บทวิทยาการ

ผลของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์: ความเป็นพิษต่อเซลล์และการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลอง

The Effects of Adlay Extract on Primary Human Osteoblast Cells: Cytotoxicity and *In vitro* Calcification

ธิดารัตน์ อังวราวงศ์[1], นรีกานต์ จันทกนกากร[2], นิรชา เจริญกิจจาธร[2], วรินทร ตรีวัฒนา[1], อรอุมา อังวราวงศ์[3]

Thidarat Angwarawong[1], Nareekarn Chantakanakakorn[2], Niracha Chareonkitjatorn[1], Warinthon Triwatana[1], Onauma Angwaravong[3]

[1]สาขาวิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

[1]Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen

[2]คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

[2]Faculty of Dentistry, Khon Kean University, Khon Kaen University, Khon Kaen

[3]สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

[3]Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen

บทคัดย่อ

โรคกระดูกพรุนเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของโลก ซึ่งโรคนี้มีผลทำให้มวลกระดูกลดลงและทำให้โครงสร้างจุลภาคภายในกระดูกมีการเสื่อมสลายลง ส่งผลให้ความแข็งแรงของกระดูกลดลง รวมถึงส่งผลต่อกระบวนการออสซิโออินทิเกรชันในผู้ป่วยที่ต้องการทำรากเทียม หลายปีที่ผ่านมามีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติเพื่อหวังผลในการป้องกันโรคกระดูกพรุนและส่งเสริมกระบวนการสร้างกระดูก มีรายงานว่าสารสกัดลูกเดือยมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนเซลล์ สามารถกระตุ้นการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ระดับแคลเซียมและความหนาแน่นของกระดูกหนู อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดที่ทำการทดสอบผลของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ ดังนั้นในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของสารสกัดลูกเดือยต่อความเป็นพิษต่อเซลล์และการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ โดยประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีทีที่ประกอบด้วยสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3 15 30 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมที่ได้จากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2 และ 15 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง และประเมินผลของสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองด้วยการย้อมอะลิซารินเรดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัมที่ได้จากลูกอ่อนวัวร้อยละ 15 ที่เวลา 14 และ 21 วัน ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ รวมถึงสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่สารสกัดลูกเดือยที่เวลา 72 ชั่วโมง ทั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมที่ได้จากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2 และ 15 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สนันสนุนการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลอง ผลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับเตรียมพื้นผิวไททาเนียมสำหรับรากเทียมทางทันตกรรมเพื่อนำไปใช้ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับกระดูกพรุนต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: การพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลอง, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์, สารสกัดลูกเดือย

Abstract

Osteoporosis is one of the major public health problems of the world. The disease causes the loss of bone mass and degeneration of bone microarchitecture resulting in decreased bone strength and osseointegration process is also affected in implant patient. In the past decade, a large number of research on various natural products has been conducted to find a way to prevent osteoporosis and promote osteogenesis. It has been revealed that adlay extract can increase cell proliferation and upregulates alkaline phosphatase activity, calcium level and bone density in mouse model. However, there is a lack of the study on the effect of adlay extract on primary human osteoblasts. This research thus aimed to examine the cytotoxicity and *in vitro* calcification of adlay extract on human osteoblasts. Cytotoxicity was evaluated using MTT assay, testing adlay extract at concentration of 3, 15, 30, 150, 300, and 600 µg/ml prepared in DMEM with 2 % and 15 % fetal bovine serum (FBS) at 24, 48, and 72 hours. Alizarin Red-S staining was used to analyze *in vitro* calcification of osteoblasts cultured in DMEM containing 15 % FBS and different concentrations of adlay extract and at 14 and 21 days. Results from this study showed that 3-600 µg/ml adlay extract had no toxic effect on primary human osteoblasts, and that 150, 300 and 600 µg/ml adlay extract promoted cell proliferation when compared to control group at 72 hours in both 2 % and 15 % FBS in DMEM. Furthermore, 3-600 µg/ml adlay extract increased *in vitro* calcification. This study served as initial information for its future use for surface modification of dental implant in patient with osteoporotic bone.

Keyword: *In vitro* calcification, cytotoxicity, primary human osteoblasts, adlay extract

Received Date: Jan 8, 2019 **Revised Date:** Jan 29, 2019 **Accepted Date:** Feb 26, 2019
Doi: 10.14456/jdat.2019.37

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:
ธิดารัตน์ อังวราวงศ์ สาขาวิชาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002 ประเทศไทย
โทรศัพท์: 043 202 405 โทรสาร: 043 202 862 อีเมล: thidarat_ang@hotmail.com
Correspondence to:
Thidarat Angwarawong, Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand.
Tel: 043 202 405 Fax: 043 202 862 E-mail: thidarat_ang@hotmail.com

บทนำ

โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) นับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของโลก เกิดจากความไม่สมดุลของกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling process) ที่มีอัตราการสลายมากกว่าอัตราการสร้างกระดูก ลักษณะของโรคมีผลให้มวลกระดูก (bone mass) ลดลง โครงสร้างจุลภาคของกระดูกมีการเสื่อมสลาย (bone microarchitectural deterioration) ทำให้กระดูกเปราะมากขึ้น จึงส่งผลต่อความแข็งแรงของกระดูกและเพิ่มโอกาสกระดูกหัก[1,2] มีการอ้างว่ากระดูกของผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกพรุนมีลักษณะคล้ายกับกระดูกที่มีความหนาแน่นระดับดีสี่ (D4)[3] ตามการจำแนกของมิช (Misch bone density classification)[4] ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นโรคกระดูกพรุนและมีการสูญเสียฟัน การทดแทนฟันที่สูญเสียไปด้วยรากเทียม (dental implant) ไม่ถือว่าเป็นข้อห้ามใช้[3,5,6] มีรายงานว่าอัตราความล้มเหลวของการบูรณะด้วยรากเทียมในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกพรุนไม่มีความแตกต่างกับผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี[6-8] สิ่งที่มีความสำคัญเพื่อให้เกิดความสำเร็จในการบูรณะด้วยรากเทียมในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกพรุนคือการให้

คำวินิจฉัยและการวางแผนการรักษาอย่างระมัดระวังและถูกต้อง มีคำแนะนำว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะของกระดูกที่พรุน ควรมีการสร้างเสริมมวลกระดูกก่อนการรักษาด้วยรากเทียม ร่วมกับการเพิ่มจำนวนรากเทียม เพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เพิ่มความยาวและเพิ่มพื้นผิวของรากเทียม (implant body area) รวมถึงควรเลือกรากเทียมให้มีรูปร่าง (implant geometry) ที่เหมาะสมและมีการปรับสภาพพื้นผิวของรากเทียมให้เอื้อต่อการเกิดกระดูกเชื่อมประสาน หรือกระบวนการออสซิโออินทีเกรชัน (osseointegration)[3-5] ในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามปรับปรุงพื้นผิวของรากเทียมไททาเนียมเพื่อหวังผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เพื่อเพิ่มการสร้างกระดูกรอบรากเทียมให้มีมวลกระดูกมากขึ้นสำหรับการยึดรากเทียมในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกพรุน[9,10]

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (natural products) หลายชนิด เช่น ส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata*) พวงไข่มุกหรืออัลเดอร์เบอร์รี (*Sambucus williamsii* Hance หรือ Elderberry) และซัวจู (*Fructus Corni* หรือ Dogberry) ในการรักษาโรคกระดูกพรุน เนื่องจากวิธีนี้จะช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์ และมีความเหมาะสมต่อการรักษาระยะยาวมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาที่ผ่านการสังเคราะห์ทางเคมี นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติกลุ่มนี้สามารถเพิ่มการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกในด้านต่าง ๆ ได้ เช่น การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) การแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) และการพอกแร่ธาตุของกระดูกในหลอดทดลอง (*in vitro* bone mineralization) ผ่านการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของการสร้างกระดูก (bone marker) และวิถี (pathway) ที่เกี่ยวข้อง[11]

ลูกเดือย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Coix lachryma-jobi* L. แต่เป็นที่รู้จักในชื่อภาษาอังกฤษว่า adlay หรือ coix หรือ Job's tears หรือ Chinese pearl barley ลูกเดือยสามารถพบได้หลายประเทศในเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น จีน อินเดีย ญี่ปุ่น เกาหลี ไทยและมาเลเซีย มีส่วนประกอบหลัก คือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยแร่ธาตุ (เช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และโปแตสเซียม) วิตามิน แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ไฟโตสเตอรอล (phytosterols) โพลีฟีนอล (polyphenols) และแลคแทม (lactams)[12] ลูกเดือยถูกบันทึกในตำราแพทย์แผนจีนว่ามีสรรพคุณหลายอย่าง เช่น ขับระบายความร้อน ขับปัสสาวะ ระบายหนอง กระตุ้นการทำงานของปอดและม้าม รักษาโรคไขข้อ (arthritis) ท้องร่วง (diarrhea) และโรคผิวหนัง[12-14] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดลูกเดือยมีคุณสมบัติที่ดีทางชีวภาพหลายด้าน ได้แก่ ต้านการอักเสบ (anti-inflammation)[15-17] ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant)[18-21] ต้านมะเร็ง (anti-cancer)[21-25] ต้านภูมิแพ้ (anti-allergy)[26-29] ต้านภาวะอ้วน (anti-obesity)[30] ป้องกันแผลในระบบทางเดินอาหาร (gastroprotection)[31] รวมถึงต้านการเกิดโรคกระดูกพรุน (anti-osteoporosis)[13,14]

มีการศึกษาที่รายงานผลของลูกเดือยต่อการต้านการเกิดโรคกระดูกพรุน เช่น Yang และคณะ ในปี ค.ศ. 2008[13] ที่ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูก (bone tissue culture) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากลูกเดือย (water extract of adlay) ความเข้มข้น 30-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถผันกลับการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase activity) ในเนื้อเยื่อกะโหลกศีรษะส่วนบนของหนูแรกเกิด (neonatal rat calvaria tissues) และเพิ่มระดับแคลเซียมในเนื้อเยื่อเมตาไฟเซียลของกระดูกต้นขา (femoral metaphyseal tissues) ในหนูปกติที่ถูกกระตุ้นด้วยพาราไทรอยด์ฮอร์โมนและหนูที่ตัดรังไข่ (ovariectomized mouse) นาน 4 สัปดาห์ได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Yang และคณะ[14] ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยให้ลูกเดือยร้อยละ 10 และ 30 ผสมลงไปในอาหารหนู หรือให้สารสกัดด้วยน้ำจากลูกเดือย 0.3 กรัม/กิโลกรัม/วัน กับหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ พบว่าสามารถผันกลับการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเพิ่มระดับแคลเซียมในเมตาไฟเซียลของกระดูกต้นขา และเพิ่มความหนาแน่นของกระดูกในหนูที่เป็นโรคกระดูกพรุนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากลูกเดือยที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่ได้จากกะโหลกศีรษะส่วนบนของหนูผ่านทางวิถีการส่งสัญญาณเอกซ์ตราเซลล์ลูลาร์ซิกแนล-เรกูเลทไคเนสวันทูหรือเอิร์กวันทู (extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) signaling pathway) จากที่กล่าวมาข้างต้นกลุ่มผู้วิจัยทั้ง 2 การศึกษาจึงอ้างว่าสารสกัดลูกเดือยมีความสามารถในการย้อนกลับสภาวะโรคกระดูกพรุนในหนูให้สู่สภาวะปกติได้และเสนอว่าสารสกัดลูกเดือยถือเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพในการป้องกันโรคกระดูกพรุน

แม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับผลของลูกเดือยต่อการป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุน อย่างไรก็ตามการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* study) ที่ผ่านมา ผลที่ได้จะมาจากการทดลองที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกระดูกหนู ส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จะใช้เซลล์สร้างกระดูกจากหนูและตรวจสอบเพียงการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่านั้น ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดที่ทำการทดสอบผลของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ (primary human osteoblast cells) ในการทดสอบความเป็น

พิษของเซลล์ และการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลอง (*in vitro* calcification) จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยครั้งนี้โดยคาดหวังว่าจะได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติพื้นผิวไทเทเนียมของรากเทียมเพื่อใช้ในผู้ป่วยที่มีสภาวะกระดูกพรุนต่อไปในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารละลายของสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เริ่มจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์มาตราฐานชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with phenol red, Gibco™, New York, USA) โดยการเติมแอลกลูตามีน (L-glutamine, GlutaMax™ supplement, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ยาต้านปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (antibiotic-antimycotic, Thermo Fisher Scientific) ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่มตามปริมาณของซีรัม ที่ได้จากลูกอ่อนวัว (fetal bovine serum, FBS, HyClone™ FBS, HyClone, Utah, USA) ที่จะเติมเข้าไป คือความเข้มข้นร้อยละ 2 หรือ 15 จากนั้นทำการละลายสารสกัดลูกเดือยชนิดผง (Coix lacryma extract powder, Special Natural Products Co., Ltd., Chonburi, Thailand) ให้ได้ความเข้มเข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยที่กรองสารสำหรับไซริงค์ (Minisart® syringe filter pore size 0.2 µm, Sartoriou-Stedim Biotech, Thermo Fisher Scientific) นำสารละลายของสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ได้มาเจือจางต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่เตรียมไว้จนได้สารละลายของสารสกัดลูกเดือยตามความเข้มข้นที่ต้องการคือ 300 150 30 15 และ 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์

เก็บชิ้นกระดูกมนุษย์จากการตัดปุ่มกระดูก (torectomy) ขากรรไกรบนและล่างที่ขัดขวางต่อการใส่ฟันเทียม จากอาสาสมัครที่ได้รับรายละเอียดเกี่ยวกับการทำวิจัยและเซ็นต์ชื่อในใบยินยอม ซึ่งผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE612210) ด้วยความสมัครใจ จากนั้นนำชิ้นกระดูกที่ได้มาตัดให้ได้ขนาด 2X2 ตารางมิลลิเมตร ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนหรือพีบีเอส (phosphate buffer saline, PBS) แล้วนำไปจุ่มในสารทริปซินอีดีทีเอ (trypsin-EDTA, Thermo Fisher Scientific) ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อไขมันและเนื้อเยื่อฮีมาโตโพอิติก (hematopoietic tissue) จากนั้นนำไปวางในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35x10 มิลลิเมตร (Coring, NY, USA) ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมร้อยละ 15 ภายใต้สภาวะมาตฐาน ที่ควบคุมให้มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และอากาศร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวันเว้นวันจนกระทั่งเซลล์คลานออกมาจากชิ้นกระดูกและเจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ (confluence) จากนั้นทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ไปยังฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ปริมาตร 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Coring) ในอัตราส่วน 1:2 ของเซลล์ เพาะเลี้ยงต่อจนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่นร้อยละ 80 ของพื้นที่ทั้งหมดในฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ ก่อนที่จะนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการทดลองจะนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมออสทีโอจีนิคแฟกเตอร์ (osteogenic factors) ที่ประกอบด้วยเบตากลีเซอโรฟอสเฟส (β-glycerophosphate, glycerol-2-phosphate disodium salt hydrate, Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ วิตามินซี (l-ascorbic acid sodium salt, Sigma) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเดกซาเมทาโซน (dexamethasone, Sigma) ความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์ เป็นเวลา 21 วัน ไปย้อมด้วยอะลิซารินเรด-เอส (Alizarin Red-S staining, Sigma) ร้อยละ 1 ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำ 1 ต่อ 100 โดยปริมาตร (1:100 (v/v) ammonium hydroxide/water, pH 4.2) เพื่อยืนยันคุณสมบัติการพอกแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์รุ่น (passage) ที่ 3-5 จากอาสาสมัคร 3 คน

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์โดยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

ทำการหว่านเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ความหนาแน่น $1X10^4$ เซลล์/หลุม ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม (48-well tissue culture plate, Coring) และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมร้อยละ 15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ปราศจากซีรัม เพาะเลี้ยงต่อ 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดลูกเดือยตามความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ร่วมกับซีรัมร้อยละ 2 หรือ 15 และเพาะเลี้ยงต่อ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยกำหนดให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะซีรัมแต่ไม่มีสารสกัดลูกเดือยเป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมและมีการเติมไตรตัน-เอกซ์ (Triton-X) ร้อยละ 1 เป็นกลุ่มควบคุมแบบลบ เมื่อครบกำหนดทำการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl tetrazolium bromide), MTT, USB Corporation, Cleveland, OH, USA) โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วยพีบีเอส ดูดทิ้ง จากนั้นใส่สารละลายเอ็มทีทีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่ปราศจากฟีนอลเรด (DMEM without

phenol red, Gibco) 100 ไมโครลิตร/หลุม นำไปเพาะเลี้ยงต่อ 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายเอ็มทีทีออก ล้างด้วยพีบีเอส ใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือดีเอ็มเอสโอ (dimethyl sulfoxide, DMSO, Merck, Germany) 100 มิลลิลิตร/หลุม นำไปเขย่าละลายผลึกออกแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงในไมโครเพลต (Microplate reader, Varioskan Flash, Thermo Fisher scientific) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ในการทดลองแต่ละครั้ง แต่ละกลุ่มการทดลองจะทำการหว่านเซลล์ 3 หลุม นำค่าการดูดกลืนแสงของทั้ง 3 หลุม มาหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้ของแต่ละกลุ่มมาคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแบบบวกตามสมการที่ 1 ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งจะใช้เซลล์สร้างกระดูกที่ได้มาจากอาสาสมัครคนละคน จากนั้นนำค่าเฉลี่ยร้อยการมีชีวิตรอดของเซลล์ในแต่ละครั้งที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่อไป

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูกกลืนแสงของกลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของค่าการดูกกลืนแสงของกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือย}} \quad \text{สมการที่ 1}$$

4. การพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองด้วยการย้อมอะลิซารินเรด (Alizarin red S staining)

ทำการหว่านเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ $2x10^4$ เซลล์ต่อหลุม ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม และเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมร้อยละ 15 จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่นร้อยละ 80-90 จึงเปลี่ยนไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 ที่มีการเติมออสทีโอจีนิคแฟกเตอร์และสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 0 3 15 30 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 และ 21 วัน เมื่อครบกำหนดให้คงสภาพเซลล์ด้วยเมทานอลเย็น (cold methanol) 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำไร้ประจุ (de-ionized water) แล้วย้อมด้วยสารละลายอะลิซารินเรด-เอส (Sigma) 3 นาที ดูดทิ้ง ตามด้วยการล้างด้วยน้ำไร้ประจุจนกระทั่งใส ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการวัดปริมาณแคลเซียมด้วยไซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์โมโนไฮเดรต (cetylpyridinium chloride monohydrate, Sigma) เข้มข้นร้อยละ 10 ในโซเดียมฟอสเฟส 10 มิลลิโมลลาร์ จำนวน 500 ไมโครลิตร/หลุม นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เพื่อละลายสีที่ย้อมติด (de-staining) จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับ 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละการละลายของตะกอนสีในการทดลองแต่ละครั้งจะทำการหว่านเซลล์ 1 หลุม/กลุ่ม และทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง จากเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ของอาสาสมัคร 3 คน

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2 หรือ 15 และการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วยสถิติทดสอบโคลโมโกรอฟ-สเมอร์นอฟ (Kolmogorov-Smirnov test) พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ จึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลต่อด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) และเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ด้วยวิธีเชฟเฟ (Scheffe) หรือดันเนท ที3 (Dunnett T3) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยโปรแกรมเอสพีเอสเอส (SPSS® 22.0 for window)

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีที

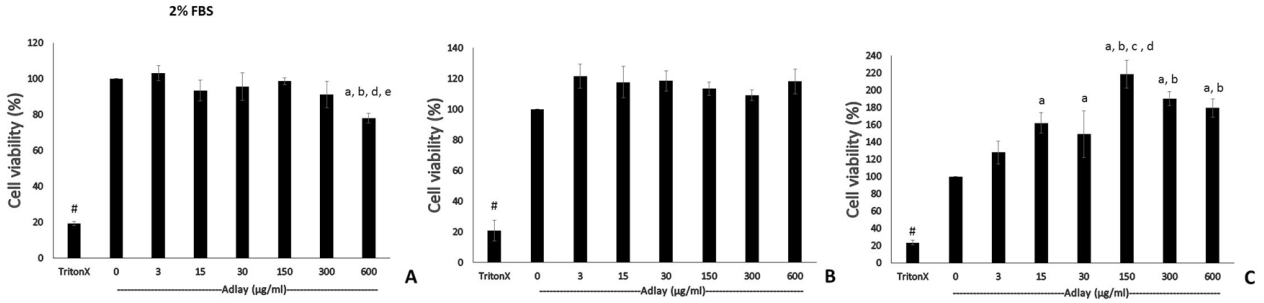
1.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2 ร่วมกับสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่ากลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้ใส่สารสกัดลูกเดือยซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมแบบบวกอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่มีความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่ใส่และใส่สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3 30 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมแบบลบมีค่าน้อยที่สุดและแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1A) จากผลการทดลองจะเห็นว่ากลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มากกว่า 80 มีเพียงกลุ่มที่มีความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้นที่มีค่าประมาณร้อยละ 77 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกเดือยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2 เป็นเวลา

24 ชั่วโมง ตรงกันข้ามกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมไตรตัน-เอกซ์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมแบบลบที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์จากค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ที่มีค่าน้อยกว่า 50

เมื่อทำการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมแบบบวก แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1B) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 48 ชั่วโมง

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนานขึ้น คือ 72 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มสารสกัดลูกเดือยความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือย และมีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในกลุ่มความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์น้อยที่สุดและแตกต่างจากกลุ่มที่มีความเข้มข้น 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่มีความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มากที่สุดและแตกต่างจากกลุ่มที่มีความเข้มข้น 0 3 15 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1C)



รูปที่ 1 *ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และซีรัมร้อยละ 2 ที่ 24 (A) 48 (B) และ 72 ชั่วโมง (C) ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) # แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างไตรตัน-เอกซ์และกลุ่มอื่น ๆ a b c d และ e แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดลูกเดือย ที่มีความเข้มข้น 0 3 15 30 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (p<0.05)*

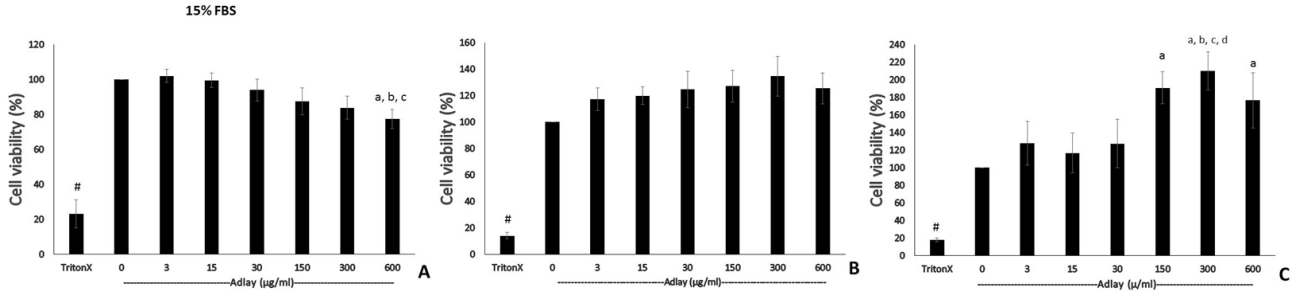
Figure 1 *Primary human osteoblast cell viability cultured in DMEM containing adlay extract at various concentrations and 2 % FBS at 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours incubation. Data were presented as the mean ± SD (n=3). # indicates significant difference between Triton-x and other groups. a, b, c, d, e indicates significant difference compared to 0, 3, 15, 30 and 150 µg/ml adlay, respectively (p<0.05).*

1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15

ผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มควบคุมแบบบวกแตกต่างกับกลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่มีความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่มีความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ประมาณร้อยละ 77 ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มความเข้มข้น 3 และ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 2A)

เมื่อทดสอบที่ 48 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ที่มีการใส่สารสกัดลูกเดือยความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมแบบบวกอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่2B)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ถึง 72 ชั่วโมง พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมแบบบวก อย่างไรก็ตามมีเพียงกลุ่มที่มีความเข้มข้น 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่านั้นที่มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มากที่สุดและแตกต่างจากกลุ่มที่ความเข้มข้น 3 15 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2C)

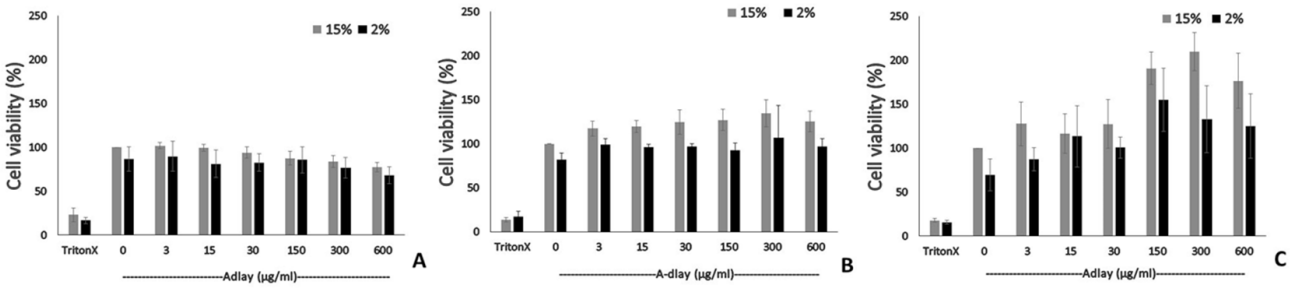


รูปที่ 2 *ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และซีรัมร้อยละ 15 ที่ 24 (A) 48 (B) และ 72 ชั่วโมง (C) ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) # แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างไตรตัน-เอกซ์และกลุ่มอื่น ๆ a b c และ d แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดลูกเดือยที่มีความเข้มข้น 0 3 15 30 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (p<0.05)*

Figure 2 *Primary human osteoblast cell viability cultured in DMEM containing adlay extract at various concentrations and 15 % FBS at 24 (A), 48 (B) and 72 (C) hours incubation. Data were presented as the mean ± SD (n=3). # indicates significant difference between Triton-x and other groups. a, b, c, d indicates significant difference compared to 0, 3, 15, 30 and 150 µg/ml adlay, respectively (p<0.05).*

1.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับร้อยละ 15

เมื่อเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2 และ 15 ที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยให้ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 และไม่มีการใส่สารสกัดลูกเดือยเป็นร้อยละ100 ของแต่ละช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 3) จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 มีค่ามากกว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อย 2 ในทุกช่วงเวลา นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดลูกเดือยที่ใส่เพิ่มเข้าไปที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้ผลต่อค่าความมีชีวิตของเซลล์สอดคล้องกันทั้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 หรือร้อยละ 2



รูปที่ 3 *ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และซีรัมร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับซีรัมร้อยละ 15 ที่ 24 (A) 48 (B) และ 72 ชั่วโมง (C)*

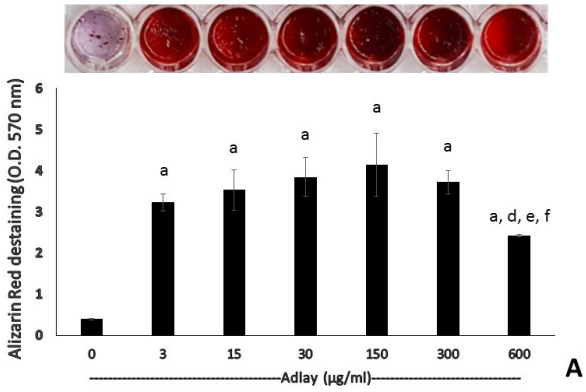
Figure 3 *Primary human osteoblast cell viability cultured in DMEM containing adlay extract at various concentrations and 2 % FBS compare to 15 % FBS at 24 hours (A), 48 hours (B), and 72 hours (C) incubation.*

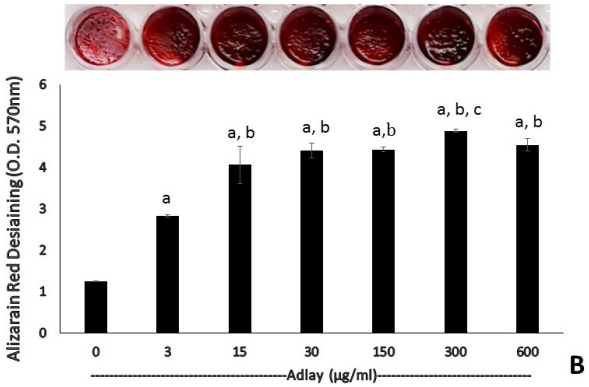
2. การพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองด้วยการย้อมอะลิซารินเรด

เมื่อทดสอบการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองด้วยวิธีการย้อมอะลิซารินเรด พบว่าที่ 14 วัน เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดลูกเดือยมีการย้อมติดสีแดงของอะลิซารินเรดมากกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยมีการพอกพูนของแคลเซียมมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใส่สารสกัดลูกเดือย ยืนยันผลที่ได้นี้จากการวัดปริมาณของแคลเซียมโดยการละลายสีแดงที่ย้อมติดด้วยไซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์โมโนไฮเดรต พบว่ากลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยในทุกความเข้มข้นจะมีปริมาณของแคลเซียมมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มสารสกัดลูกเดือยความเข้มข้น 600

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการพอกพูนแคลเซียมน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่สารกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นอื่น ๆ และมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีความเข้มข้น 30 150 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4A)

หลังจากเพาะเลี้ยง 21 วัน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลูกเดือยเพิ่มขึ้นเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์จะมีการพอกพูนของแคลเซียมมากขึ้น และมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มที่มีความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการพอกพูนของแคลเซียมน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีความเข้มข้น 15-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4B) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นจะเกิดการพอกพูนของแคลเซียมมากขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากการย้อมติดสีแดงของสีอะลิซารินเรดในวันที่ 21 มีสีแดงเข้มกว่าในวันที่ 14





รูปที่ 4 *การพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองและร้อยละการละลายสีที่ย้อมติดในเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ที่ 14 (A) และ 21 (B) วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) a b c d e และ f แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสกัดลูกเดือยที่มีความเข้มข้น 0 3 15 30 150 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (p<0.05)*

Figure 4 *In vitro calcification and percentage of alizarin red de-staining of primary human osteoblasts at 14 (A) and 21 (B) days. Data were presented as the mean ± SD (n=3). a, b, c, d, e, f indicates significant difference compared to 0, 3, 15, 30, 150, 300 µg/ml adlay, respectively (p<0.05).*

บทวิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทำการทดสอบในหลอดทดลองของสารสกัดลูกเดือยกับเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ แม้ว่าการศึกษาทางด้านชีววิทยาของเซลล์สร้างกระดูกในหลอดทดลองสามารถทำได้ในเซลล์ที่มีแหล่งที่มาแตกต่างกัน ทั้งจากเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิที่ได้มาจากหลากหลายสายพันธุ์ (species) เช่น คน หนู (mouse/rat) กระต่าย และวัว หรือจากเซลล์ไลน์ (cell lines) ที่เป็นเซลล์อิมมอร์ทัล (immortalized cells) หรือเซลล์ไลน์มะเร็ง (malignant cell lines)[32] อย่างไรก็ตามเซลล์แต่ละชนิดจะมีข้อดี ข้อด้อยและข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป เช่น การใช้เซลล์สร้างกระดูกที่ได้จากสัตว์ เช่น หนู มีข้อดี

คือนำมาใช้ได้ง่าย สามารถเลือกใช้ได้ทุกตำแหน่งของกระดูก แต่มีข้อด้อยเรื่องความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (interspecies differences) และจีโนมิกส์ (genomic) ส่วนการใช้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และมีความสัมพันธ์กับการศึกษาทางคลินิกมากกว่า แต่ก็มีข้อด้อยคือมีข้อจำกัดเกี่ยวกับตำแหน่งของกระดูดที่นำมาใช้ และอาจมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องจากอาสาสมัครแต่ละรายและความแตกต่างทางพันธุกรรมที่อาจส่งผลต่อความแข็งแรงต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่นำมาเพาะเลี้ยง การใช้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิไม่ว่าจะมาจากแหล่งใดเซลล์ที่ได้มาจะมีการเสื่อมสภาพของโครงสร้างและหน้าที่เมื่อเซลล์อายุมากขึ้น แตกต่างจากการใช้เซลล์ไลน์กระดูก (osteoblast cell line) ที่ใช้ได้อย่างไม่จำกัดจำนวนเซลล์และการดูแลรักษาทำได้ง่าย โดยเซลล์ไลน์กระดูกมีทั้งเซลล์ที่ได้จากหนู เช่น เอ็มซี3ที3-อี1 (MC3T3-E1) และเซลล์จากมนุษย์ที่เป็นเซลล์มะเร็ง เช่น ซาออซ-2 (SaOs-2) และเอ็มจี-63 (MG-63) ซึ่งเซลล์เหล่านี้อาจมีพฤติกรรมของเซลล์บางอย่างที่เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ปกติ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้เซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ในการทดลอง เนื่องจากต้องการลดปัจจัยความแตกต่างทางสายพันธุ์ของเซลล์และต้องการเชื่อมโยงผลการศึกษาที่ได้ไปใช้ในทางคลินิก

กระบวนการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก มีทั้งหมด 3 ขั้นตอน คือ 1) การเพิ่มจำนวนเซลล์ 2) การสร้างและสะสมเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) และ 3) การพอกแร่ธาตุ[33] โดยแต่ละขั้นตอนจะมีการสร้าง การสะสมสารต่าง ๆ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างนี้สามารถนำมาใช้ในการกำหนดช่วงระยะในการทดสอบการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สร้างกระดูกได้ด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน ในการศึกษานี้นอกจากจะทดสอบผลของสารสกัดลูกเดือยต่อความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์แล้ว ยังทำการทดสอบขั้นต้นอย่างง่ายเกี่ยวกับผลของลูกเดือยต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์และการพอกแร่ธาตุ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกทั้งหมด จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในขั้นตอนการสร้างและสะสมเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ต่อในอนาคต

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วีธีอะลามาร์บลู (alamarBlue assay) วิธีแอลดีเอส (lactate dehydrogenase (LDH) assay) วิธีเอทีพี (adenosine tri-phosphate (ATP) assay) และวิธีย้อมสีเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตาย (live/dead cell staining) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เลือกใช้วิธีเอ็มทีทีในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูก เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้วัดความเป็นพิษต่อเซลล์และวัดความมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับการยอมรับ ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีความแม่นยำในการทำซ้ำสูง (high reproducibility) วิธีเอ็มทีทีอาศัยหลักการว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะมีไมโทรคอนเดรียดีไฮโดรจิเนส (mitochondrial dehydrogenase) ที่จะเปลี่ยนสารละลายเอ็มทีทีซึ่งเป็นเกลือเตททราโซเลียม (tetrazolium salt) และมีสีเหลืองให้เป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีม่วง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถสะลายได้ในตัวทำละลายดีเอ็มเอสโอ ได้สารละลายสีม่วงที่สามารถนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงได้[34] การศึกษานี้เริ่มต้นทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 2 เนื่องจากต้องการลดปัจจัยในการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ที่ได้จากซีรัมและให้เห็นผลจากสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ชัดเจนยิ่งขึ้น ผลที่ได้พบว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 2 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งบอกได้จากค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือยและมีค่ามากกว่าร้อยละ 50

การศึกษานี้ยังต้องการตรวจสอบเพิ่มเติมว่าสารสกัดลูกเดือยมีผลต่อการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองหรือไม่ ซึ่งต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 14-21 วัน โดยปกติแล้วเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์จะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของซีรัมเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 10 เพื่อให้เซลล์สามารถเจริบเติบโตได้อย่างสมบูรณ์แข็งแรง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Whitson และคณะ ในปี 1992[35] และการศึกษาของ McAlinden และ Wilsont ในปี ค.ศ. 2000[36] แนะนำว่าปริมาณของซีรัมร้อยละ 15 หรือ 20 เป็นปริมาณของซีรัมที่แนะนำเพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์และการพอกพูนของแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบผลของสารสกัดลูกเดือยต่อความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ขณะที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 ด้วย ผลที่ได้พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับกลุ่มที่มีซีรัมร้อยละ 2 แต่เซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 จะมีค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเซลล์มากกว่าในกลุ่มที่มีซีรัมร้อยละ 2 ผลที่ได้นี้ช่วยยืนยันว่าซีรัมร้อยละ 15 ที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีผลต่อการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกเดือยต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์และปริมาณของซีรัมที่ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ ดังนั้นในส่วนของการทดสอบผลของสารสกัดลูกเดือยต่อการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

เมื่อพิจารณาที่ค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งที่มีซีรัมร้อยละ 2 และ

15 พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ แต่ไม่ส่งเสริมการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่สารสกัดลูกเดือย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมงกลับพบว่ากลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจนไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือย แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าในกลุ่มที่อาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรัมร้อยละ 2 สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 15 30 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่สารสกัดลูกเดือย ขณะที่กลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 15 สารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Yang และคณะ[14] ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากลูกเดือยที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้จากกะโหลกศีรษะของหนูตัวอ่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมจากวัว (heat- inactivated fetal calf serum) นาน 24 ชั่วโมง การที่ผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Yang และคณะ[14] ในช่วงระยะเวลาที่สารสกัดลูกเดือยมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทั้งนี้อาจมาจากความแตกต่างของระเบียบวิธีการวิจัย เช่น ชนิดของเซลล์ ความเข้มข้นและแหล่งที่มาของสารสกัดลูกเดือย เทคนิคการวัดความมีชีวิตของเซลล์ และชนิดของซีรัมที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากทั้งสองการศึกษาก็สื่อให้เห็นว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกได้

ในการศึกษานี้ยังพบว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองของเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ ซึ่งจะเห็นว่าค่าการดูกกลืนแสงของกลุ่มที่ใส่สารกัดลูกเดือยมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 21 วัน ในกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดลูกเดือยมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.2 ขณะที่ในกลุ่มที่ใส่สารสกัดลูกเดือยมีสูงเกือบถึง 5 อย่างไรก็ตามค่าการดูดกลืนแสงที่สูงมากขนาดนี้อาจจะอยู่ในสภาวะอิ่มตัวของสารละลายของสีอะลิซารินเรดที่ย้อมติดหรือไม่ก็ได้ ดังนั้นการหาค่าขีดจำกัดบนสุดของความไว (sensitivity) ของค่าการดูกกลืนแสงที่ 570 นาโมเมตรของสารละลายของสีอะลิซารินเรดที่ย้อมติดเพิ่มเติมอาจจะช่วยยืนยันให้การแปลผลในส่วนนี้ถูกต้องชัดเจนมากยิ่งขึ้น ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Yang และคณะ[13] ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากลูกเดือยที่ความเข้มข้น 30-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มระดับแคลเซียมในเมตาไฟเซียลของกระดูกต้นขาของหนูปกติที่ถูกกระตุ้นด้วยพาราไทรอยด์ฮอร์โมนและหนูที่ตัดรังไข่นาน 4 สัปดาห์ได้ การที่สารสกัดลูกเดือยสามารถส่งเสริมการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลองของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ได้ อาจเป็นเพราะว่าลูกเดือยมีส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive component) หลายตัวที่ส่งผลในทางบวกต่อกระบวนการสร้างกระดูก เช่น กรดฟีโนลิก (phenolic acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแร่ธาตุบางชนิด[12] ในลูกเดือยประกอบด้วยกรดฟีโนลิกหลายชนิดด้วยกัน แต่กรดฟีโนลิกหลักที่พบ ได้แก่ กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) กรดพี-ไฮดรอกซีเบนโซอิก (p-hydroxybenzoic acid) กรดพี-คูมาริก (p-coumaric acid) และกรดวานิลลิก (vanillic acid)[12] มีการศึกษารายงานคุณสมบัติทางชีวภาพของกรดวานิลลิกกับกระบวนการสร้างกระดูก เช่น Xiao และคณะ[37] พบว่ากรดวานิลลิกจากพวงไข่มุกหรืออัลเดอร์เบอร์รีสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกได้ โดยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์และการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูกหนูเอ็มซี3ที3-อี1 และยูเอ็มอาร์ 106 (UMR 106) เพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก ได้แก่ ออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) รันท์รีเลททิดทรานสคริปชันแฟคเตอร์ทูหรือรังซ์ทู (runt-related transcrintion factor 2, Runx2) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเพิ่มอัตราส่วนของยีนออซทีโอโปรทีจีริน (osteoprotegerin, OPG) ต่อรีเซปเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียร์แฟคเตอร์แคปปาบีไลแกนด์หรือแรงค์ไลแกนด์ (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL) (OPG/RANKL) ของเซลล์สร้างกระดูกยูเอ็มอาร์ 106 นอกจากนี้ยังเพิ่มการพอกพูนของแคลเซียมในเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของกระดูกหนู (rat bone mesenchymal stem cells) และกระตุ้นให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของไมโทเจน-แอคทิเวเตดโปรตีนไคเนสไคเนสวันทูหรือเม็ควันทู (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2)) และเอิร์กวันทูในเซลล์ยูเอ็มอาร์ 106 ได้ แสดงให้เห็นว่ากรดวานิลลิกทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen-like effects) ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกผ่านทางวิถีการส่งสัญญาณแมพไคเนส-เมดิเอทเตดเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ (MAP kinase (MEK/ERK)-mediated estrogen receptor signaling pathway)

เควอซิทิน (quercetin) และรูติน (rutin) เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในลูกเดือย[11,12] จากการศึกษาของ

Srivastava และคณะ[38] พบว่าเควอซิทินและรูตินส่งเสริมการแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก โดยสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส การพอกพูนของแคลเซียม และเพิ่มการแสดงออกของตัวบ่งชี้การแปรสภาพของเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ ออสทีโอพอนติน (osteopontin) ออซทีริกซ์ (osterix) รังซ์ทู ออซทีโอโปรทีจีริน และออสทีโอแคลซินของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากไขกระดูกหนู นอกจากนี้ Satué และคณะ[39] ยังทำการศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกหนูเอ็มซี3ที3-อี1 พบว่าเควอซิทินสนับสนุนการแสดงออกของยีนโบนไซอะโลโปรตีน (bone sialoprotein) และออสทีโอแคลซิน แต่ลดการแสดงออกของยีนแรงค์ไลแกนด์

ลูกเดือยยังอุดมไปด้วยเกลือแร่หลายชนิด เช่น ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม ซึ่งเป็นเกลือแร่ที่พบได้ในกระดูก มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างและปรับแต่งกระดูก และมีส่วนสำคัญในการเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับกระดูก[40] เช่น ฟอสฟอรัสจะทำงานควบคู่กับแคลเซียมในกระบวนการสร้างกระดูกโดยมีวิตามินดีช่วยให้เกิดการรวมตัว ส่วนแมกนีเซียมจะช่วยในการเปลี่ยนรูปวิตามินดีให้อยู่ในรูปแบบที่ร่างกายนำไปใช้ได้ (active form) เพื่อช่วยในการดูดซึมแคลเซียมเพื่อให้กระดูกมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น ถือเป็นการสร้างเสริมความแข็งแรงให้กับกระดูก

จากที่กล่าวมาข้างต้นอาจกล่าวได้ว่ากรดวานิลลิก เควอซิทิน รูติน ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม ที่พบในลูกเดือยอาจเป็นสารที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการพอกพูนของแคลเซียนในหลอดทดลอง ในอนาคตต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อในคุณสมบัตินี้ รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับกระบวนการสร้างกระดูก

การศึกษานี้ให้ข้อมูลเบื้องต้นบางส่วนว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์และส่งเสริมการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของสารสกัดลูกเดือยต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในด้านต่าง ๆ เช่น การแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก ก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิก เช่น การปรับปรุงพื้นผิวไททาเนียมสำหรับรากเทียมเพื่อนำไปใช้ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับกระดูก เช่น ผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกพรุนต่อไป

บทสรุป

ผลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ โดยสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 150 300 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง และสารสกัดลูกเดือยที่ความเข้มข้น 3-600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สนันสนุนการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกมนุษย์ในแง่ของการพอกพูนของแคลเซียมในหลอดทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสนับสนุนทุนอุดหนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ นาย พิบูรณ์ เหง้าณี ที่ให้ความสะดวกและช่วยเหลือในการจัดเก็บชิ้นกระดูกและเซลล์สร้างกระดูกปฐมภูมิของมนุษย์ตลอดการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Sambrook P, Cooper C. ***Osteoporosis. Lancet*** 2006;367(9527):2010-8.
2. Tsolaki IN, Madianos PN, Vrotsos JA. Outcomes of dental implants in osteoporotic patients. A literature review. ***J Prosthodont*** 2009; 18(4):309-23.
3. Venkatakrishnan C, Bhuminathan S, Chandran C, Poovannan S. Dental implants in patients with osteoporosis – A review. ***Biomed Pharmacol J*** 2017;10(3):1415-18.
4. Misch C. Bone Density: A Key Determinant for Treatment Planning. In: Misch C, editor. Dental Implant Prosthetics. 2 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby; 2015. p. 237-52.
5. Gaetti-Jardim EC, Santiago-Junior JF, Goiato MC, Pellizer EP, Magro-Filho O, Jardim Junior EG. Dental implants in patients with osteoporosis: a clinical reality? ***J Craniofac Surg*** 2011;22(3):1111-3.
6. Holahan CM, Koka S, Kennel KA, Weaver AL, Assad DA, Regennitter FJ, *et al.* Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants. ***Int J Oral Maxillofac Implants*** 2008;23(5):905-10.
7. Famili P, Zavoral JM. Low Skeletal Bone Mineral Density Does Not Affect Dental Implants. ***J Oral Implantol*** 2015;41(5):550-3.
8. Giro G, Chambrone L, Goldstein A, Rodrigues JA, Zenóbio E, Feres M, *et al.* Impact of osteoporosis in dental implants: A systematic review. ***World J Orthop*** 2015;6(2):311-5.
9. Alghamdi HS, Cuijpers VM, Wolke JG, van den Beucken JJ, Jansen JA. Calcium-phosphate-coated oral implants promote osseointegration in osteoporosis. ***J Dent Res*** 2013;92(11):982-8.
10. Javed F, Vohra F, Zafar S, Almas K. Significance of osteogenic surface coatings on implants to enhance osseointegration under osteoporotic-like conditions. ***Implant Dent*** 2014;23(6):679-86.
11. An J, Yang H, Zhang Q, Liu C, Zhao J, Zhang L, *et al*. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. ***Life Sci*** 2016;147:46-58.
12. Zhu F. Coix: Chemical composition and health effects. ***Trends in Food Science & Technology*** 2017;61:160-75.
13. Yang RS, Chiang W, Lu YH, Liu SH. Evaluation of osteoporosis prevention by adlay using a tissue culture model. ***Asia Pac J Clin Nutr*** 2008;17 Suppl 1:143-6.
14. Yang RS, Lu YH, Chiang W, Liu SH. Osteoporosis Prevention by Adlay (Yi Yi: The Seeds of Coix Lachryma-Jobi L. var. ma-yuen Stapf)

in a Mouse Model. ***J Tradit Complement Med*** 2013;3(2):134-8.
15. Huang DW, Chung CP, Kuo YH, Lin YL, Chiang W. Identification of compounds in adlay (Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) seed hull extracts that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. ***J Agric Food Chem*** 2009;57(22):10651-7.
16. Huang DW, Kuo YH, Lin FY, Lin YL, Chiang W. Effect of Adlay (Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) Testa and its phenolic components on Cu2+-treated low-density lipoprotein (LDL) oxidation and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. ***J Agric Food Chem*** 2009;57(6):2259-66.
17. Choi G, Han AR, Lee JH, Park JY, Kang U, Hong J, *et al.* A comparative study on hulled adlay and unhulled adlay through evaluation of their LPS-induced anti-inflammatory effects, and isolation of pure compounds. ***Chem Biodivers*** 2015;12(3):380-7.
18. Manosroi J, Khositsuntiwong N, Manosroi A. Biological activities of fructooligosaccharide (FOS)-containing Coix lachryma-jobi Linn. extract. ***J Food Sci Technol*** 2014;51(2):341-6.
19. Choi Y, Jeong HS, Lee J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. ***Food Chemistry*** 2007;103(1):130-38.
20. Tseng YH, Yang JH, Chang HL, Lee YL, Mau JL. Antioxidant properties of methanolic extracts from monascal adlay. ***Food Chemistry*** 2006;97(3):375-81.
21. Manosroi A, Sainakham M, Chankhampan C, Abe M, Manosroi W, Manosroi J. Potent *in vitro* anti-proliferative, apoptotic and anti-oxidative activities of semi-purified Job's tears (Coix lachryma-jobi Linn.) extracts from different preparation methods on 5 human cancer cell lines. ***J Ethnopharmacol*** 2016;187:281-92.
22. Woo JH, Li D, Wilsbach K, Orita H, Coulter J, Tully E, *et al.* Coix seed extract, a commonly used treatment for cancer in China, inhibits NFkappaB and protein kinase C signaling. ***Cancer Biol Ther*** 2007;6(12):2005-11.
23. Yu F, Gao J, Zeng Y, Liu CX. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity. ***J Ethnopharmacol*** 2008;119(2):252-58.
24. Lu X, Liu W, Wu J, Li M, Wang J, Wu J, *et al.* A polysaccharide fraction of adlay seed (Coix lachryma-jobi L.) induces apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2013;430(2):846-51.
25. Chang HC, Huang YC, Hung WC. Antiproliferative and chemopreventive effects of adlay seed on lung cancer *in vitro* and *in vivo*. ***J Agric Food Chem*** 2003;51(12):3656-60.
26. Hsu HY, Lin BF, Lin JY, Kuo CC, Chiang W. Suppression of allergic reactions by dehulled adlay in association with the balance of TH1/TH2 cell responses. ***J Agric Food Chem*** 2003;51(13):3763-9.
27. Chen HJ, Lo YC, Chiang W. Inhibitory effects of adlay bran (Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) on chemical mediator release and cytokine production in rat basophilic leukemia cells. ***J Ethnopharmacol*** 2012;141(1):119-27.
28. Chen HJ, Hsu HY, Chiang W. Allergic immune-regulatory effects of adlay bran on an OVA-immunized mice allergic model. ***Food Chem Toxicol*** 2012;50(10):3808-13.
29. Chen HJ, Shih CK, Hsu HY, Chiang W. Mast cell-dependent allergic responses are inhibited by ethanolic extract of adlay (Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) testa. ***J Agric Food Chem*** 2010;58(4):2596-601.
30. Choi EK, Cho YJ, Yang HJ, Kim KS, Lee IS, Jang JC, *et al.* Coix seed extract attenuates the high-fat induced mouse obesity via PPARγ and C/EBPα a downregulation. ***Molecular & Cellular Toxicology*** 2015;11(2):213-21.
31. Chung CP, Hsia SM, Lee MY, Chen HJ, Cheng F, Chan LC, *et al.* Gastroprotective activities of adlay (Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. ***J Agric Food Chem*** 2011;59(11):6025-33.
32. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for *in vitro* research. ***Eur Cell Mater*** 2012;24:1-17.
33. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, *et al.* Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. ***J Cell Physiol*** 1990; 143(3):420-30.
34. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. ***J Biomol Screen*** 2004;9(6):506-15.
35. Whitson SW, Whitson MA, Bowers DE, Jr., Falk MC. Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine bone cells grown *in vitro*. ***J Bone Miner Res*** 1992;7(7):727-41.
36. McAlinden MG, Wilson DJ. Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. ***Cell Transplant*** 2000;9(4):445-51.
37. Xiao HH, Gao QG, Zhang Y, Wong KC, Dai Y, Yao XS, *et al.* Vanillic acid exerts oestrogen-like activities in osteoblast-like UMR 106 cells through MAP kinase (MEK/ERK)-mediated ER signaling pathway. ***J Steroid Biochem Mol Biol*** 2014;144 Pt B:382-91.
38. Srivastava S, Bankar R, Roy P. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. ***Phytomedicine*** 2013;20(8-9):683-90.
39. Satue M, Arriero Mdel M, Monjo M, Ramis JM. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. ***Biochem Pharmacol*** 2013;86(10):1476-86.
40. Palacios C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. ***Crit Rev Food Sci Nutr*** 2006;46(8):621-8.