ว ทันต จุฬาฯ 2548;28:127-36
CU Dent J. 2005;28:127-36

บทวิทยาการ
Original Article

ผลของสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

วิจิตรา วิพิศมากูล ท.บ., Dr.med.dent[1]
พสุธา ธัญญะกิจไพศาล ท.บ., Ph.D.[2]

[1] ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2] ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

วัสดุและวิธีการ เซลล์จะถูกทดสอบด้วยสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที และวิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว

ผลการศึกษา สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรท อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) ในขณะที่สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) แต่สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรท และเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)

สรุป ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ความเข้มข้น 10-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ตามลำดับ แต่สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 20-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(ว ทันต จุฬาฯ 2548;28:127-36)

คำสำคัญ: *การเพิ่มจำนวนเซลล์; การสอบวิเคราะห์เอ็มทีที; เซลล์สร้างกระดูก; ว่านหางจระเข้*

บทนำ

โรคปริทันต์นับเป็นปัญหาหลักทางทันตสุขภาพของประเทศไทย[1] ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายส่วนของเอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน ทำให้ฟันโยก ปวดและไม่สามารถบดเคี้ยวได้ ถึงแม้ว่าโรคปริทันต์จะสามารถทำการรักษาเบื้องต้นโดยการกำจัดหินปูน การเกลารากฟันร่วมกับการดูแลสุขภาพช่องปาก โดยหวังว่าเมื่อกำจัดสิ่งรบกวนเหล่านี้หมดไป จะมีการงอกใหม่ (regeneration) ของเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน แต่จากการศึกษาทางคลินิกพบว่า บางกรณีการงอกใหม่ของส่วนเอ็นยึดปริทันต์และโดยเฉพาะกระดูกเบ้าฟันอาจจะเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ หรือไม่เกิดขึ้นเลย[2-3]

ว่านหางจระเข้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านของไทย โดยความรู้แบบภูมิปัญญาชาวบ้าน ได้นำส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มาใช้ในการรักษาแผลบนผิวหนังที่เกิดจากน้ำร้อนลวกและสิวบนใบหน้า ปัจจุบันส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ได้นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสารทาบนผิวหนังเพื่อดูแลผิวพรรณ ครีมกันแดด และเป็นส่วนประกอบของเครื่องดื่มประเภทน้ำดื่มสมุนไพร หรืออาหารเสริม ได้มีการรายงานถึงผลของสารสกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่มีผลกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I (type I collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกระดูก[4-5] จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ที่แยกจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[6-7] แต่อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดจากว่านหางจระเข้ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของกระดูกต้นขาหนูแรท (rat femur) และเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 มาทดสอบกับสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ และตรวจวัดการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ด้วยการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT assay) โดยความรู้พื้นฐานที่ได้จากการวิจัยจะก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในคุณสมบัติของสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูก และอาจนำไปสู่การพัฒนาองค์ความรู้ในสาขาทางด้านการแพทย์และทันตแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเสริมกระดูกต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ (aloe vera gel and exudate)

การเตรียมสารสกัดของว่านหางจระเข้ ทำตามวิธีที่ผู้วิจัยเคยรายงานมาก่อนหน้านี้[6-7] กล่าวโดยย่อคือ ใบว่านหางจระเข้พันธุ์ *Aloe barbadensis* ที่มีความกว้างบริเวณโคนใบ 6-10 เซนติเมตร จะถูกนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และลอกส่วนผิวที่เป็นสีเขียวออก เหลือแต่ส่วนวุ้นใส ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดส่วนยางที่อาจปนเปื้อนกับส่วนวุ้น จากนั้นหั่นส่วนวุ้นใสเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2×2×2 มิลลิเมตร แล้วทำให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด (Wheaton, NJ, USA) และกรองผ่านผ้าขาวบาง ส่วนการเตรียมสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้นั้น กระทำโดยเก็บส่วนยางที่ไหลออกมาจากส่วนเปลือกด้านในของว่านหางจระเข้ตรงบริเวณรอยตัดขณะตัดใบว่านหางจระเข้ แล้วรอประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางส่วนยางจากใบว่านหางจระเข้ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 50

สารสกัดที่ได้ทั้งสองชนิด จะถูกแยกกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการผ่านกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น ของโปรตีนในสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้จะถูกคำนวณด้วยชุดวัดปริมาณโปรตีนของบริษัทไบโอแรท (Bio-Rad, CA, USA) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนอัลบูลมิน (bovine serum albumin, fraction V) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยทำตามคำแนะนำในเอกสารของบริษัทผู้ผลิต

การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูจะถูกแยกด้วยวิธีที่มีรายงานไว้แล้ว[8-9] กล่าวโดยย่อคือส่วนไขกระดูกที่อยู่ในส่วนไดอะไฟซิส (diaphysis) ของกระดูกต้นขาของหนูแรทเพศผู้พันธุ์ Spague-Dawley อายุ 8 สัปดาห์ จะถูกรวบรวมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดอัลฟาเอ็มอีเอ็ม (alpha-modified Minimum Essenstial Medium) ที่ประกอบด้วย แอล-กลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลิน-จี (penicillin-G) ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรป-

โตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เฮพาริน (heparin) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ไขกระดูกจะถูกทำให้เจือจางเท่าตัวด้วยโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 เซลล์สร้างกระดูกจะแยกจากเซลล์อื่นๆ ในไขกระดูกด้วยสารละลายไฟคอลไฮเปค (Ficoll-Hypaque) ที่มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.077 กรัมต่อมิลลิลิตร (Pharmacia Biotech, Sweden) โดยนำไปปั่นที่ 2,080 รอบต่อนาที (1300 × g) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเซลล์จะถูกรวบรวม และล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สองครั้ง และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น นับจำนวนเซลล์และหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 30,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันต่อมาเพื่อล้างเอาเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงออก จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สัปดาห์ละสองครั้ง เซลล์ที่ได้จะถูกนับเป็นรุ่นที่ 1 ในการทดลองนี้ใช้เซลล์รุ่นที่ 2-5

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ. ทพ. ดร. ดำรงค์ ดำรงค์ศรี ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนกับเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนูแรทดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารด้วยการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที

วิธีการวิเคราะห์นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Finley และคณะ[10] กล่าวโดยย่อคือ เซลล์จะถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (Nunc, Denmark) ที่ความหนาแน่น 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ปราศจากซีรัม 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่งโมง เพื่อล้างซีรัมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมที่มีสารสกัดของว่านหางจระเข้ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่กำหนด แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที

เมื่อครบกำหนด เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอัลฟาเอ็มอีเอ็มชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด α-MEM without phenol red) ที่มีสารละลายเอ็มทีที (MTT) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและใส่สารละลายไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นผลึกฟอร์มาแซน (formazan) ของเซลล์ที่ทราบจำนวน เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมจะคิดเป็นร้อยละ 100

ในการทดลองครั้งนี้ ใช้เซลล์จำนวน 4 หลุม ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ และสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ และทำการทดลองซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

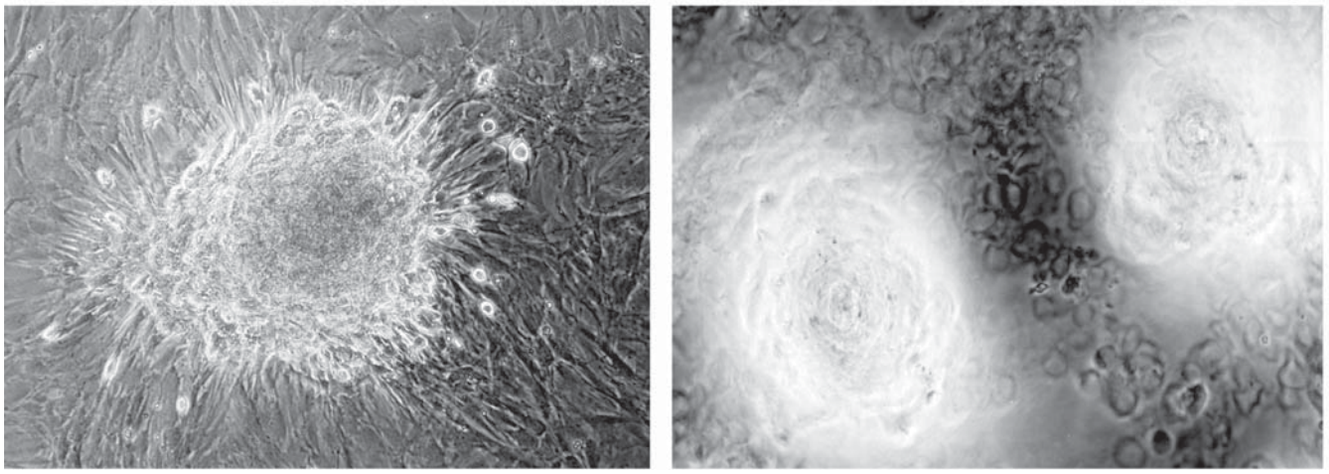
การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) หาค่าเฉลี่ย (mean) และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากว่านหางจระเข้กับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) ชนิดแบบทดสอบของดังแคน (Duncan' Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทั้งนี้ในการสอบวิเคราะห์เอ็มทีทีจะกำหนดให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100

ผลการศึกษา

เซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกของหนูมีลักษณะเป็นเซลล์สร้างกระดูก

เซลล์ที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 10, กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เบต้า-กลีเซอโรฟอสเฟต (β-glycerophosphate) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และเดกซาเมทาโซน (dexamethasone) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ พบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์สร้างกระดูก (nodule formation) ตั้งแต่วันที่ 7 และเริ่มพบการตกตะกอนสารอนินทรีย์ (mineralization) เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน และเห็นได้ชัดเจนมากขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 21 วัน (รูปที่ 1)



a: Nodule formation b: Calcification

รูปที่ 1 เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดอัลฟาเอ็มอีเอ็ม ที่มีซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เบต้า-กลีเซอโรฟอสเฟต ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และเดกซาเมทาโซน ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ เซลล์ถูกตรึงและย้อมด้วยสีอะลิซารินเรด

a: การรวมตัวเป็นกลุ่มของเซลล์สร้างกระดูก เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน

b: การกรดตะกอนสารอนินทรีย์ของเซลล์สร้างกระดูก เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน

Fig. 1 Primary bone marrow stromal cells were treated with 10% serum α-MEM supplemented with 50 μg/ml ascrobic acid, 1 mM β-glycerophosphate and 0.1 mM dexamethasone. Cells were fixed and stained with Alizarine Red S solution.

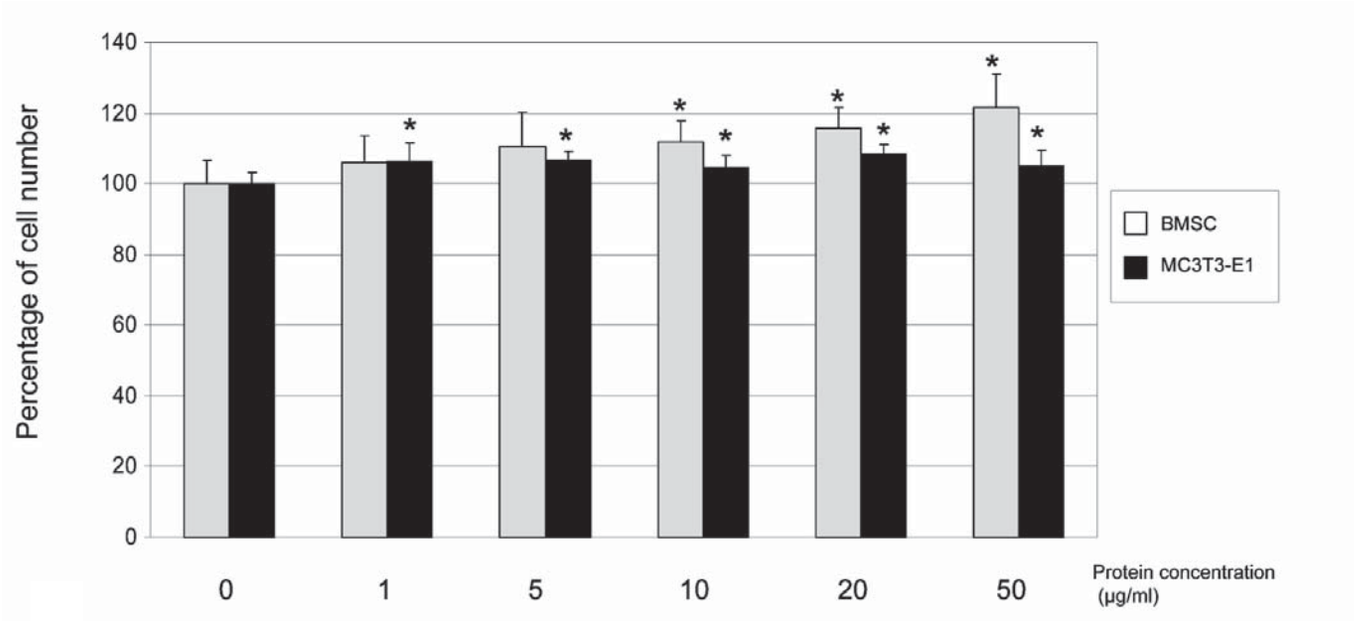
a: The nodule formation of primary bone norrow stromal cell at day 7

b: The matrix calcification of primary bone narrow stromal cell at day 14

สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนู เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) โดยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 111.73±6.13, 115.54±5.9 และ 121.75 ±9.39 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 2)

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) โดยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 106.43±4.97, 106.71±2.47, 104.61±3.3, 108.28±3.04 และ 104.91±4.43 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 2)



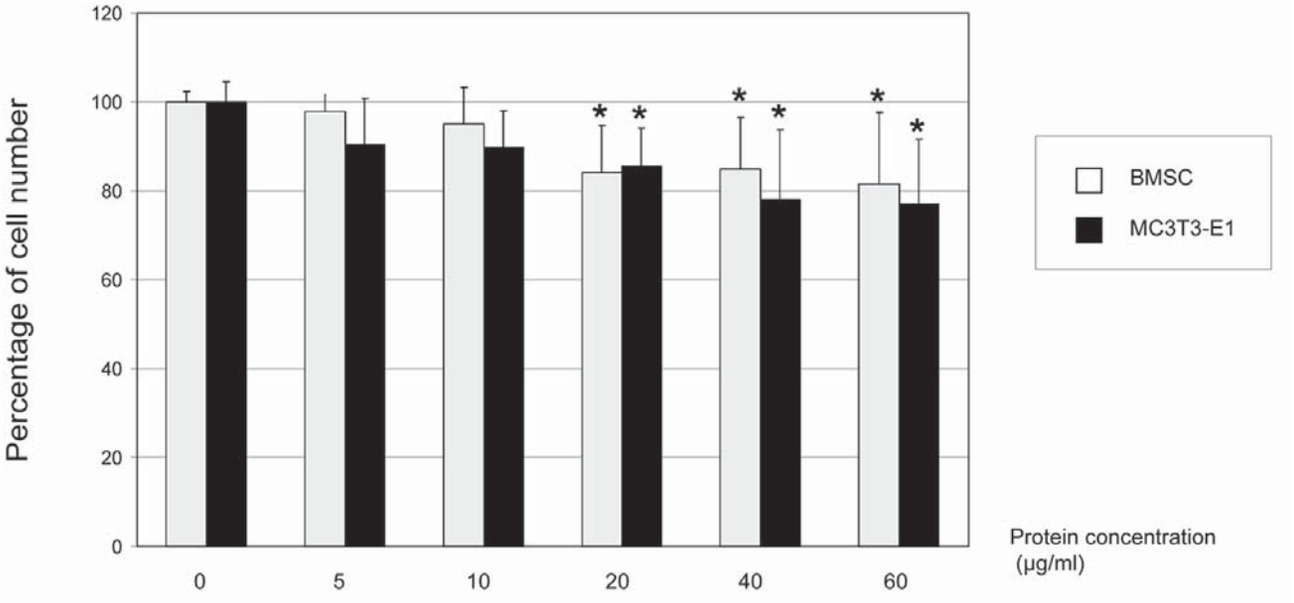
รูปที่ 2 แสดงผลของส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรท (BMSC) และเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ด้วยการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงอยู่ในรูป ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม $p < .05$, จำนวนที่ศึกษา = 12)

Fig. 2 Shows the effect of aloe vera gel extract on the proliferation of promary bone marrow stromal cells (BMSC) and MC3T3-E1 osteoblast cell line via the MTT assay. Cells were treated with the aloe vera gel extract at concentrations 1, 5,10, 20 and 50 µg/ml for 24 hours. Data shown in the form of mean±S.D. (* demonstrates the significance from the control group at $p > .05$, n=12)

สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนู เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) โดยลดลงเป็นร้อยละ 84.16±10.45, 84.83±11.67 และ 81.48±16.11 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 3)

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) โดยลดลงเป็นร้อยละ 85.43±8.61, 78.07±15.72, 77.03±14.56 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงผลของส่วนยางของว่านหางจระเข้ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรท (BMSC) และเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ด้วยการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที เซลล์ถูกทดสอบด้วยส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงอยู่ในรูป ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม $p < .05$, จำนวนที่ศึกษา = 12)

Fig. 3 Shows the effect of aloe vera gel extract on the proliferation of promary bone marrow stromal cells (BMSC) and MC3T3-E1 osteoblast cell line via the MTT assay. Cells were treated with the aloe vera gel exudate at 5,10, 20, 40 and 60 µg/ml for 24 hours. Data shown in the form of mean±S.D. (* demonstrates the significance from the control group at $p > .05$, n=12)

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 โดยใช้การสอบวิเคราะห์เอ็มทีทีเพื่อวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าเซลล์ที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทเป็นเซลล์สร้างกระดูก คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสามารถของเซลล์ในการรวมกลุ่มและการตกตะกอนสารอนินทรีย์ รวมทั้งการทำรีเวิร์สทรานส์คริปชันโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (reverse transcription polymerase chain reaction) เพื่อตรวจวัดการแสดงออกของจีนตัวรับของพารา-ไทรอยด์ฮอร์โมน (PTH receptor) และออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) ซึ่งเป็นจีนที่พบในเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อน[11-13]

จากการสอบวิเคราะห์เอ็มทีที พบว่าสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นโปรตีน 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนู และที่ระดับความเข้มข้นโปรตีน 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < .05$) ในขณะที่สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยที่พบว่า สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟัน ในขณะที่สารสกัดส่วนยางมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งสามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [6-7] เมื่อพิจารณา

จากคุณสมบัติของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนู ซึ่งเป็นเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) และมีคุณสมบัติการรวมกลุ่ม และตกตะกอนสารอินทรีย์ และเซลล์ MC3T3-E1 เป็นเซลล์ไลน์สร้างกระดูกที่มีการแสดงออกของจีนและความสามารถในการตกตะกอนสารอินทรีย์เหมือนเซลล์สร้างกระดูก ทำให้คณะผู้วิจัยเชื่อว่าสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก

ถึงแม้การศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจะไม่สามารถบอกถึงกลไกที่แท้จริงของสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ได้มีการรายงานผลของสารกลุ่มโพลีแซคคาไลน์ เช่น อะซีติลเลท อะซีแมนแนน (acetylated acemannan) แมนโนส-6-ฟอสเฟต (mannose-6-phosphate) และเลคติน-ไลค์โมเลกุล (lectin-like molecule) ที่แยกมาจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่มีต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์[14-16] อีกทั้งการวิจัยครั้งนี้มีข้อจำกัดหลายประการที่ต้องปรับปรุงแก้ไขในการศึกษาครั้งต่อไป คือ ผู้วิจัยใช้ปริมาณโปรตีนเป็นตัวแทนของความเข้มข้นของสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้แทนการใช้สารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่าเป็นสารที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยเชื่อว่าที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนหนึ่ง ก็จะมีปริมาณของโพลี-แซคคาไรด์จำนวนหนึ่ง เมื่อปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น ปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ก็ควรจะเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่สอดคล้องกัน[6-7] ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งคือ สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ใช้ เป็นสารสกัดโดยรวมที่ประกอบไปด้วยสารหลายชนิด[17] ซึ่งทำให้ไม่สามารถชี้ชัดถึงผลที่ได้จากการทดลองว่าเกิดขึ้นจากสารตัวใด อย่างไรก็ดี การนำสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มาทดสอบ เป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการยืนยันแนวความคิดดังกล่าว เพื่อเป็นการนำว่านหางจระเข้มาพัฒนาใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกต่อไป

สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 20-60 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มีผลต่อการลดจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนูแรทและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < .05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย ที่พบว่าสารสกัดส่วนยางมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือก เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ และเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน[6-7] และจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบการรายงานสารอีโมดิน (emodin) และอะโลอีโมดิน (aloe-emodin) ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลที่สกัดได้จากส่วนยางของว่านหางจระเข้ มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และกระตุ้นให้เกิดอะพ๊อพโทซิส (apoptosis) ในเซลล์มะเร็ง เช่น เซลล์มะเร็งนิวโรบลาสโทมา (neuroblastoma) เซลล์มะเร็งปุ่มน้ำเหลือง (lymphoma) และเซลล์ไลน์เนื้องอกตับ (hepatoma cell lines) โดยการยับยั้งวงจรการแบ่งตัวของเซลล์ที่ระยะจี-1 (G1 phase) กระตุ้นการเพิ่มจำนวนนิวเคลียร์-โปรตีนพี53 (p53) และโปรตีนพี21 (p21) ซึ่งเป็นจีนยับยั้งการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor gene) และกระตุ้นการสร้างโปรตีนแบกซ์ (Bax) และตัวรับของโปรตีนฟาส/อะโปวัน (Fas/APO 1 receptor) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดอะพ๊อพ-โทซิส[18-23]

จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก และเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ดังนั้น สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้จึงเป็นสารที่น่าสนใจในการเร่งการสร้างกระดูก โดยผ่านขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้นและส่งผลให้เกิดการสร้างกระดูกเพิ่มมากขึ้น การนำสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้มาผสมร่วมกับสารชนิดอื่นที่มีผลในการเร่งการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกตลอดจนการตกตะกอนสารอินทรีย์ เช่นโปรตีนโบนมอร์โฟจีนิก (bone morphogenic proteins)[24-26] อาจช่วยเร่งกระบวนการสร้างกระดูกให้เร็วมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวความคิดที่น่าสนใจในการศึกษาขั้นต่อไป

สรุป

สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทอย่างมีนัยสำคัญทาง ถิติ ในขณะที่สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้

ที่ระดับความเข้มข้น 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดจำนวนเซลล์ทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ทญ. ดร. วิสาขะ ลิ่มวงศ์ และ ผศ. ทญ. ดอลลี่ เมธาธราธิป ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณ Professor Dr. Shohei Kasugai, Tokyo Medical and Dental University, Japan ที่สนับสนุนด้านเทคนิคและสารเคมีบางส่วน ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เพื่อการวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก กองทุนวิจัยคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2546 และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2546

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการทันตสุขภาพแห่งชาติ, กองทันตสาธารณสุข. รายงาน ผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2543-2544. กรุงเทพมหานคร:กองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2545.
2. Quinones CR, Caffesse RG. Current status of guided periodontal tissue regeneration. Periodontol. 2000. 1995;9:55-68.
3. Rosenberg E, Rose LF. Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. Dent Clin North Am. 1998;42:467-90.
4. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. Mol Cell Biochem. 1998;181:71-6.
5. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. J Ethnopharmacol. 1998;59:195-201.
6. Thunyakitpisal P, Damrongsri D, Charearnwetchatom N, Boonyaratanasoontorn S, Udomkittanasarn S. Effect of aloe vera gel and exudate extracts on the proliferation of primary cultured gingival fibroblasts and keratinocytes, in vitro. CU Dent J. 2002;25:61-70.
7. Thunyakitpisal P, Tavateekhun K, Hemakhunchon K. Aloe vera gel extract stimulates the proliferation of primary cultured human periodontal ligament cells and pulpal fibroblasts. CU Dent J. 2004; 27:47-57.
8. Kim CH, Kim HK, Shong YK, Lee KU, Kim GS. Thyroid hormone stimulates basal and interleukin (IL)-1-induced IL-6 production in human bone marrow stromal cells : a possible mediator of thyroid hormone-induced bone loss. J Endocrinol. 1999;160:97-102.
9. Kondo H, Ohyama T, Ohya K, Kasugai S. Temporal changes of mRNA expression of matrix proteins and parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein (PTH/PTHrP) receptor in bone development. J Bone Miner Res. 1997;12:2089-97.
10. Finley GJ, Baguley BC, Wilson WR. A semiautomated microculture method for investigating growth inhibitory effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells. Anal Biochem. 1984;39: 272-7.
11. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principle of Bone Biology. 1st ed. San Diego: Academic Press, 1996:69-88.
12. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. Biochem Cell Biol. 1998;76:899-910.
13. Onyia JE, Miller B, Hulman J, Liang J, Galvin R, Frolik C, et al. Proliferating cells in the primary spongiosa express osteoblastic phenotype in vitro. Bone. 1997;20:93-100.
14. Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. J Ethnopharmacol. 1999;68:3-37.
15. Choi SW, Son BW, Son YS, Park YI, Lee SK, Chung MH. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. Br J Dermatol. 2001; 145:535-45.
16. Zhang L, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate

fraction from Aloe vera gel. Immunopharmacology. 1996;35:119-28.

17. Agarwala OP. Whole leaf aloe gel vs. standard aloe gel. Drug and Cosmetics Industry. 1997;February:22-8.
18. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hsu FL, Lin HY, Ko CH, et al. Emodin induces apoptosis in human promy eloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. Biochem Pharmacol. 2002;64: 1713-24.
19. Jing X, Ueki N, Cheng J, Imanishi H, Hada T. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. Jpn J Cancer Res. 2002;93:874-82.
20. Mueller SO, Stopper H. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. Biochim Biophys Acta. 1999;1428:406-14.
21. Mueller SO, Stopper H, Dekant W. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. Drug Metab Dispos. 1998;26:540-6.
22. Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, et al. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. Cancer Res. 2000;60:2800-4.
23. Kuo PL, Lin TC, Lin CC. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. Life Sci. 2002;71:1879-92.
24. Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. Bone. 2004;34:402-11.
25. Huang W, Rudkin GH, Carlsen B, Ishida K, Ghasri P, Anvar B, et al. Overexpression of BMP-2 modulates morphology, growth, and gene expression in osteoblastic cells. Exp Cell Res. 2002;274:226-34.
26. Zerath E, Holy X, Noel B, Malouvier A, Hott M, Marie PJ. Effects of BMP-2 on osteoblastic cells and on skeletal growth and bone formation in unloaded rats. Growth Horm IGF Res. 1998;8:141-9.

Effect of aloe vera gel extract and exudate on the proliferation of osteoblasts isolated from rat bone marrow and osteoblastic cell line MC3T3-E1

Vichitra Vipismakul D.D.S. Dr.med.dent.[1]
Pasutha Thunyakitpisal D.D.S., Ph.D.[2]

[1] Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University
[2] Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective To investigate the effect of aloe vera gel extract and exudate on the proliferation of osteoblasts isolated from the rat bone marrow stromal cells and the osteoblastic cell line MC3T3-E1.

Materials and methods Cells were treated with the aloe vera gel extract and exudate at different concentrations in the serum-free media for 24 hours. After that the amount of cells were measured with the MTT assay and analyzed with One-Way Analysis of Variance.

Results The aloe vera gel extract, at concentrations of 10, 20 and 50 μg/ml, significantly enhanced the proliferation of osteoblasts isolated from the rat bone marrow ($p < .05$). The aloe vera gel extract, at concentrations of 1, 5, 10, 20 and 50 μg/ml, significantly induced the proliferation of osteoblastic cell line MC3T3-E1 ($p < .05$). In contrast, the aloe vera exudate, at concentrations of 20, 40 and 60 μg/ml, significantly decreased the proliferation of osteoblasts isolated from the rat bone marrow and the osteoblastic cell line MC3T3-E1 ($p < .05$).

Conclusion The aloe vera gel extract, 10-50 and 1-50 μg/ml, significantly induced the proliferation of the osteoblasts isolated from the rat bone marrow and the osteoblastic cell line MC3T3-E1, respectively. In contrast, the aloe vera gel exudates, 20-60 μg/ml, significantly decreased the cell number of both osteoblasts isolated from the rat bone marrow and the osteoblastic cell line MC3T3-E1.

(CU Dent J. 2005:28:127-36)

Key words: *aloe vera; MTT assay; osteoblast; proliferation*