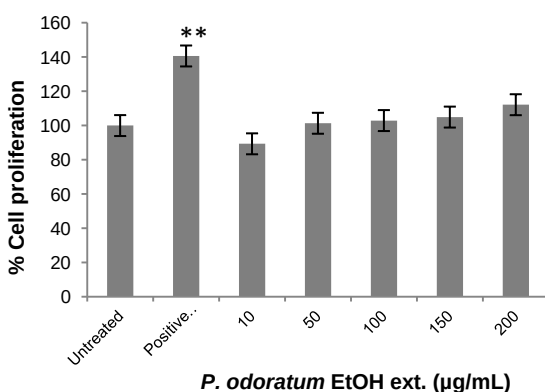
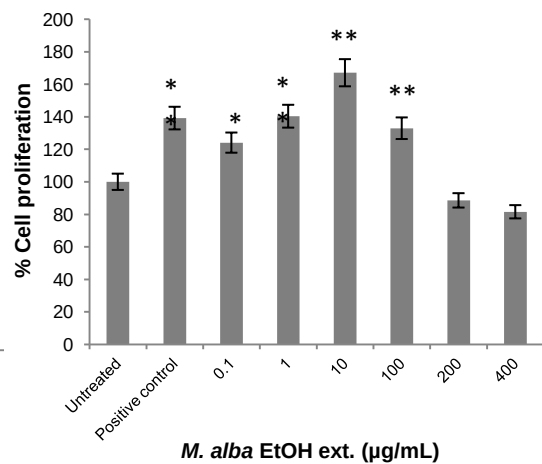
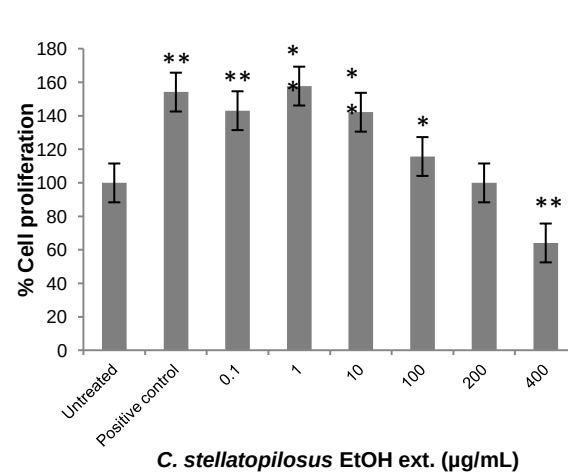
ชนิดของพืช	ส่วนที่ใช้	น้ำหนักแห้งก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	%Yield
เปล้าน้อย	ใบ	54.73	7.3	13.34
หม่อน	ใบ	137.11	13.27	9.68
ผักแพว	ใบ	29.58	3.35	11.33
ผักเป็ดขาว	ทั้งต้น	43.50	9.10	6.70
ผักเบี้ย	ทั้งต้น	30.15	7.45	5.14

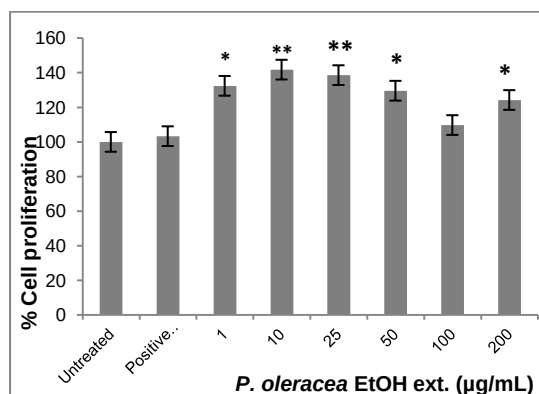
ตอนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวใน เซลล์เคราทีโนไซต์ (HaCaT Cell) ของสารสกัด 5 ชนิด

1. การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวในเซลล์เคราทีโนไซต์ (HaCaT Cell) โดยวิธี MTT Assay เมื่อทดสอบสารสกัดตัวอย่างสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัดทุกชนิด ยกเว้นสารสกัดผักแว่นให้ผลกระตุ้นการแบ่งตัวของ HaCaT Cell อย่างมีนัยสำคัญ (p -value<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ Untreated Control โดยสารสกัดเปล้าน้อยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในช่วงความเข้มข้น 0.1-100 μ g/mL ได้ $115.73 \pm 10.74\%$ - $157.75 \pm 17.92\%$ อย่างมีนัยสำคัญ (p -value<0.05) สารสกัดใบหม่อนกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในช่วงความเข้มข้น 0.1-100 μ g/mL ได้ $124.05 \pm 7.82\%$ -

$167.03 \pm 11.79\%$ อย่างมีนัยสำคัญ (p -value <0.05) สารสกัดผักเป็ดขาวกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในช่วงความเข้มข้น 1-50 μ g/mL ได้ $126.15 \pm 9.55\%$ - $128.05 \pm 20.19\%$ อย่างมีนัยสำคัญ (p -value <0.05) สารสกัดผักเบี้ยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในช่วงความเข้มข้น 1-50 μ g/mL ได้ $129.55 \pm 8.93\%$ - $141.74 \pm 10.24\%$ อย่างมีนัยสำคัญ (p -value <0.05) (ดังภาพที่ 2)

และการทดสอบนี้พบว่า สารสกัดเปล้าน้อย 400 μ g/mL และสารสกัดผักเป็ดขาว 200-400 μ g/mL แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เคราทีโนไซต์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ได้ $64.13 \pm 5.72\%$ และ $72.73 \pm 3.62\%$ - $74.03 \pm 6.18\%$ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบหม่อน และสารสกัดผักเบี้ย ไม่แสดงความเป็นพิษต่อ HaCaT cell ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ





ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดต่อฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ (HaCaT cell) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated control) (*p-value < 0.05, ** p-value < 0.001) (n = 8)

Untreated control = DMEM free serum

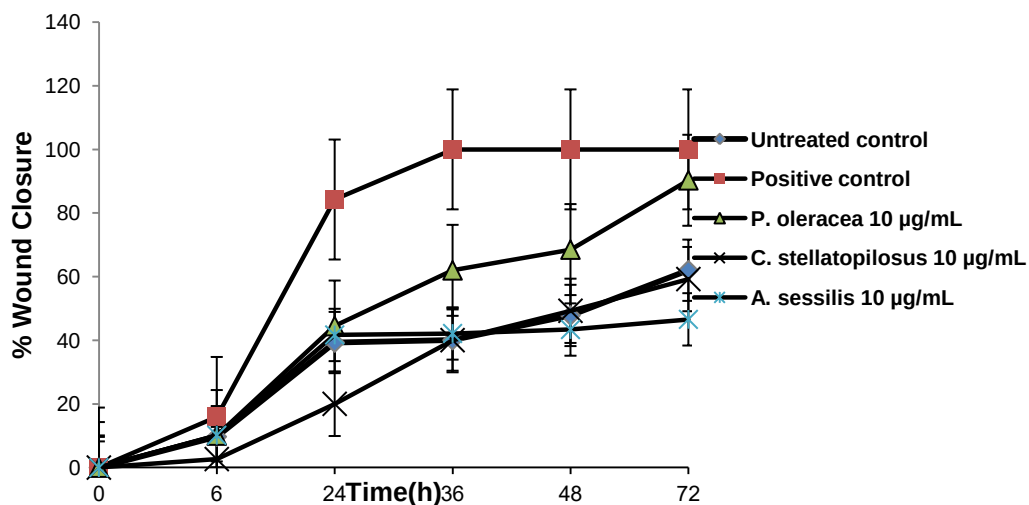
Positive control = DMEM + 2% FBS

จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกสารสกัดที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวในเซลล์เคอราติโนไซต์ได้สูงมาทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการกระตุ้นการสมานแผลโดยวิธี Scratch assay

2. การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ (Cell Migration) ของสารสกัดเปลือกน้อย สารสกัดผักเป็ดขาว และสารสกัดผักเบี้ย ในเซลล์เคอราติโนไซต์โดยวิธี Scratch Assay

จากการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวในเซลล์เคอราติโนไซต์เบื้องต้น ของสารสกัดซึ่งใช้ความเข้มข้นที่กระตุ้นการเจริญของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ดีที่สุดความเข้มข้นเท่ากันคือ 10 µg/mL มาทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์

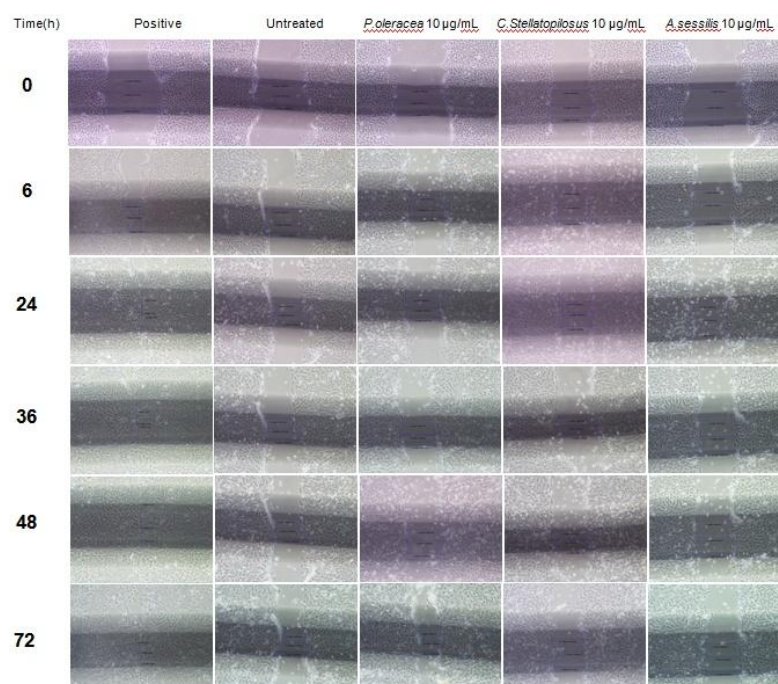
ในการเชื่อมต่อของบาดแผลในเซลล์เคอราติโนไซต์ โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated Control) ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มี serum จากผลการทดลองพบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง หลังจากการ Scratch Cell สารสกัดผักเบี้ยสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เชื่อมต่อบาดแผลได้ $90.29 \pm 8.15\%$ ซึ่งดีกว่า Untreated Control ($60.01 \pm 19.59\%$) รองลงมาคือสารสกัดเปลือกน้อยและสารสกัดผักเป็ดขาว ($59.24 \pm 5.93\%$, $46.58 \pm 14\%$) ตามลำดับ (ดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดเปลือกกล้วย (C. stellatopilosus) สารสกัดผักเป็ดขาว (A. sessilis) และสารสกัดผักเบี้ย (P. oleracea) (ความเข้มข้น 10 µg/mL) ต่อฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลในเซลล์เคอราติโนไซต์ที่เวลา 0, 6, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated control) และ Positive control (n = 3)

Untreated control = DMEM free serum

Positive control = DMEM + 2% FBS



ภาพที่ 4 การเชื่อมต่อของบาดแผลหลังการทำให้เกิดรอยแผลด้วยวิธี scratch assay ของสารสกัดเปลือกกล้วย (C. stellatopilosus) สารสกัดผักเป็ดขาว (A. sessilis) และสารสกัดผักเบี้ย (P. oleracea) ความเข้มข้น 10 µg/mL ในเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ (HaCaT cell) ที่เวลา 0, 6, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง

Untreated control = DMEM free serum

Positive control = DMEM + 2% FBS

จากผลการทดลองสารสกัดผักเป็ดกระตุ้น การเพิ่มจำนวนเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ เคอราติโนไซด์เบื้องต้นได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดผักเป็ดความเข้มข้นที่แสดงฤทธิ์การกระตุ้นการแบ่งตัวในเซลล์เคอราติโนไซด์ได้สูงสามลำดับแรก มาทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการสมานแผล โดยวิธี Scratch Assay ต่อ

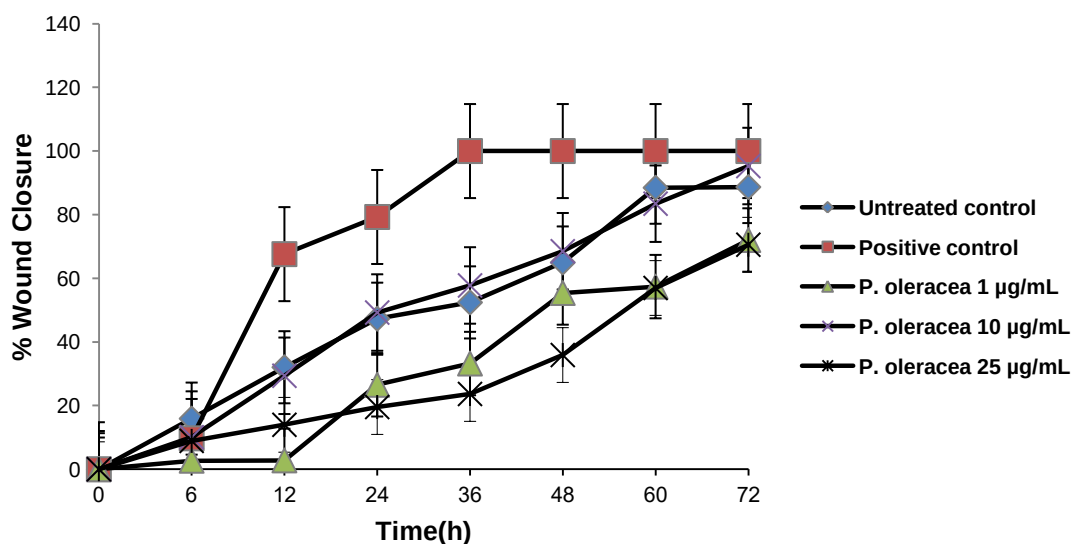
3. การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell Migration) ของสารสกัดผักเป็ดในเซลล์เคอราติโนไซด์โดยวิธี Scratch Assay

จากการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เคอราติโนไซด์ของสารสกัดผักเป็ดที่ความเข้มข้นที่กระตุ้นการเจริญของเซลล์เคอราติโนไซด์ได้ดีที่สุด 3 ความเข้มข้นคือ 1, 10 และ 25 $\mu\text{g/mL}$ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated Control) ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มี serum ผลการทดลองพบว่าที่เวลา

24 ชั่วโมง หลังจากการ Scratch Cell ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ สามารถเชื่อมต่อบาดแผลได้ดีที่สุด $49.25 \pm 6.14\%$ รองลงมาคือสารสกัดความเข้มข้น 1 และ 25 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเชื่อมต่อบาดแผลได้ $26.54 \pm 6.84\%$ และ $19.55 \pm 3.26\%$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Untreated Control แล้วพบว่าความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ เชื่อมต่อบาดแผลได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมซึ่งเชื่อมต่อบาดแผลได้ $47.31 \pm 7.04\%$

หลังจาก Scratch Cell 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ เชื่อมต่อบาดแผลได้ $68.51 \pm 21.89\%$ ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเชื่อมต่อบาดแผลได้ $64.98 \pm 5.76\%$

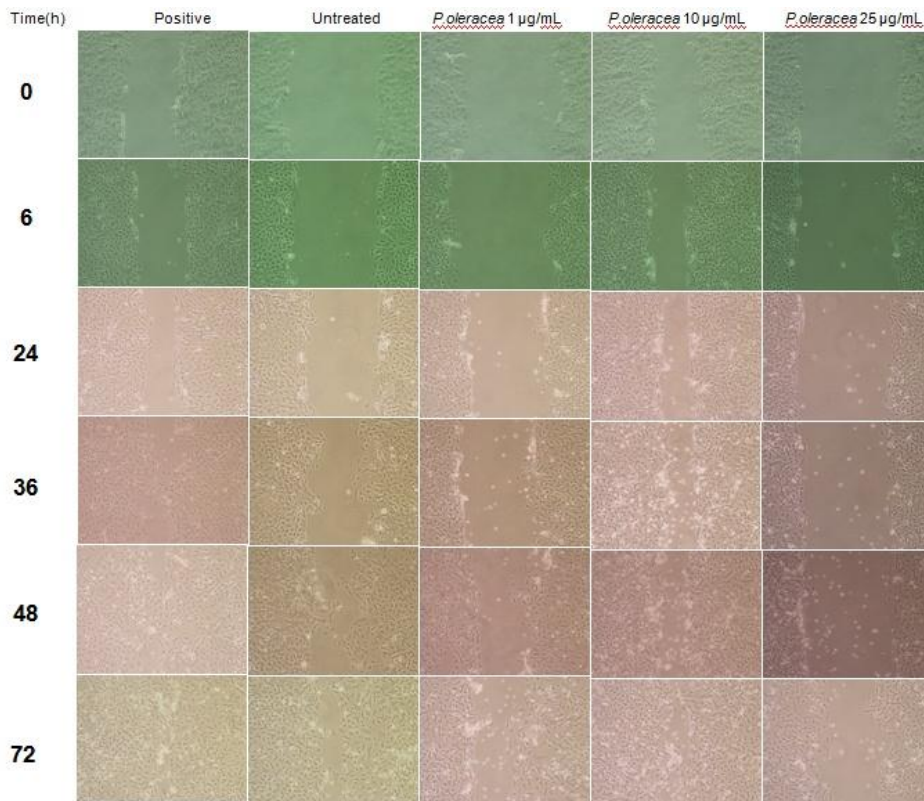
หลังจากการ Scratch Cell 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดผักเป็ดทุกความเข้มข้น ยังเชื่อมต่อบาดแผลได้ไม่สนิท 100%



ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดผักเป็ด (*P. oleracea*) (ความเข้มข้น 1, 10, และ 25 $\mu\text{g/mL}$) ต่อฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลในเซลล์เคอราติโนไซด์ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated control) และ Positive control (n = 3)

Untreated control = DMEM free serum

Positive control = DMEM + 2% FBS



ภาพที่ 6 การเชื่อมต่อของบาดแผลหลังการทำให้เกิดรอยแผลด้วยวิธี scratch assay ของสารสกัดผักเป็ด (P. oleracea) ความเข้มข้น 1, 10, และ 25 µg/mL ในเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ (HaCaT cell) ที่เวลา 0, 6, 24, 36, 48, และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated Control) และ Positive Control

Untreated control = DMEM free serum

Positive control = DMEM + 2% FBS

การอภิปรายผล

การศึกษานี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ *In Vitro* โดยเริ่มจากการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการสมานแผล 5 ชนิด (สารสกัดเปลือกส้ม สารสกัดใบหม่อน สารสกัดผักแพว สารสกัดผักเป็ดขาว และสารสกัดผักเป็ด) มาทดสอบการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์เคอราติโนไซต์มนุษย์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดสมุนไพรแสดงฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ทุกชนิด ยกเว้นสารสกัดผักแพว ซึ่งผลการทดสอบนี้แตกต่างกับรายงานการวิจัยที่พบว่าผักแพว ช่วยสมานแผลในหนูได้⁶

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ *In Vitro* โดยเริ่มจากการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการสมานแผล 5 ชนิด โดยการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ สมุนไพรที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เปลือกส้ม (C.stellatopilosus) หม่อน(M.alba) ผักแพว (P.Odoratum) ผักเป็ดขาว (A.Sessilis) ผักเป็ด (P.Oleracea) พบว่าสารสกัดผักเป็ด ความเข้มข้น 10 µg/mL สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ดีที่สุด ($90.29 \pm 8.15\%$) ส่วนสมุนไพรชนิดอื่นได้แก่

สารสกัดเปลือกน้อย และสารสกัดผักเป็ดขาว ให้ผลไม่แตกต่างจาก Untreated Control เช่นเดียวกัน

กล่าวโดยสรุปสารสกัดจากสมุนไพรมีฤทธิ์สมานแผล 5 ชนิด แสดงฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เคอราติโนไซต์ได้ทุกชนิด ยกเว้นสารสกัดผักแพว (*P.Odoratum*)

ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่เกี่ยวข้องนำข้อมูลไปใช้ในการสนับสนุน ส่งเสริมการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้สมานแผลและเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทย

เอกสารอ้างอิง

1. กมลวรรณ เจนวิถีสุข. กระบวนการหายของแผล และการรักษา. ศรีนครินทร์เวชสาร. 2556; 28: 10-17.
2. Koga T., Kawada H., Utsui Y., Domon H., Ishii C., Yasuda H.. H. Bactericidal effect of plaunotol, acytoprotective antiulcer agent, against *Helicobacter pylori*. Journal Antimicrobial Chemother. 1996; 38(3): 387-97.
3. Bandna D., Neha S., Dinesh K., Kamal, J. *Morus Alba* Linn: A Phytopharmacological review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013; 5: 14-18.
4. Omidiran M.O., Baiyewu R.A., Ademola I.T., Fakorede O.C., Toyinbo E.O., Adewumi O.J., et all. Phytochemical analysis, nutritional composition and antimicrobial activities of white mulberry (*Morusalba*). Pakistan Journal of Nutrition. 2012; 11(5): 456-460.
5. วิทยา บุญวรพัฒน์. สารานุกรมสมุนไพรไทย-จีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สมาคมศาสตร์การแพทย์แผนจีนในประเทศไทย. 2554.
6. Fathi F.M., Harita H., Mahmood A. A., Suzy S.M., Salmah I., Zahra A.A., et all. Acceleration of wound healing activity by *polygonatumodoratum* leaf extract in rats. Journal of Medicinal Plant Research. 2011; 8(13): 523-528.
7. วิทย์ เทียงบุญธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้งเฮาส์. 2531.
8. Sunil S., Jalalpur M.B., Patil R., Chimkode A.T.. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternantherasessilis* Linn. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. 2004; 38: 918-22.
9. Chen B., Zhou H., Zhao W., Zhou W., Yuan Q., Yang G.. Effects of aqueous extract of *Portulacaoleracea* L. on oxidative stress and liver, spleen leptin, $PAR\alpha$ and FAS mRNA expression in high-fat diet induced mice. Molecular Biology Reports. 2012; 39: 7981-7988.
10. Chan K., Islam M.W., Kamil M.. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulacaoleracea* L. subsp. *Sativa* (Haw.) Celak. Journal of

Ethnopharmacology. 2000; 73: 445–451.

11. Rashed A.N., Afifi F.U., Disi, A.M.
Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulacaoleracea* L. (growing in Jordan) in *Musmusculus* JVI-1. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 88: 131–136.
12. Kim S.H., Jakher R., Kang S.C.
Apoptotic properties of polysaccharide isolated from fruiting bodies of medicinal mushroom *Fomesfomentarius* in human lung carcinoma cell line. [Internet]. 2015 [cited 2015 January12]. Available from:<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc-/3.0>.