ว.วิทย. มข. 48(1) 166 - 174 (2563) KKU Sci. J. 48(1) 166 - 174 (2020)

ฤทธิ์เวชสำอางของสารสกัดเปลือกยางนาผ่านการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนัง

Cosmeceutical effects of *Dipterocarpus alatus* bark extract via collagen synthesis stimulation of dermal fibroblast

ศิริพร ดวงพรม[1] และ แคทรียา สุทธานุช[1*]

[1]ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Siriporn Duangprom[1] and Khaetthareeya Sutthanut[1*]

[1]Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand.

[*]Corresponding Author E-mail: khaesu@kku.ac.th

Received: 26 June 2019 | Revised: 11 September 2019 | Accepted: 22 October 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษและฤทธิ์เวชสำอางของสารสกัดเปลือกยางนา (*Dipterocarpus alatus Roxb.*) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนัง NHDF โดยตรวจสอบผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay ผลต่อการสร้างปริมาณคอลลาเจนของเซลล์ โดยใช้ชุดทดสอบสีย้อมคอลลาเจน และผลต่อประสิทธิภาพในการรักษา (สมาน) แผลในแบบจำลอง การเคลื่อนที่ของเซลล์ (*in vitro* cell migration model) ซึ่งพบว่าสารสกัดเปลือกยางนากระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ และสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสของผิวหนัง ซึ่งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกยางนาความเข้มข้น 100 µg/mL มีจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสและปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ คิดเป็นร้อยละ 161.04 - 282.57 และ 103.69 – 136.81 ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ โดยสอดคล้องกับผลการศึกษาความสามารถในการสมานแผล ที่สารสกัดเปลือกยางนาความเข้มข้น 100 µg/mL สามารถลดความกว้างของรอยขีดเสมือนบาดแผล ร้อยละ 59.50 – 71.35 ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันและใกล้เคียงกันกับสารมาตรฐานกรดแกลลิค ที่ความเข้มข้น 5 µg/mL ซึ่งสามารถลดความกว้างของรอยขีดเสมือนบาดแผลได้ร้อยละ 64.53 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติทางชีววิทยาของสารสกัดเปลือกยางนา ในกระตุ้นการสมานแผล ในแบบการศึกษาจำลอง ที่มีกลไกเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาส ซึ่งข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาวิจัยและพัฒนาต่อยอดเพื่อการนำสารสกัดเปลือกยางนาไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเวชสำอางชะลอวัยอย่างเป็นรูปธรรมต่อไป

ABSTRACT

This research aimed to investigate cytotoxic and cosmeceutical effect of *Dipterocarpus alatus Roxb*. (Yang-na in Thai) bark extract, the influencing on cell viability by using MTT assay and in collagen synthesis of dermal fibroblasts by using a collagen dye test, and potential on wound healing using an *in vitro* cell migration model.The potential of Yang-na bark extract concentration 100 µg/mL was demonstrated, the increasing of fibroblast cell proliferation and synthesized collagen content as high as 161.04 - 282.57% and 103.69 – 136.81% of control, respectively. Accordantly, wound healing effect of Yang-na extract was manifested in reduction of wound-mimic scratch lesion (width of 59.50 – 71.35% of control) at 48 h after Yang-na treatment. This was found in similar manner as gallic acid at concentration of 5 µg/mL, the standard reference (scratch lesion width of 64.53%of control). The results exhibited the beneficial biological properties of Yang-na bark extract concentration 100 µg/mL in wound healing process with mechanisms related stimulation of cell proliferation and collagen synthesis in dermal fibroblasts. The obtained information will be useful for further research and development for substantial utilization of Yang-na bark extract in medical and aesthetical anti-aging purposes.

คำสำคัญ: ยางนา เซลล์ไฟโบรบลาสของผิวหนัง การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การสร้างคอลลาเจน การสมานแผล

Keywords: *Dipterocarpus alatus* Roxb, Dermal fibroblast, Cell proliferation, Collagen synthesis, Wound healing

บทนำ

พืชสมุนไพรธรรมชาติที่มีกลุ่มสารสำคัญในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ที่มีรายงานในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ผิวหนัง ซึ่งถูกพบได้อย่างกว้างขวาง เช่น เกาลัด (Squillaci et al., 2018) สารสกัดชาเขียว (Zhang et al., 2006) กุหลาบมอญ (Park et al., 2017) เป็นต้น และในปัจจุบันนี้พบว่าพืช *Dipterocaepus alatus Roxb*. หรือคนไทยเรียกว่า ยางนา เป็นพืชที่ถูกพบมากในประเทศไทย และเป็นพืชอนุรักษ์ในรัชกาลที่ 9 ซึ่งตามภูมิปัญญาท้องถิ่นมีการใช้ประโยชน์น้ำมันจากต้นยางนาในการรักษาแผลที่เน่าเปื่อย เปลือกยางนานำมาต้มเพื่อบำรุงรักษาร่างกาย ใบและเมล็ดนำไปต้มใส่เกลือเพื่อรักษาอาการปวดฟันได้ เป็นต้น (ฐานข้อมูลสมุนไพร, 2016) อีกทั้งยังมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช *Dipterocaepus alatus* ในการต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Aslam et al., 2015) และมีการรายงานว่าสารสกัดเปลือกยางนามีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิค (gallic acid) (สุพิชญา, 2561). นอกจากนี้ยังสามารถพบสารกลุ่มนี้ได้ในพืช ผัก ผลไม้ เช่น องุ่น ชาเขียว เปลือกโอ๊ค สตอเบอรี่ มะนาว กล้วย สับปะรด (Yeh and Yen, 2005) ซึ่งสารกลุ่มฟีนอลิกมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ต้านอนุมูลอิสระ (Abdelwahed et al., 2007) ต้านการอักเสบ เสริมสร้างการกระตุ้นคอลลาเจนในเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาส ยับยั้งเอนไซม์เมทัลโลโปรติเนส (metalloproteinase enzymes; MMPs) MMPs เช่น MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจนชนิดต่างๆ ที่อยู่ในโครงสร้างภายนอกเซลล์ของเนื้อเยื่อ

คอลลาเจน เป็นโปรตีนเส้นใยที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ทำหน้าที่ยึดโยงกันอยู่เพื่อทำให้โครงสร้างของผิวแข็งแรง โดยจะพบในชั้นหนังแท้ (dermis layers) (Ahtikoski et al., 2003) สังเคราะห์โดยเซลล์ไฟโบรบลาสในชั้นหนังแท้ จากงานวิจัยพบว่าการฉายรังสี UV ส่งผลให้เกิดการผลิตอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) มากเกินไป ทำให้อนุมูลอิสระส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ MMPs (Fisher et al., 2009) ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโครงสร้างเนื้อเยื่อที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วยคอลลาเจน อิลาสติน และไกลโคสะมิโนไกลแคน และมีอีกหลายสาเหตุของการลดลงของคอลลาเจน เช่น การสัมผัสกับแสงแดด (Jariashvili et al., 2012) มลพิษ มลภาวะ ดังนั้นการสังเคราะห์คอลลาเจนในผิวหนังและการย่อยสลายคอลลาเจนโดยใช้สารเคมี (Sharma et al., 2010) หรือสารสกัดจากธรรมชาติ (Choi et al., 2010; Cimino et al., 2007; Lephart et al., 2014; Phetpornpaisan et al., 2014)

เมื่อผิวหนังและเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บไม่ว่าจะเป็นแผลเล็กหรือแผลขนาดใหญ่ จะทำให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองของการสมานแผลหรือการหายของแผล (wound healing response) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างผสมผสานโดยการทำงานของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (bio-chemical) จนกระทั่งแผลตกสะเก็ดและเป็นรอยแผลเป็น ดังนั้นเมื่อเกิดบาดแผลจึงมีกระบวนการหายของแผลเกิดขึ้นตามลำดับ มีความเกี่ยวข้องซึ่งกันและกันในแต่ละระยะ โดยจะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อเนื่องทับซ้อนกันไป แบ่งได้เป็น 4 ระยะ (Beitz, 2005; Jones et al., 2004) ดังนี้ ระยะห้ามเลือด (Hemostasis) ระยะอักเสบ (Inflammation) จะเป็นระยะที่มีการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว คือ นิวโตรฟิล (neutrophil) และแมคโคเฟจ (macrophage) (เปลี่ยนมาจาก monocyte) จะทำหน้าที่จับกินเชื้อโรค และหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) และสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ต่างๆ มีการเจริญเติบโต (growth factors) และช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจนและโปรตีน และกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (granulation tissue) ระยะที่ 3 ระยะแบ่งเซลล์ (Proliferation or Granulation) ระยะนี้มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในแผล (granulation tissue) ซึ่ง fibroblast จะเคลื่อนเข้ามาในแผลและเพิ่มจำนวนขึ้น โดยการกระตุ้นของ growth factors ได้แก่ PDGF และ TGF-β1 ร่วมกับ extracellular-matrix molecules โดย fibroblast จะผลิต proteoglycans ซึ่งมีลักษณะเป็นสารคล้ายกาว (glue-like ground substance) ที่ช่วยเติมพื้นที่ช่องว่างในแผลให้เต็มเคลือบและเชื่อมไฟเบอร์ (fiber) เข้าด้วยกัน ทำให้มีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น และผลิต fibronectin ช่วยในการสร้างกรอบ (framework) สำหรับเนื้อเยื่อใหม่โดยการยึดคอลลาเจนและเซลล์เข้าไว้ด้วยกันและจับติดไว้กับพื้นผิว (ground substance) ระยะที่ 4 ระยะเสริมสร้างความแข็งแรง (remodeling or Maturation)เป็นระยะสุดท้ายของการหายของแผลเป็นกระบวนการที่ช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของเส้นใยคอลลาเจน โดย คอลลาเจนเดิมจะถูกแทนที่ด้วยคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่และแข็งแรงกว่า ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของแผล (tensile strength) กระบวนการนี้จะเกิดต่อเนื่องควบคู่ไปกับการเคลื่อนตัวของ fibroblast และเสริมสร้างให้เกิดความแข็งแรงของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่จึงมีผลทำให้เกิดแผลเป็นที่หดเล็กลง บาง และมีสีซีด

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหายของแผล แบ่งออกเป็น 2 ปัจจัยใหญ่ๆ กล่าวคือ ปัจจัยภายใน เช่น การที่เนื้อเยื่อได้รับเลือดไปเลี้ยงอย่างเพียงพอเป็นสิ่งที่สำคัญในการนำสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลาย เพื่อนำไปทำลายเชื้อแบคทีเรีย สร้างภูมิต้านทาน สังเคราะห์คอลลาเจน และสร้างเยื่อบุผิว และสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามินและแกลือแร่ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยในเรื่องของอายุ สภาวะของโรค และภาวะเครียดของแผลที่มีผลต่อการหายของแผลอีกด้วย สำหรับปัจจัยภายนอก เช่น การใช้ยา การใช้รังสีรักษา (radiation therapy) การดูแลบาดแผล เป็นต้น (วิจิตรา, 2546)

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์เวชสำอางของสารสกัดเปลือกยางนา มีความน่าสนใจเนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับสารประกอบฟีนอลิก ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในสารสกัดเปลือกยางนา ซึ่งน่าจะมีฤทธิ์เวชสำอาง ซึ่งมีข้อมูลหรือรายงานในเรื่องฤทธิ์เวชสำอางค่อนข้างจำกัด แต่ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเวชสำอางของสารสกัดเปลือกยางนา โดยมุ่งเน้นผลศึกษาต่อการเซลล์ไฟโบรบลาส เพื่อที่จะนำไปสู่การนำสารสกัดเปลือกยางนาไปใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์และเวชสำอางได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

สารละลายรีเอเจนต์ ประกอบได้ด้วยดังนี้ สีย้อมคอลลาเจน (Sircol®, Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK). สารละลาย 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada). Dimethyl sulphoxide (DMSO), penicillin, streptomycin, gallic acid, 95% ethanol (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Penicillin, streptomycin, Fetal bovine serum (FBS) and 0.25% Trypsin (Gibco®, Grand Island, NY, USA). Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) (ATCC) (Lonza, New Hampshire, MA, USA).

1. การเตรียมสารสกัดเปลือกยางนา

เก็บส่วนเปลือกของต้นยางนา ซึ่งได้มาจากพื้นที่ในเขตอำเภออุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น บดให้ละเอียด นำไปแช่

(Maceration) ในตัวทำละลาย 95% เอทานอล ใช้เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกเอาส่วนใส ด้วยกระดาษกรอง (whatman® No. 1) โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง น้ำส่วนใสที่กรองแยกได้ในแต่ละครั้งรวมกัน และทำให้เข้มข้นด้วยเทคนิคการระเหยแห้งในภาวะสุญญากาศ (BÜCHI Rotavapor® R-3, Flawil, Switzerland) และทำให้ได้ผงแห้งด้วยเทคนิคการระเหิดในภาวะสุญญากาศ (Scanvac CoolSafe™, Lynge, Denmark) จากนั้นเก็บผงแห้งสารสกัดเปลือกยางนาที่ได้ ณ อุณหภูมิ -20 °C และใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส (cell culture)

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ (cell line) ในถาดเพาะเลี้ยง 96-well ใช้ความหนาแน่นเซลล์ 20,000 cells/well เลี้ยงในอาหารชนิด DMEM ที่มี 10% FBS ที่ 37 °C และมี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีปริมาณเซลล์ร้อยละ 80 – 90 โดยจะใช้เซลล์ที่อยู่ใน passage 5-8 จากนั้นนำไปใช้สำหรับการทดสอบความเป็นพิษ ผลต่อการแบ่งตัวและการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสและการกระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการศึกษา *in vitro* cell migration model ของสารสกัดเปลือกยางนา

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อของเซลล์ไฟโบรบลาส

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเปลือกยางนา ด้วยวิธี MTT assay ดัดแปลงจากการศึกษาของ Phetpornpaisan et al. (2014) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาเติมสารละลายตัวอย่างสารสกัดเปลือกยางนา โดยมี อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็นตัวทำละลาย เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 6.25 - 200 μg/mL บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังโดยเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/mL) ปริมาตร 50 μL แล้วบ่มไว้ในอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 - 6 ชั่วโมง จนเกิดเป็นผลึกฟอร์มาซาน จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนออก และล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ก่อนที่จะละลายผลึกฟอร์มาซานด้วยตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 50 μL จากนั้นเขย่าผสมเป็นเวลา 20 วินาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Thermo scientific, Canada, USA) ที่ความยาวคลื่น 570 nm ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แสดงถึงปริมาณการอยู่รอดของเซลล์ (viability) โดยรายงานผลเป็นร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ (%cell viability) เทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้เติมสารสกัดเปลือกยางนา (control group)

%cell viability = (Abs sample-blank/Abs control-blank)*100

4. การหาปริมาณคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาส

นำเซลล์ที่อยู่ในถาดเพาะเลี้ยง 96-well plate มาเติมสารละลายสารสกัดเปลือกยางนา โดยมีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็นตัวทำละลาย เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 6.25 -100 μg/mL บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนปริมาตร 100 μL มาวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน ด้วยวิธี Sircol® collagen assay ตามคู่มือของ Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK โดยเติมสีย้อม Sircol ปริมาณ 250 μL ทำให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่จำนวนรอบ 12,000xg ที่ 4 °C แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 125 μL ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg ที่ 4 °C แล้วละลายด้วยสารละลายอัลคาไลน์รีเอเจนต์ (alkali reagent) 125 μL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 nm เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณคอลลาเจน โดยรายงานผลเป็นร้อยละปริมาณของคอลลาเจน (%collagen content) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้เติมสารสกัดเปลือกยางนา (control)

%collagen content = (Abs sample-blank/Abs control-blank)*100

5. การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการศึกษา *in vitro* cell migration model

การทดสอบทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล ด้วยวิธี *in vitro* cell migration model ดัดแปลงการศึกษาจาก Phetpornpaisan et al. (2014) นำเซลล์ที่อยู่ในถาดเพาะเลี้ยง 96-well plate ที่มีเซลล์เต็มพื้นที่ร้อยละ 80-90 จากนั้นใช้ sterile tip ขนาดปริมาตร 200 μL ขีดเส้นพาดขวางผ่านกลางหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เป็นแนวยาว เพื่อให้เกิดช่องว่างตามรอยขีด ล้างเอาเซลล์ที่หลุดออกจากการขีดออกไปด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 μL จากนั้นเติมสารละลายสกัดเปลือกยางนา ใน 2% fetal bovine serum supplemented DMEM (2% FBS DMEM) (Phetpornpaisan et al., 2014) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 – 100 μg/mL ในการศึกษามีสารละลายกรดแกลลิค (gallic acid) ความเข้มข้น 5 μg/mL เป็นตัวเปรียบเทียบ (reference wound healing agent) (Yang et al., 2016) ตามลำดับ จากนั้นบ่มเซลล์ไว้ในตู้บ่มเพาะเซลล์ ณ

อุณหภูมิ 37 °C และทำการบันทึกภาพเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon ZE122 Axiovert25, Sendai, Japan) กำลังขยาย 5 เท่า ที่เวลาต่างๆ (0, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง) ประเมินประสิทธิภาพของการรักษาแผล (would healing) จากผลจากสารสกัดเปลือกยางนาต่อการรลดลงของความกว้างของรอยขีด วัดด้วยโปรแกรม Image ProPlus 7.0 (Bethesda, MD, USA) และแสดงผลเป็นร้อยละการหายของแผล (%wound healing) เทียบกับกลุ่มควบคุม (2% FBS DMEM)

%wound healing = [ค่าเฉลี่ยความกว้างของรอยขีด ณ จุดเริ่มต้นทำการศึกษา (h = 0) – ค่าเฉลี่ยความกว้างของรอยขีดแผล ณ จุดเวลา (12 หรือ 24 หรือ 48 ชั่วโมง] x 100/ ค่าเฉลี่ยความกว้างของรอยขีดแผล ณ จุดเริ่มต้นทำการศึกษา

6. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Mean ± SD) ของแต่ละตัวอย่าง จากค่าที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) และเปรียบเทียบกับความแตกต่างของข้อมูลแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA (SPSS 17.0) และ multiple comparison โดยพิจารณาจากค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ Fisher's LSD ที่ p-value < 0.05

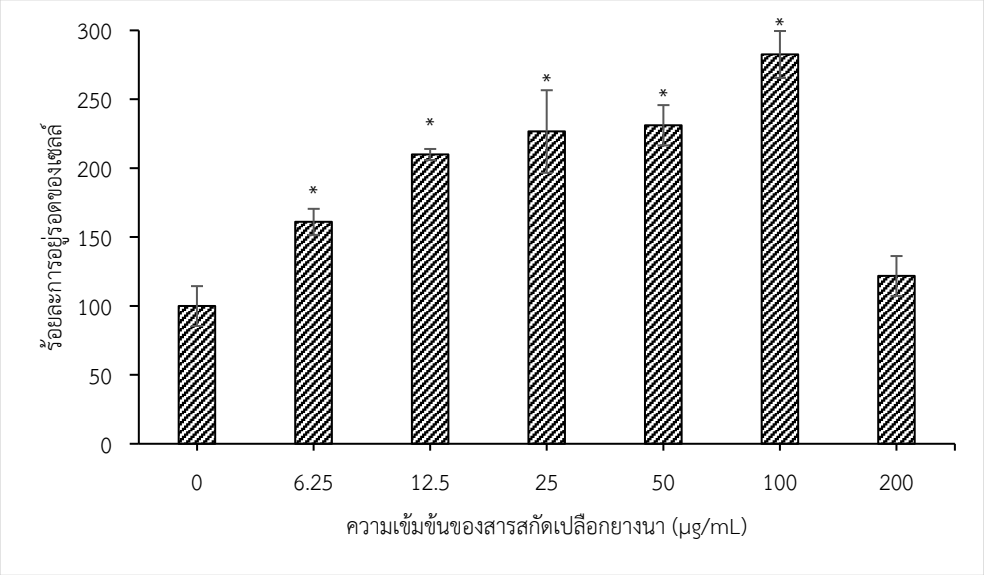
ผลการวิจัย

1. สารสกัดเปลือกยางนา

โดยนำเปลือกยางนามาสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) ใช้ตัวทำละลาย 95% เอทานอล ซึ่งได้เป็นแผงแห้งที่มีสีน้ำตาลแดงเข้มและมีร้อยละการผลิต (%yield) เท่ากับร้อยละ 5.487

2. สารสกัดเปลือกยางนาที่มีผลต่อการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส

สารสกัดจากเปลือกยางนา ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยมี %viability อยู่ในช่วงร้อยละ 161.04 - 282.57 ของกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้น 6.25 - 100 μg/mL ของสารสกัดจากเปลือกยางนาส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) และเป็นไปตามความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกยางนาที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent manner) (รูปที่ 1) ในขณะที่ความเข้มข้น 200 μg/mL ส่งผลให้เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในภาพรวมแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกยางนามีผลกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และมีความปลอดภัยสูงต่อเซลล์ไฟโบรบลาส

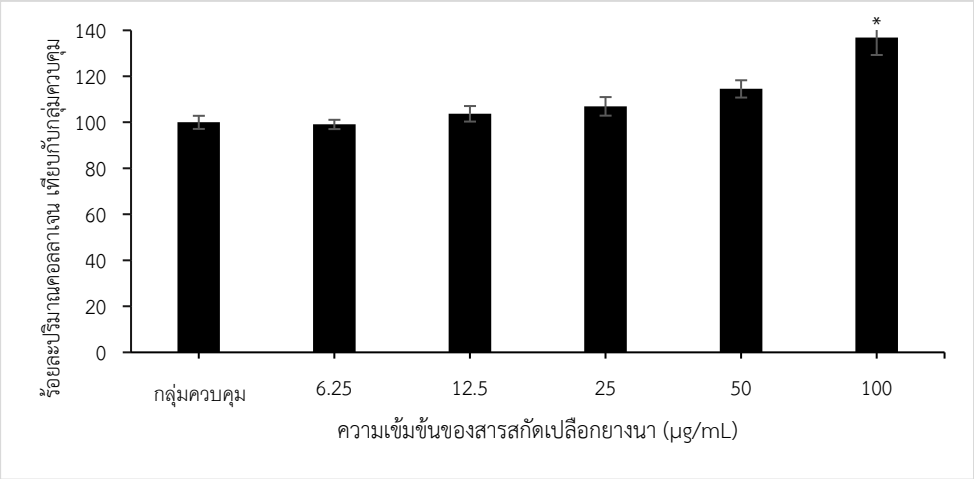


รูปที่ 1 ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ไฟโบรบลาส หลังจากที่ได้รับสารสกัดเปลือกยางนา ที่ความเข้มข้น 6.25 - 200 μg/mL (*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมทางสถิติ p-value < 0.05)

3. การกระตุ้นการสังเคราะห์คอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาส

สารสกัดเปลือกยางนา ส่งผลกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาส เป็นไปตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ในช่วงความเข้มข้นสารสกัดเปลือกยางนา 6.25 - 100 μg/mL โดยที่ความเข้มข้น 100 μg/mL ส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นมากกว่าร้อยละ 100 และสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงสุดถึงร้อยละ 136.81 ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เป็น 200 μg/mL ของสารสกัดเปลือกยางนา พบว่าไม่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาส โดยมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นในช่วงความเข้มข้นสารสกัดเปลือกยางนา 6.25 - 100 μg/mL จึงถูกใช้ในการทดสอบผลต่อการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน

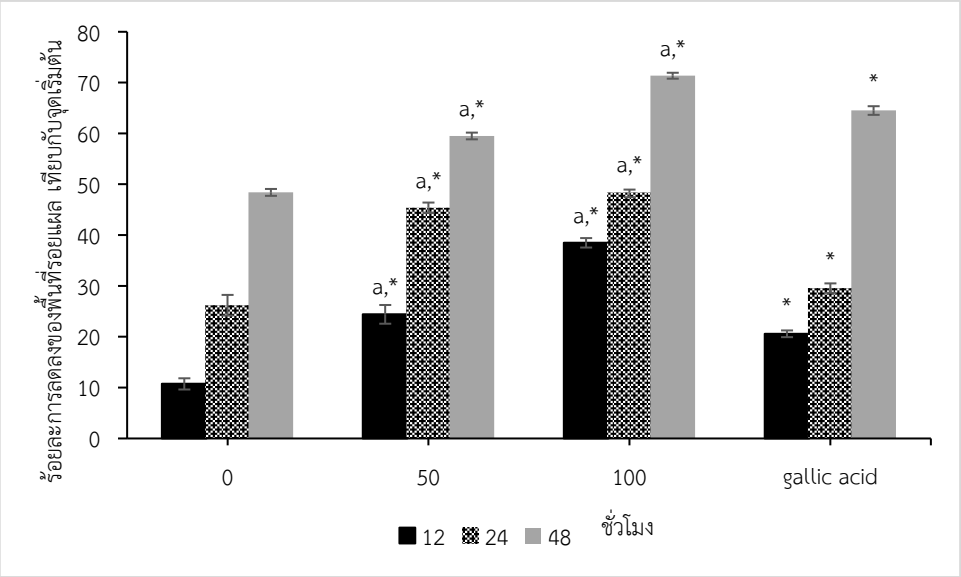
จากรูปที่ 1 และ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลร้อยละการอยู่รอดของเซลล์และการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาส จากสารสกัดจากเปลือกยางนา (YN bark) ที่ความเข้มข้นที่ 6.25-100 μg/mL พบว่าสารสกัดปลือกยางนาไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาส (รูปที่ 1) และมีการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละมากกว่า 100 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากวิทยานิพนธ์ของสุพิชญา (2561) รายงานว่าพบสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดเปลือกยางนา เช่น สารแกลลิค (gallic acid) และ เรสเวอราทอล (resveratrol) (Kasiotis et al., 2013; Lephart et al., 2014) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารในกลุ่มต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน จากผลการทดลองทำให้ทราบศักยภาพของสารสกัดเปลือกยางนาสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเวชสำอางที่เกี่ยวข้องกับการชะลอวัย โดยเซลล์ไฟโบรบลาสในผิวหนังน่าจะหนึ่งในเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกยางนาและสารสำคัญที่เกี่ยวข้อง

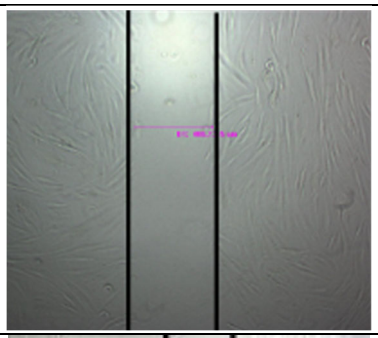
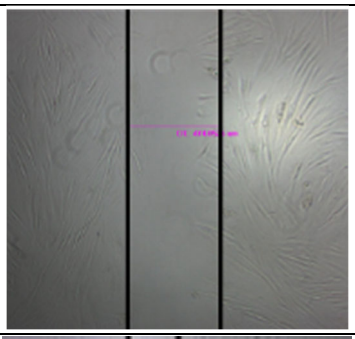
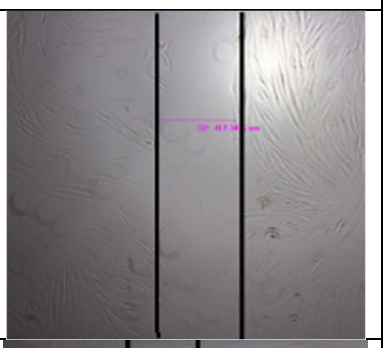
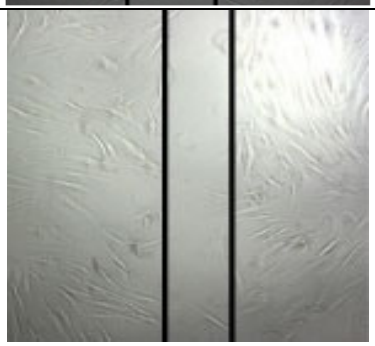
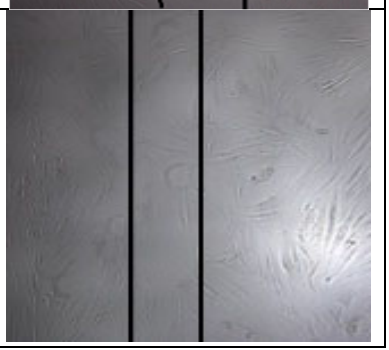


รูปที่ 2 ปริมาณคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาส โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากสารสกัดเปลือกยางนา ที่ความเข้มข้น 6.25 - 100 μg/mL (*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมทางสถิติ p-value < 0.05)

4. ผลของสารสกัดเปลือกยางนาต่อพื้นที่รอยแผล ในแบบจำลองการศึกษา *in vitro* cell migration model

ในการทดลองนี้ ซึ่งเป็นการจำลองการสมานแผลที่เกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อ ผลแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกยางนาในช่วงความเข้มข้น 50 - 100 μg/mL สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส โดยส่งผลให้พื้นที่รอยแผลลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกยางนามากขึ้น และการลดลงของรอยแผลมีขนาดเล็กลงในช่วงเวลา 12, 24, 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ของรอยแผล ณ จุดเริ่มต้น และพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง สารสกัดเปลือกยางนาที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μg/mL ทำให้พื้นที่ของรอยแผลลดลง ร้อยละ 59.50 และ 71.35 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดเปลือกยางนา ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μg/mL สามารถทำให้พื้นที่รอยแผลลดลงได้มากกว่าสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 5 μg/mL (ทำให้พื้นที่รอยแผลลดลงร้อยละ 64.53) อย่างมีนัยสำคัญที่ p-value < 0.05



Time (h)	กลุ่มควบคุม (control)	สารสกัดเปลือกยางนา 100 µg/mL	Gallic acid 5 µg/mL
0			
24			

รูปที่ 3 ผลของสารสกัดเปลือกยางนาที่ความเข้มข้น 50 - 100 µg/mL และสาร gallic acid 5 µg/mL ต่อพื้นที่รอยแผลเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ณ เวลา 12, 24, และ 48 h (*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p-value < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือ gallic acid (a) ณ จุดเวลาเดียวกัน)

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากรูปที่ 1 และ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลร้อยละการอยู่รอดของเซลล์และการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาส จากสารสกัดจากเปลือกยางนา (YN bark) โดยใช้ความเข้มข้นที่ 6.25-100 µg/mL พบว่าที่ความเข้มข้น 6.25-100 µg/mL สารสกัดปลือกยางนาไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาส คิดเป็นร้อยละมากกว่า 100 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) และ มีการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละมากกว่า 100 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากวิทยานิพนธ์ของสุพิชญา (2561) ได้ทำการควบคุมคุณภาพของสารสกัดเปลือกยางนาที่ใช้ในการศึกษานี้ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง รายงานว่าพบสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ที่เป็น

สารหลักของสารสกัดเปลือกยางนา ได้แก่ กรดแกลลิค (gallic acid) และเรสเวอราทอล (resveratrol) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (Phetpornpaisan et al., 2014, Kasiotis et al., 2013; Lephart et al., 2014) ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเปลือกยางนาที่ความเข้มข้นในช่วง 6.25-200 µg/mL ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาส ความเข้มข้น 6.25-100 µg/mL พบว่าสารสกัดเปลือกยางนามีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสและสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด โดย ณ ความเข้มข้น 100 µg/mL มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05) ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ที่พบในสารสกัดเปลือกยางนา เช่น gallic acid ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านมะเร็ง การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Abdelwahed et al., 2007; You et al., 2010) และ gallic acid ยังเป็นสารออกฤทธิ์เกี่ยวกับการสมานแผลได้ (Yang et al., 2016) จากงานวิจัยของ Yang และคณะ (2016) ได้นำสารละลายกรดแกลลิคที่ความเข้มข้น 10 µM มาใช้เป็นตัวกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ human fibroblast พบว่าเซลล์มีการเคลื่อนตัวปิดแผลได้ดี มากถึงร้อยละ 34 โดยมีกลไกเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast proliferation cell) และการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (collagen synthesis) อีกทั้งการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ส่งผลให้การหลั่ง cytokine ลดลง จึงทำให้ปริมาณของเอ็นไซน์ MMPs ลดลง และทำให้ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้น (Fisher et al., 2009) และในการเพิ่มจำนวนการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสส่งผลช่วยในการลดลงของบาดแผล (Yang et al., 2016) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในการสมานแผล *(in vitro)* บาดแผลมีขนาดลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกยางนาเพิ่มขึ้นและเป็นที่น่าสังเกต ณ ความเข้มข้นสูง 200 µg/mL ของสารสกัดยางนา ส่งผลทำให้ปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมเพียงเล็กน้อย ซึ่งแตกต่างกับผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของสารสกัดเปลือกยางนา ความเข้มข้น 100 µg/m ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับสารบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเปลือกยางนา เช่น สาร gallic acid ที่มีรายงานว่ายับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Yang et al., 2016)

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดเปลือกยางมีฤทธิ์ทางเวชสำอาง ซึ่งเกี่ยวกับการชะลอวัย เนื่องจากผลการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดเปลือกยางนาสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนและสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาส ส่งผลให้เกิดการสมานแผลได้ดีขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ทำให้เห็นถึงคุณค่าของสารสกัดเปลือกยางนาในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์ความงามได้ อย่างไรก็ตามยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในทางคลินิกในมนุษย์ (clinical trial) เพื่อยืนยันความปลอดภัยและประสิทธิผลในการออกฤทธิ์ในลำดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2558). ยางนา. ค้นเมื่อ 1 กันยายน 2560, จาก https://medthai.com/ยางนา/

สุพิชญา ลดาวัลย์. (2561). การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกยางนาต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิจิตรา กุสุมภ์. (2546). การพยาบาลผู้ป่วยที่มีบาดแผล. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Bdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M.G. and Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-penta-galloylglucose from Pistacia lentiscus. Confirmation by microarray expression profiling. Chemico-Biological Interactions 165(1): 1-13.

Ahtikoski, A.M., Koskinen, S.O.A., Virtanen, P., Kovanen, V., Risteli, J., and Takala, T.E.S. (2003). Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. Acta Physiologica Scandinavica 177(4): 473-481.

Aslam, M., Ahmad, M.S., and Mamat, A. (2015). A Phytochemical, Ethnomedicinal and Pharmacological review of genus

Dipterocarpus. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 7(4): 27-38.

Beitz, J.M. (2005). Wound Debridement: Therapeutic Options and Care Considerations. Nursing Clinics of North America 40(2): 233-249.

Choi, H.K., Kim, D.H., Kim, J.W., Ngadiran, S., Sarmidi, M.R. and Park, C.S. (2010). Labisia pumila extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. Journal of bioscience and bioengineering 109(3): 291-296.

Cimino, F., Cristani, M., Saija, A., Bonina, F.P. and Virgili, F. (2007). Protective effects of a red orange extract on UVB-induced damage in human keratinocytes. Biofactors 30(2): 129-138.

Fisher, G.J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Cho, M.K., He, T., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J.J. (2009). Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. The American Journal of Pathology 174(1): 101-114.

Jariashvili, K., Madhan, B., Brodsky, B., Kuchava, A., Namicheishvili, L. and Metreveli, N. (2012). UV Damage of Collagen: Insights from Model Collagen Peptides. Biopolymers 97(3): 189-198.

Jones, S.A., Bowler, P.G., Walker, M. and Parsons, D. (2004). Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber® dressing. *Wound* Repair and Regeneration 12(3): 288-294.

Lephart, E.D., Sommerfeldt, J.M. and Andrus, M.B. (2014). Resveratrol: influences on gene expression in human skin. Journal of Functional Foods 10: 377-384.

Park, B., Hwang, E., Seo, S.A., Zhang, M., Park, S.Y. and Yi, T.H. (2017). Dietary Rosa damascena protects against UVB-induced skin aging by improving collagen synthesis via MMPs reduction through alterations of c-Jun and c-Fos and TGF-β1 stimulation mediated smad2/3 and smad7. Journal of Functional Foods 36: 480-489.

Phetpornpaisan, P., Tippayawat, P., Jay, M. and Sutthanut, K. (2014). A local Thai cultivar glutinous black rice bran: A source of functional compounds in immuno-modulation, cell viability and collagen synthesis, and matrix metalloproteinase-2 and -9 inhibition. Journal of Functional Foods 7: 650-661.

Sharma, S.R., Poddar, R., Sen, P. and Andrews, J.T. (2008). Effect of vitamin C on collagen biosynthesis and degree of birefringence in polarization sensitive optical coherence tomography (PS-OCT). African Journal of Biotechnology 7(12): 2049-2054.

Squillaci, G., Apone, F., Sena, L.M., Carola, A., Tito, A., Bimonte, M., Lucia, A.D., Colucci, G., Cara, F. and Marques, I.P. (2018). Chestnut (Castanea sativa Mill.) industrial wastes as a valued bioresource for the production of active ingredients. Process Biochemistry 64: 228-236.

Yang, D., Moh, S., Son, D., You, S., Kinyua, A., Ko, C., Song, M., Yeo, J., Choi, Y. and Kim, K. (2016). Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. Molecules 21(7): 899-913.

Yeh, C.T. and Yen, G.C. (2005). Effect of vegetables on human phenolsulfo- transferases in relation to their antioxidant activity and total phenolics. Free Radical Research 39(8): 893-904.

You, B.R., Moon, H.J., Han, Y.H. and Park, W.H. (2010). Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. Food and Chemical Toxicology 48(5): 1334-1340.

Zhang, Q., Paul Kelly, A., Wang, L., French, S.W., Tang, X., Duong, H.S., Messadi, D. and Le, A. (2006). Green Tea Extract and (−)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibit Mast Cell-Stimulated Type I Collagen Expression in Keloid Fibroblasts via Blocking PI-3K/Akt Signaling Pathways. Journal of Investigative Dermatology 126(12): 2607-2613.

❑❑❑❑❑