



Evaluation of the proliferative and cell migration effect of *Clinacanthus nutans* powder on human gingival fibroblast cell line

Ratchaporn Srichan, Suwanna Korsuwanawong, Supaporn Mala

Research office, Faculty of Dentistry, Mahidol University.

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of *Clinacanthus nutans* on proliferation and gap closure migration assays on Human Gingival Fibroblast (HGF) cell line.

Materials and Methods/Study designs: HGF cell line was seeded 2×10^4 cells/well for a 96-well plate and incubated at 37°C in 5% CO_2 incubator for 24 hours. HGF cells were treated with the herbal extracts at concentrations of 0.01, 0.05, 0.10 and 0.25% (W/V). MTT assay was used to evaluate cell cytotoxicity. Cell proliferation, the cells was seeded 2×10^3 cells/well for a 96-well plate and were cultured for 1, 3, 5, 7, 10, and 14 days. After treatment with various concentrations of herbal extracts. MTT assay was used to evaluate cell proliferation. The scratch motility assay was used to assess inhibition of HGF Cell migration. The cells was seeded 1×10^5 cells/well for a 24-well plate. After treatment with various concentrations of herbal extracts. Gap closure cell migration assay was calculated using Image Pro Plus program (version 7.0).

Results: The herbal extracts showed no toxicity to HGF cultures in all tested concentrations. Moreover, the extracts promoted cell proliferation and cell migration, which had an invert relationship to the concentration. *Clinacanthus nutans* at the concentration of 0.01, 0.05 and 0.10 % showed the proliferative rate at 168, 179 and 164%, which were significantly difference of the control ($p < 0.05$). Extracts at concentrations of 0.01, 0.05, 0.10 and 0.25% induced cell migration at 78.12, 77.17, 70.47 and 68.54%, respectively and showed statistically significance when compared to the control group at 55.0% ($p < 0.05$).

Conclusion: *Clinacanthus nutans* extracts promoted cell migration and cell proliferation, suggesting an alternate adjunctive regimen for oral wound healing.

Key words: *Clinacanthus nutans* powder, Human gingival fibroblast cell line, Cell cytotoxicity, Cell proliferation, Cell migration, MTT assay

How to cite: Srichan R, Korsuwanawong S, Mala S. Evaluation of the proliferative and cell migration effect of *Clinacanthus nutans* powder on human gingival fibroblast cell line. M Dent J 2015; 35: 299-310.

Correspondence author:

Suwanna Korsuwanawong
Research office
Faculty of Dentistry, Mahidol University
6 Yothi St., Rachatawee
Bangkok 10400, Thailand.
Tel: 02-200-7620-24
Fax: 02-200-7698
E-mail: Suwanna.aut@mahidol.ac.th

Received: 20 May 2015

Accepted: 11 August 2015



การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรพญาอต่อการกระตุ้น การแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

ราชพร สีจันทร์, สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์, สุภาพร มาลา

สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพญาอในด้านความเป็นพิษและการกระตุ้นการแบ่งตัวและการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

วิธีการ: นำเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ชนิดต่อเนื่อง มาใส่เพลทชนิด 96 หลุมๆละ 2×10^4 เซลล์ นำเพลทมาบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชม. และนำสารทดสอบสมุนไพรพญาอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.25 (น้ำหนัก/ปริมาตร) มาศึกษาประเมินความเป็นพิษโดยวิธี MTT ส่วนการศึกษาการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ จะนำเซลล์มาใส่เพลทชนิด 96 หลุมๆละ 2×10^3 เซลล์ จำนวน 6 เพลท/ครั้ง/สมุนไพร ภายหลังจากใส่สารทดสอบสมุนไพรพญาอ นำเพลทมาบ่มในตู้ เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน เพื่อศึกษาการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา และนำเซลล์มาใส่เพลทชนิด 24 หลุมๆละ 1×10^5 เซลล์ จำนวน 3 หลุม/ความเข้มข้น/สมุนไพร ภายหลังจากใส่สารทดสอบสมุนไพรพญาอ นำเอาเฉพาะเลี้ยงเซลล์มาบ่มในตู้ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อศึกษาการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยการกรีดแผ่นเซลล์ให้เกิดช่องว่างด้วยทิปพลาสติก ขนาด 200 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มควบคุมใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มอย่างเดียว วัดการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยโปรแกรมอิมเมจโปรฟอส รุ่น 7.0 โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลอง: จากการศึกษาสารสกัดสมุนไพรพญาอทุกความเข้มข้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ ส่วนฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในการเพิ่มจำนวนเซลล์พบว่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) ที่สัมผัสสารสกัดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 เท่ากับ 168%, 179% และ 164% ตามลำดับโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับ 100% ด้านการแบ่งตัวและเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.25 มีฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ในการสมานแผล เท่ากับ 78.12%, 77.17%, 70.47% และ 68.54% ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เท่ากับ 55.0%

สรุปผลการทดลอง: สารสกัดสมุนไพรพญาอ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.25 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ และมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ ผลที่ได้มีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการสมานแผลและการรักษาโรคในช่องปากได้

รหัสคำ: สมุนไพรพญาอ, เซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์, การทดสอบหาความเป็นพิษของเซลล์, การแบ่งตัวและการเพิ่มจำนวนเซลล์, การเคลื่อนที่ของเซลล์

วิธีอ้างอิงบทความนี้: ราชพร สีจันทร์, สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์, สุภาพร มาลา. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรพญาอต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์. ว.ทันต. มหิดล 2558; 35: 299-310.

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:

สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์
สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล
6 ถ.โยธี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ : 02-200-7620-24
โทรสาร : 02-200-7622
โทรศัพท์มือถือ : 081-340-5694
อีเมล : Suwanna.aut@mahidol.ac.th
วันรับเรื่อง: 20 พฤษภาคม 2558
วันยอมรับการตีพิมพ์: 11 สิงหาคม 2558

บทนำ

สมุนไพรได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมาเป็นเวลานาน แม้ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์การแพทย์จะก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว สารสกัดจากสมุนไพรธรรมชาติต่างๆที่มีผู้ศึกษาวิจัยส่วนใหญ่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อในช่องปาก เช่น เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) เชื้อสเตรปโตคอคคัส แซงควิส (*Streptococcus sanguis*) และเชื้อราแคนดิดา (*Candida albicans*) มักจะใช้เพื่อช่วยยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก ช่วยบรรเทาอาการเหงือกอักเสบ ช่วยทำให้เหงือกแข็งแรง เป็นต้น¹ นอกจากนี้ยังมีสมุนไพรที่ใช้เพื่อดับกลิ่นปาก ลดการอักเสบ

สมุนไพรพญาอ เป็นสมุนไพรไทยที่พบในประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกแตกต่างกัน ได้แก่ เสดดพังพอนตัวเมีย พญาปล้องทอง พญาปล้องดำ ผักมันไก่ ผักลิ้นเจียด ลิ่นมังกร โปะโซ้งาง สมุนไพรเสดดพังพอนมี 2 ชนิด คือ ตัวผู้และตัวเมีย ตัวผู้จะมีหนาม สรรพคุณอ่อนกว่าเสดดพังพอนตัวเมีย นิยมเรียกเสดดพังพอนตัวเมียว่า “พญาอ” มีลักษณะเป็นไม้พุ่มแกมเลื้อยสูง 1-3 เมตร เถาและใบมีสีเขียวไม่มีหนาม ใบยาวเรียวยาวปลายแหลม ออกตรงข้ามเป็นคู่ ดอกออกเป็นช่อ อยู่ที่ปลายกิ่ง แต่ละช่อมี 3-6 ดอก กลีบดอกเป็นดอกปลายแยกสีแดงอมส้ม พญาอขึ้นได้งามในดินที่สมบูรณ์ แสงแดดปานกลาง พบได้ทั่วไปตามป่าในประเทศไทย เป็นพืชตระกูลแคนตาซีอี (Acanthaceae)² แพทย์พื้นบ้านใช้รักษาโรคผิวหนังจำพวกเรื้อรัง งูสวัด และแก้พิษแมลงกัดต่อย สารสกัดจากสมุนไพรพญาอ มีผู้รายงานฤทธิ์การยับยั้งการติดเชื้อไวรัส การเกิดการแพ้และลดการอักเสบ³ ของสารสกัดจากสมุนไพรพญาอ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพญาอในด้านฤทธิ์ลดการอักเสบ ศึกษาโดยการนำสารสกัดเอ้นบิวทานอล(n-butanol) ให้หนูขาวรับประทาน พบว่าลดการอักเสบของอุ้งเท้า

หนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสาร Carrangenan⁴⁻⁶ ต่อมา มีการใช้สารพญาอในรูปครีมที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ซึ่งได้จากการใช้สารสกัดเอทานอล 95% และสารสกัดเอทานอลในน้ำ ทาเฉพาะที่ให้กับหนูขาว พบว่าสามารถลดหนองและการเกิดการอักเสบแบบแกรนูโลมา (granuloma)⁷

ผลงานวิจัยเกี่ยวกับการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ พบว่าเมื่อใช้สมุนไพรพญาอที่ผสมกลีเซอริน เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อช่องปากของมนุษย์ (human oral keratinocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่พัฒนาขึ้นโดย Pibooniyom และคณะ ในปี ค.ศ. 2002 ที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ซีรัมจากสัตว์ เช่น fetal bovine serum หรือ human serum ที่ได้รับการเติม epidermal growth factor และ bovine pituitary extract พบว่าระดับความเข้มข้นของกลีเซอรินพญาอที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ นั้นเท่ากับ 10 ไมโครลิตร/5 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ Pibooniyom และคณะได้ทดสอบนำสารกลีเซอรินพญาอที่ความเข้มข้น 1/10 และ 1/100 ทดสอบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยการนับเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์ (Hemocytometer) พบว่า จำนวนเซลล์ที่สัมผัสกับสารกลีเซอรินพญาอทั้ง 2 ความเข้มข้น มีจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่สัมผัสสารสกัดนาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

จากการทดสอบความเป็นพิษพบว่า สารสกัดพญาอในเอ้นบิวทานอลมีค่า LD50 โดยมีปริมาณสารที่ให้กับสัตว์ทดลอง (lethal dose) เท่ากับ 13.4 กรัม/กิโลกรัม ภายหลังให้สารสกัดทางปาก และค่าเท่ากับ 3.4 กรัม/กิโลกรัม เมื่อฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อให้สารสกัดทุกวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนูขาว แต่น้ำหนักต่อมไทมัสลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่น้ำหนักตับเพิ่มขึ้น และไม่พบความผิดปกติต่ออวัยวะอื่นๆ รวมทั้งไม่มีอาการแทรกซ้อนอื่นๆที่ไม่พึงประสงค์⁸

ส่วนผลงานวิจัยเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ มีการศึกษาการแยกคุณลักษณะทางเภสัชระหว่าง สมุนไพรพญายอจากประเทศไทยกับประเทศ อินโดนีเซีย (ศึกษาเบื้องต้น)⁹ พบว่าสารสกัดสมุนไพร พญายอที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ทำให้เกิดการ เคลื่อนที่ของเซลล์ endothelial cells (ECs) ได้ มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สาร ทดสอบและที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ จากการทดลอง พบว่าสารสกัดพญายอที่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้เร็วมาก ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และกลุ่ม ควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบมีการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ ดีกว่ากลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดพญายอที่ความ เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์ ทางสถิติพบว่า การเคลื่อนที่ของเซลล์ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) นั่นคือ การเคลื่อนที่ของเซลล์อาจเกิดจาก ระยะเวลาในการทดสอบใช้เวลานานเกินไป

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้ เพื่อ ศึกษาผลของสารสกัดพญายอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน ด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ การกระตุ้นการแบ่งตัวของ เซลล์ และกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใย ของเหงือกมนุษย์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือก มนุษย์

นำเซลล์ไลน์หรือเซลล์ต่อเนื่องของเซลล์สร้าง เส้นใยของเหงือกมนุษย์ (Human Gingival Fibroblast cell line หรือ HGF cell line) (ATCC Lot. No 58007727, CRL 2014) เพาะเลี้ยงในภาชนะสำหรับ เลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm² ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดี เอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dubbecco's Modified Eagles, Gibco, USA) ที่มีส่วนประกอบดังนี้ฟัลโบลายซีรัม ร้อยละ 10 (10% Fetal Bovine Serum) และ 100

ยูนิตของเพนนิซิลินและ 100 ไมโครกรัมของ สเตรปโตไมซินและ 0.25 ไมโครกรัมของฟังกิโซน (100 U penicillin/100 ug streptomycin/0.25 ug Fungizone) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมปริมาณ ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37°C (Forma 310 Direct Heat CO₂ incubator, USA) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน จนเซลล์โตเต็มพื้นที่ ขวดเลี้ยงเซลล์ มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว เมื่อนำมาท ดลองให้ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด ล้างด้วย ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline) จำนวน 5 มล. ล้าง 1 ครั้ง และดูดฟอสเฟต บัฟเฟอร์ซาลิน ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมทริปซินอีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ร้อยละ 0.25 จำนวน 5 มล. นำขวด เลี้ยงเซลล์บ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนได- ออกไซด์ร้อยละ 5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำทริปซินอีดีทีเอออกจากขวด นำ ขวดมาเคาะเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นขวด เติมน้ำ อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม ที่มีฟัลโบลายซีรัม ร้อยละ 10 จำนวน 10 มล. และทำการแยกเซลล์ออกจากพื้น ขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้ปิเปต ดูดและปล่อยอาหารเลี้ยง เซลล์ให้ทั่วพื้นขวด 2-3 ครั้ง ดูดเซลล์จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครทิว (microtube) จากนั้น ทำการนับจำนวนเซลล์โดยเติมสีทริปแพนบลู (trypan blue) ร้อยละ 0.4 (0.4% trypan blue stain; Gibco, USA) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยดูด ปล่อยขึ้นลงจำนวน 1-2 ครั้ง นำส่วนผสมมาจำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่เครื่องนับเซลล์ (Hemocytometer; Hausser Scientific Horham, USA) เพื่อนับจำนวน เซลล์ที่ยังมีชีวิต จากนั้นนำเซลล์จากภาชนะเลี้ยงเซลล์ มาปรับให้ได้เซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/มล. เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

เตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญายอ ที่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) แล้วเจือจางด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ตัวอย่างความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.25 ตามลำดับ

การเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ (Corning Inc., USA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อโดยทำภายในตู้ปลอดเชื้อ Biohazard Safety Cabinet Class II นำเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ จำนวน 1×10^5 เซลล์/มล. ปริมาตร 1 มล. ใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นดูดเซลล์ขึ้นลงโดยใช้ปิเปตเพื่อให้เซลล์แยกจากกัน จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (Forma Direct Heat: CO₂ Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน

การทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญาอในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

นำเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (Corning® Costar®, USA.) ใส่เซลล์หลุมละ 200 ไมโครลิตร ให้ได้เซลล์จำนวน 2×10^4 เซลล์/หลุม นำภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มเพาะในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยฟิเบส บัฟเฟอร์จำนวน 2 ครั้ง ดูดตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญาอ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.25 ตามลำดับ จำนวน 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม โดยทดสอบความเข้มข้นละ 10 หลุม โดยกลุ่มควบคุมจะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารทดสอบ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำภาชนะเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ใน 6 ช่วงเวลา คือ วันที่ 1, 3, 5, 7, 10 และ 14 จากนั้นนำมาทดสอบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้สารละลายเอ็มทีที (MTT; 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2, 5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue) (MTT dye, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ความ

เข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในแต่ละหลุม จำนวน 50 ไมโครลิตร/หลุม นำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ที่ทิ้งแล้วเติม ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) หลุมละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทเทอร์เพลทรีดเดอร์ (Micro titre plate reader, Epoch, Bio-Tek Instrument Inc, Verment, USA) ที่มีความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ด้วยสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \text{ODs} \times 100 / \text{ODctrl} (1)$$

โดยที่ ODs คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มตัวอย่าง ODctrl คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยสถิติ One-way ANOVA : Post hoc Multiple Comparisons (Dunnett) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 18.0 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญาอในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

นำเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ใส่ในหลุมเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (Corning®, Costar®, USA.) จำนวน 15 หลุม เสร็จแล้วนำภาชนะเพาะเลี้ยงมาบ่มเพาะในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์โตเต็มพื้นที่เพลท มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว จากนั้นใช้ปลายทิปพลาสติกขนาด 200 ไมโครลิตร กรีดตรงแนวเส้นผ่านศูนย์กลางหลุมของถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ จะเกิดช่องว่างของเซลล์ที่พื้นภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีความกว้าง 1 มม. จากรอยทิปพลาสติก¹¹ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยฟิเบสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ดูดตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญาอที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01,

0.05, 0.1 และ 0.25 จำนวน 1000 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดสอบ โดยทำความสะอาดชั้นละ 3 หลุม ถ่ายภาพเซลล์ด้วยกล้อง Nikon D 5100 camera ที่ติดกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ส่วนกลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเดียว นำภาชนะเพาะเลี้ยงอบในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำการทดสอบด้วยสารตัวอย่างครบเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว มาล้างด้วยฟิเบส บัพเฟอร์จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วยเมทานอล (Methanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ร้อยละ 25 และย้อมด้วยสีโทลูไดินบลูโอร้อยละ 0.2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) (Toluidine Blue O, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้าสู่ช่องว่างด้วยโปรแกรมอิมเมจโปรพลัส รุ่น 7.0

การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงค่าร้อยละของการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น และใช้ student's t-test เปรียบเทียบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม หรือความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการทดลอง

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญาเสือในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสสารสกัด

สมุนไพรพญาเสือ เป็นเวลานาน 24 ชม. ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.25 มีค่าเท่ากับ 108.81, 106.82, 99.96 และ 99.89 ตามลำดับ ตามตารางที่ 1 และ รูปที่ 1

การทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญาเสือในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์จากการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ พบว่าในช่วงระยะที่เป็น exponential phase หรือระยะที่เซลล์แบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ พบว่าระหว่างวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 (รูปที่ 2: A-1) สมุนไพรพญาเสือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05 และ 0.1 มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งตัวของเซลล์ (% cell proliferation) เท่ากับ 168,179 และ 164 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารตัวอย่างทดสอบ (100%) และพบว่าสารสกัดสมุนไพรพญาเสือมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามตารางที่ 2 (Table 2) และรูปที่ 2 (Figure 2) : A-1 และ A-2

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรพญาเสือในการกระตุ้นการแบ่งตัวและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.25 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับ 78.12, 77.17, 70.47 และ 68.57 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบมีการเคลื่อนที่ของเซลล์เท่ากับ 55.0% โดยจากการทดลอง

Table 1 Percent cells viability of HGF exposed to *Clinacanthus nutans* extracts.

Concentrations (%w/v)	Percent cell viability
Negative control	99.15±2.54 ^a
0.01	108.81±2.68 ^a
0.05	106.82±2.84 ^a
0.10	99.96±2.67 ^a
0.25	99.89±2.72 ^a
Positive control	9.22±2.05 ^b

พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ความเข้มข้น มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวในการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามตารางที่ 3 รูปที่ 3 และ 4

บทวิจารณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพญาอพบว่าสมุนไพรชนิดนี้ มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ เป็นเวลา 5 วัน และภายหลังจากนั้นอัตราการแบ่งตัวของเซลล์เริ่มลดลง โดยพบว่ามีอัตราการตายสูงกว่าอัตราการเพิ่ม

จำนวนเซลล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดสมุนไพร พบว่า กลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญของเซลล์อยู่ในระดับต่ำกว่าอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มทดสอบที่ใส่สารสมุนไพรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากการศึกษามีผู้รายงานพบว่า สารสกัดสมุนไพรพญาอมีสารสำคัญคือ เฟลโวนอยด์ เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ลดการอักเสบ¹² นอกจากนี้ยังพบ รายงานสารสกัดเอทานอลจากใบพญาอขนาด 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลต่อไซโตไคน์ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยไปยับยั้ง interleukin-1- β แต่ไม่มีผลต่อ

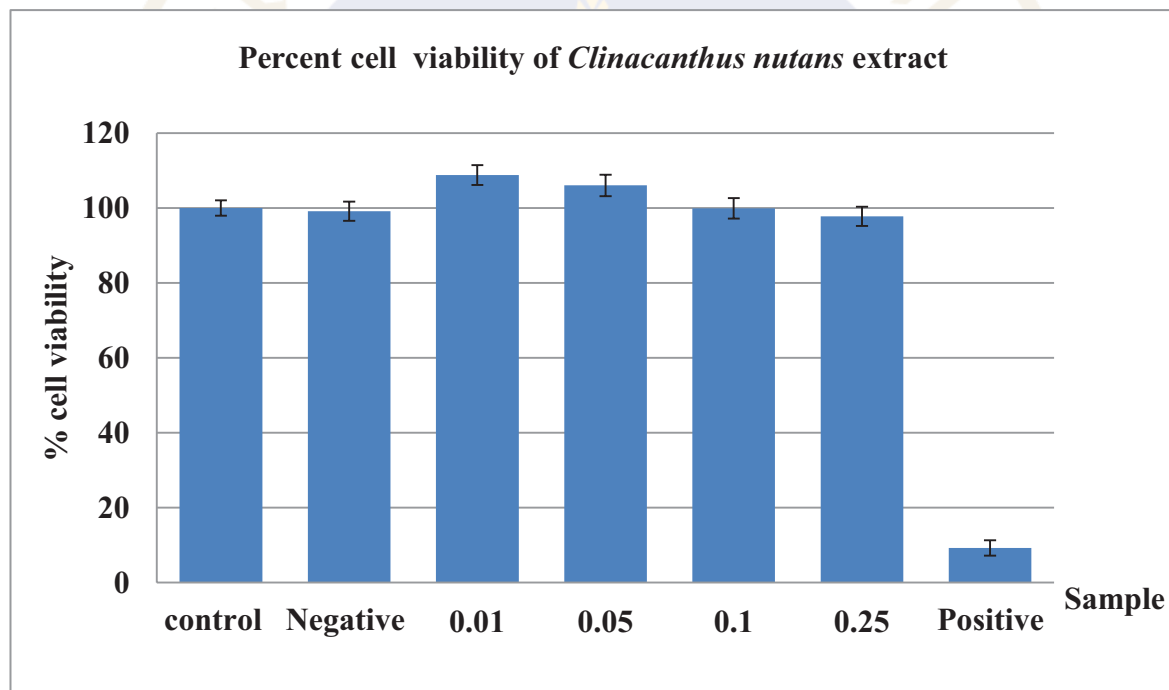


Figure 1 Percent cell viability of HGF exposed to *Clinacanthus nutans* extract with concentration of 0.01%, 0.05%, 0.10%, and 0.25% (w/v)

Table 2 Cell Proliferation of Human Gingival Fibroblast cell line in *Clinacanthus nutans*

Concentrations (% w/v)	Percent cell proliferation
Control	100.00±3.57 ^a
0.01	167.45±10.57 ^b
0.05	179.40±15.35 ^b
0.10	163.52±11.35 ^b

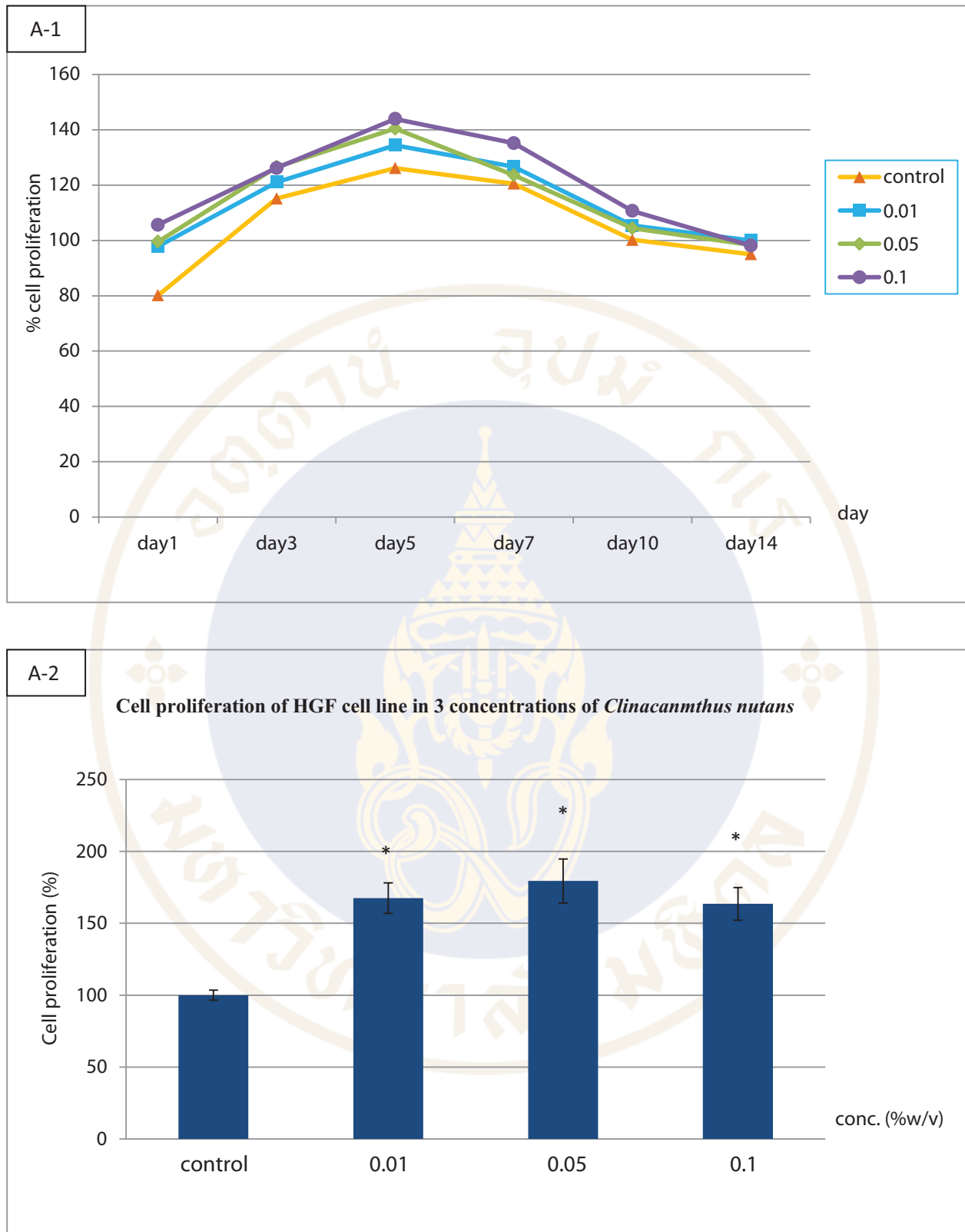


Figure 2 Cell Proliferation of Human Gingival Fibroblast cell line with *Clinacanthus nutans* concentration of 0.01%, 0.05% and 0.10% (w/v)

interleukin-6¹³⁻¹⁴ ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาการต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรต่างๆ เช่น ใบสาบแร้ง รากตึงต้น โดยใช้เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาให้เซลล์สัมผัสกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS; Lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่งสาร cytokines ต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E2 ซึ่ง

การลดลงของสารทั้ง 2 ตัวนี้ ถูกใช้เป็นดัชนีที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของสารทดสอบ ซึ่งการศึกษาต้นแบบการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ถูกใช้ในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ¹⁵⁻¹⁸ พญายอ นับเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคเรื้อรัง แผลในช่องปาก ผลงานการวิจัยสมุนไพรพญายอ มีผู้รายงานว่ใบพญายอสามารถลดการอักเสบ โดยกอง

Table 3 Cell migration of HGF with *Clinacanthus nutans* concentration of 0.01%, 0.05%, 0.10%, and 0.25% (w/v)

Concentrations (%w/v)	Percent cell migration
Control group	54.77 ± 2.73 ^a
0.01	78.12 ± 3.92 ^b
0.05	77.17 ± 4.85 ^b
0.10	70.47 ± 3.92 ^b
0.25	68.57 ± 4.42 ^b

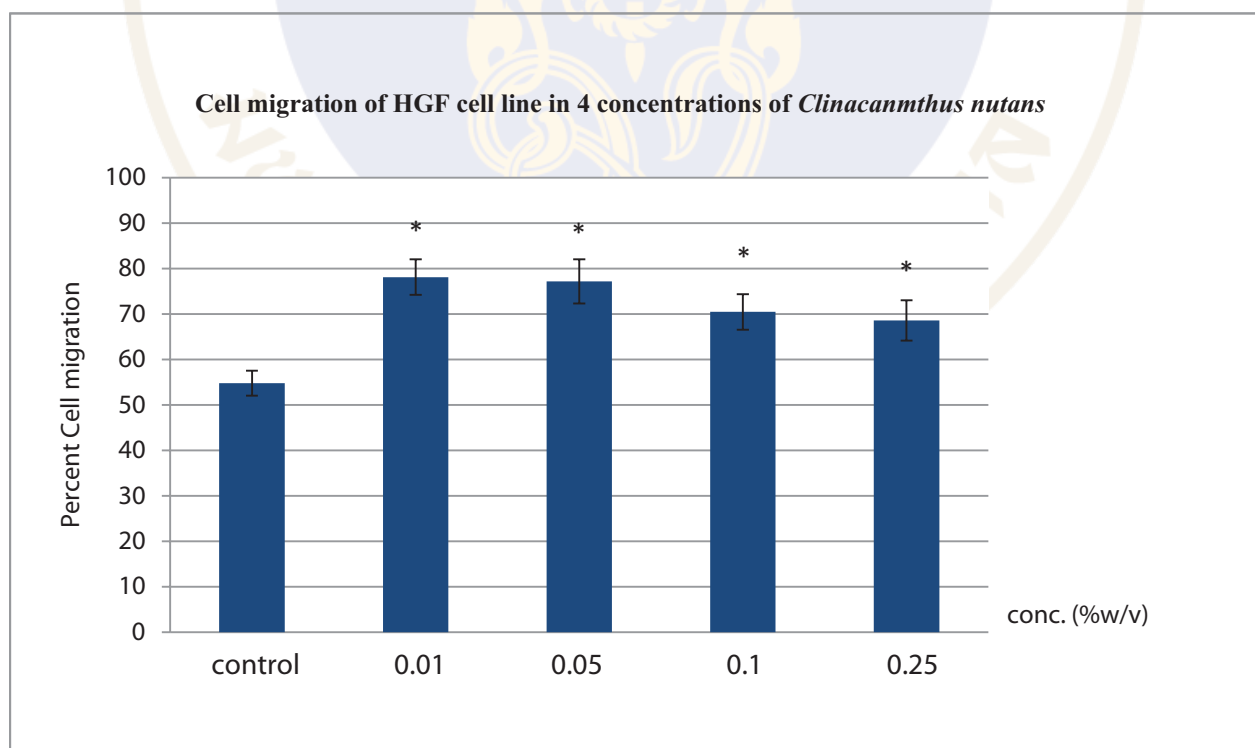


Figure 3 Cell migration of HGF with *Clinacanthus nutans* concentration of 0.01%, 0.05%, 0.10%, and 0.25% (w/v)

วิจัยและพัฒนาสมุนไพรร่วมกับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพญาใบในหลอดทดลองต่อเชื้อไวรัส HSV-2 ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคเริม พบว่า สารสกัดจากใบพญาใบมีฤทธิ์ทำลายเชื้อดังกล่าวได้สูง ส่วนการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพญาใบต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ แสดง

ให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรพญาใบมีสารสำคัญที่สามารถให้เซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์เคลื่อนที่จากขอบของเซลล์ที่เป็นช่องว่างทำให้เซลล์มีการสมานกันจากช่องว่างที่เกิดขึ้นจากการใช้ปลายทิปพลาสติกกรีดได้มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรพญาใบอาจมีสารสำคัญที่อาจทำให้เกิดการสมานแผลของเซลล์ได้ดี

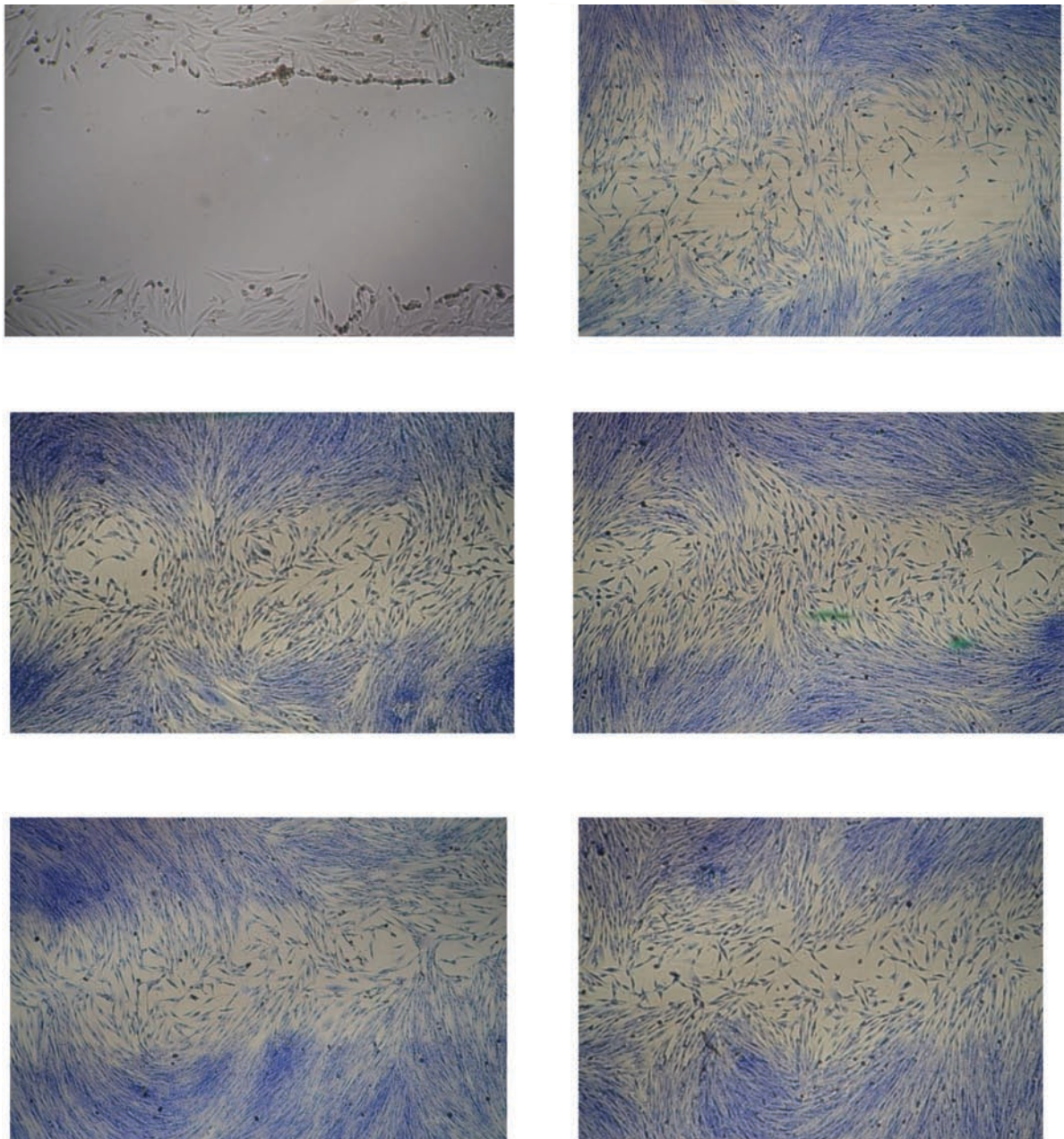


Figure 4 Cell migration of HGF with *Clinacanthus nutans* concentration of 0.01%, 0.05%, 0.10%, and 0.25% (w/v) after 24 hours incubation at 37°C in 5% CO₂ incubator

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สมุนไพรพญาายที่เป็นผง พบว่าประสิทธิภาพต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 และ 0.05 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจำนวนเซลล์จะแบ่งตัวลดลง ส่วนประสิทธิภาพต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ในการสมานแผลให้ผลที่ความเข้มข้นที่ต่ำร้อยละ 0.01 ส่วนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.05, 0.1 และ 0.25 การเคลื่อนที่ของเซลล์จะน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Roeslan และคณะ¹⁹ ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งอาจมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องดังต่อไปนี้²⁰ แหล่งของพืชสมุนไพร สมุนไพรแต่ละชนิดเมื่อเก็บจากแต่ละแหล่ง แต่ละพื้นที่ก็จะมีปริมาณสารออกฤทธิ์แตกต่างกันไป เนื่องจากวิธีการปลูก ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ในดินแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน สภาพภูมิอากาศก็มีความแตกต่างกันด้วย ส่วนต่างๆของพืชที่นำมาใช้ก็จะมีสารออกฤทธิ์แตกต่างกัน หรือแม้แต่พืชส่วนเดียวกัน เช่น ส่วนใบ ใบอ่อนกับใบแก่ ก็จะมีสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไปด้วย ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ก็จะทำให้สารออกฤทธิ์ปริมาณที่แตกต่างกันไป และวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ก็จะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ออกมาแตกต่างกัน

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบสมุนไพรพญาาย ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ ทั้งนี้จากการศึกษาถึงพบฤทธิ์ของสารสกัดพญาายต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และการสมานแผล (wound healing) จากการศึกษานี้ครั้งนี้อาจใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาสมุนไพรไทยเพื่อผลิตเป็นยารักษาโรคในช่องปากต่อไป แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงกลไกอื่นๆที่สัมพันธ์กับการกระตุ้นการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ก็ยังคงมีความสำคัญที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

Funding: None

Competing interest: None

Ethical approval: None

Reference

1. Lee SS, Li Y. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices : results of an in vitro diffusion method study. *J Am Dent Assoc* 2004; 135: 1133-41.
2. Tiangburanatham W. *Dictionary of Thai medicine plants*. 4th ed. Bangkok: Prachoom Karn Pim;1996.
3. Satayavivat J, Bunyapraphatsara N, Kittisiripornkul S, Tanasomwong W. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Thai J Phytopharm* 1996; 3: 7-17.
4. Kittisiripornkul S, Bunyapraphatsara N, Tanasomwong W, Satayavivat J. The anti-inflammatory action and toxicological studies of *Clinacanthus nutans*. Proceedings of the first *Princess Chulabhorn Science Congress* Bangkok, Thailand. 1987; 10-13.
5. Satayavivat J, Bunyapraphatsara N, Kittisiripornkul S, Tanasomwong W. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau. *Thai J Phytopharm* 1996; 3: 7-17.
6. Tanasomwong W. The screening of anti-inflammatory action of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau: a critical evaluation of carrageenan-induced hind paw edema model. *MS Thesis*, Mahidol University, 1986.
7. Suntararuks S, Satayavivat J, Vongsakul M, Wanichanon C, Thiantanawat A, Akanimanee J. The study of immunologic effects of *Clinacanthus nutans* extract in male Wister rats. *The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress Chemicals in the 21st Century* 1999; 28: P-24.
8. Satayavivat J, Bunyapraphatsara N, Kittisiripornkul S, Tanasomwong W. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau. *Thai J Phytopharm* 1996; 3: 7-17.
9. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2007; 2: 329-33.

10. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
11. Sato Y, Rifkin DB: Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1199-1205.
12. Chuakul W. Chemical study of the antiinflammatory agents from the leaves of Phayaa Plong Thong, *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. *MS Thesis*, Faculty of Pharmacy, Mahidol Univ, Thailand, 1986.
13. Thamaree S, Rugruntham K, Ruangrunsi N, Thaworn N, Kemsri W. The inhibitory effects of extracts of some herbal medicines on the production of proinflammatory cytokines by in vitro stimulated human blood cells. *Thai J Pharm Sci* 1998; 22: S47.
14. Thamaree S, Rugruntham K, Ruangrunsi N, Thaworn N, Kemsri W. The inhibitory effects of andrographolide and extracts of some herbal medicines on the production of proinflammatory cytokines by LPS-stimulated human blood cells. *Chula Med J* 2001; 45: 661-70.
15. Zhang L, Anjaneya SR, Sundar RK, Sang CJ, Narsimha TS, John B, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 12361-12367.
16. Diaz P, Jeong SC, Lee S, Khoo C, Koyyalamudi SR. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine* 2012; 7: 26.
17. Ravipati AS, Zhang L, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Bartlett J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complem. Altern M* 2012; 12: 173.
18. Buapool D, Mongkol N, Chantimal J, Roytrakul S, Srisook E, Srisook K. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of Plucheaindica leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *J Ethnopharmacol* 2013; 4: 495-504.
19. Roeslan MO, Dechatiwongse T Na Ayudhya, Koontongkaew S. Characteristics of *Clinacanthus nutans* extraction from Thailand and Indonesia (Preliminary study). *Proceedings of the 1st National Graduate Conference*; 2012 December 18. Thammasat University, Pathum Thani: Sci-Health; 2012: 002.
20. Faculty of Pharmacy, Mahidol University and The Thailand Research Fund, *Guide to Herbal research in animal*. Candlelight Press Publishing, 2002.