



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาผลของสารสกัดของว่านหางจระเข้ต่อระดับ
เอนไซม์อัลคาลินฟอสฟาเตสและการตกผลึกของ
สารอินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

จพ
ท 15
012359

พสุธา ธัญญะกิจไพศาล

มิถุนายน ๒๕๔๗

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช



รายงานผลงานวิจัย

“การศึกษาผลของสารสกัดของว่านหางจระเข้ต่อระดับเอมไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
และการตกผลึกของสารอนินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก”

โดย

ผศ. ทพ. ดร. พสุธา รัชฎะกิจไพศาล

เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2547

๕ ๒190365๗

24 พ.ค. 2549

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ทญ. ดร. วิสาขะ ลีม่วงส์ และ ผศ. ทญ. ดอลลี เมฆาธาราธิป ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณ Professor Dr. Shohei Kasugai, Tokyo Medical and Dental University ที่สนับสนุนด้านเทคนิคและสารเคมีบางส่วน ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์เพื่อการวิจัย

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2546



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่	จพ
	ก15
เลขทะเบียน	012339
วัน, เดือน, ปี	29 ก.ย. 46

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาผลของสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ต่อระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสและการตกผลึกของสารอนินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก
ชื่อผู้วิจัย	ผศ. ทพ. ดร. พสุธา รัชฎะกิจไพศาล
ปีที่ทำวิจัยเสร็จ	มิถุนายน 2547

บทคัดย่อ

การสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่ เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการรักษาและฟื้นฟูสภาพการทำงานของอวัยวะ และร่างกายจากโรคที่ทำลายกระดูก เช่น โรคปริทันต์และภาวะโรคกระดูกพรุน โดยทั่วไปขั้นตอนการสร้างกระดูก ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่ต่อเนื่องกัน คือ การแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ การพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และการตกตะกอนสารอนินทรีย์ วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การทำงานของเอนไซม์ และระดับอาร์เอ็นเอไรโบสของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส รวมทั้งการตกตะกอนของสารอนินทรีย์ของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก ผลการทดลองพบว่า สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอไรโบสและโปรตีนของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 และ 7 วัน ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อระดับอาร์เอ็นเอไรโบสและการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 และ 7 วัน สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการตกตะกอนสารอนินทรีย์ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 21 วัน ผลการทดลองได้เสนอแนะว่า สารสกัดส่วนหัวของว่านหาง

จระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการตกตะกอนสารอนินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project title	The effect of aloe vera gel extract on the enzyme level of alkaline phosphatase and calcification in osteoblasts derived from the bone marrow stromal cell
Name of the investigator	Assistant Professor Dr. Pasutha Thunyakitpisal
Year	June 2004

Abstract

Bone regeneration is an important step for reconstruction of destructive tissues from bone disease such as periodontitis and osteoporosis. Generally, the bone formation is composed of 3 consecutive steps including cell proliferation, osteoblast differentiation and mineralization. Objectives of this study were to investigate the effect of aloe vera gel extract on primary bone marrow proliferation, the activity and mRNA level of enzyme alkaline phosphatase, and mineralization, respectively. The aloe vera gel extract, at protein concentrations 10, 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$, significantly stimulated cell proliferation. Aloe vera gel, at 50 $\mu\text{g/ml}$, significantly reduced the mRNA level and enzyme activity of alkaline phosphatase at 3 and 7 day, respectively. Aloe vera gel, at 1, 5, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$, did not affect the mRNA level, enzyme activity of alkaline phosphatase and mineralization. These data suggested that aloe vera gel extract, at 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$, induced cell proliferation, neither enzyme alkaline phosphatase expression nor mineralization in osteoblast.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้าหัวเรื่อง	
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii-iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
สารบัญ	vi
บทนำ	1-2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3-7
วิธีดำเนินการวิจัย	8-13
ผลการวิจัย	14-17
การอภิปรายผล	18-22
ข้อสรุป	22
เอกสารอ้างอิง	23-27
รายการภาพประกอบ	
รูปที่ 1	28
รูปที่ 2	29
รูปที่ 3	30
รูปที่ 4	31
รูปที่ 5	32-34
รูปที่ 6	35



บทนำ

โรคปริทันต์นับเป็นปัญหาหลักทางทันตสุขภาพของประเทศไทย¹ ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายส่วนของเอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน ทำให้ฟันโยก ปวดและไม่สามารถใช้งานในการบดเคี้ยวได้ ถึงแม้ว่าโรคปริทันต์จะสามารถทำการรักษาเบื้องต้นโดยการกำจัดหินปูน การเกลารากฟันร่วมกับการดูแลสุขภาพช่องปาก โดยหวังว่าเมื่อกำจัดสิ่งรบกวนเหล่านี้หมดไป จะมีการสร้างขึ้นมาใหม่ของเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันขึ้น แต่จากการศึกษาทางคลินิกพบว่าการสร้างขึ้นมาใหม่ของส่วนเอ็นยึดปริทันต์และโดยเฉพาะกระดูกเบ้าฟันจะเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ หรืออาจไม่เกิดขึ้นเลย²⁻³

ปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารที่มีผลกระตุ้นการสร้างเอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน โดยนำมาใช้ร่วมกับสัลไฟปริทันต์เพื่อให้เกิดการสร้างขึ้นมาใหม่ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะดังกล่าว เช่น การใช้ผงป่นกระดูกของคน (freeze-dried bone) หรือเมทริกซ์ของกระดูกที่ได้กำจัดเอาส่วนของสารอนินทรีย์ออก (decalcified freeze-dried bone) มาเติมลงไปในช่วงว่างของกระดูกเบ้าฟันที่ถูกทำลาย⁴⁻⁵ การใช้ฮอร์โมนหรือสาร growth factor⁶⁻⁸ ตลอดจนการยับยั้งการละลายของกระดูกเบ้าฟันด้วยสารพวก Bis-phosphonate⁹ โดยหวังผลต่อการยับยั้งการทำงานของเซลล์ละลายกระดูก (osteoclast) เพื่อคงสภาพของกระดูกเบ้าฟัน แต่อย่างไรก็ดี ผลของการใช้ผงป่นกระดูกของคน หรือเมทริกซ์ของกระดูกที่ได้กำจัดเอาส่วนของสารอนินทรีย์ออกนั้น มีอัตราความสำเร็จค่อนข้างต่ำและให้ผลที่ไม่แน่นอน อีกทั้งยังเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากวัสดุที่ใช้มีราคาแพงและต้องสั่งซื้อมาจากต่างประเทศ ส่วนการใช้สาร Bis-phosphonate ก็เป็นเพียงการป้องกันหรือยับยั้งการละลายของกระดูกเบ้าฟันเพิ่มเติมเท่านั้น โดยปราศจากการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมาทดแทน ทำให้ปริมาณของกระดูกเบ้าฟันจึงมีแค่เท่าเดิม หรืออาจลดลงได้อีกเมื่อมีการกลับคืนมาของโรค ดังนั้นการค้นหาสารเฉพาะที่ (local application) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างขึ้นมาใหม่ของกระดูกเบ้าฟันที่มีคุณภาพสูง จะเป็นการแก้ไขปัญหาของการสูญเสียกระดูกเบ้าฟันและการบูรณะเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยโรค

ปริทัศน์ในประเทศเราที่เหมาะสมวิธีหนึ่ง อีกทั้งสารที่ค้นพบสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคทาง การแพทย์ เช่น ภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) หรือคนไข้มือที่สูญเสียกระดูกเนื่องจากอุบัติเหตุ และการผ่าตัด

ว่านหางจระเข้ เป็นสมุนไพรพื้นบ้านของไทย โดยความรู้แบบภูมิปัญญาชาวบ้าน ได้นำส่วนหัวของ ว่านหางจระเข้มาใช้ในการรักษาแผลบนผิวหนังที่เกิดจากน้ำร้อนลวกและสิวนนใบหน้า ปัจจุบันส่วนหัว ของว่านหางจระเข้ได้นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสารทาบนผิวหนังเพื่อดูแลผิวพรรณ ครีมกันแดด และ เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางประเภทน้ำคั้นสมุนไพรหรืออาหารเสริม ได้มีการรายงานถึงผลของสาร สกัดจากส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่มีผลกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนประกอบ ที่สำคัญของกระดูก¹⁰⁻¹¹ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากส่วนหัวของว่านหางจระเข้สามารถเพิ่ม จำนวนเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์ อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ¹²⁻¹³ แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดจากว่านหางจระเข้ต่อเซลล์สร้างกระดูกและการ สร้างกระดูกมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เซลล์สร้างกระดูกที่แยกมาจากไขกระดูกของกระดูกอ่อนขา ของหนูมาทดสอบกับสารสกัดของว่านหางจระเข้ และตรวจวัดการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ด้วยสารเอ็มทีที, ระดับของเอนไซม์อัลคาลินฟอสฟาเตส ซึ่งนับเป็นตัวบ่งชี้ขั้นแรกของเซลล์ตั้งต้นที่มีการพัฒนาเป็นเซลล์ สร้างกระดูก (first osteoblast phenotype marker) และการตกตะกอนของสารอนินทรีย์ (mineralization) ใน เซลล์สร้างกระดูก โดยความรู้พื้นฐานที่ได้จากการวิจัย จะก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในคุณสมบัติของสาร สกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูก และอาจนำไปสู่การพัฒนาองค์ความรู้ในสาขา ทางด้านการแพทย์และทันตแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับกระดูก ต่อไป

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ขั้นตอนของการสร้างกระดูกของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อศึกษาในห้องปฏิบัติการ¹⁴⁻¹⁵

โดยทั่วไปขั้นตอนการสร้างกระดูกโดยเซลล์สร้างกระดูก ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่ต่อเนื่อง คือ การเพิ่มจำนวนเซลล์ตั้งต้นหรือเซลล์สร้างกระดูก (proliferation) การพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตั้งต้นเป็นเซลล์สร้างกระดูกสมบูรณ์ (differentiation and maturation) และการตกผลึกของสารอนินทรีย์ (mineralization or calcification phase)

เมื่อนำเซลล์ตั้งต้นหรือเซลล์กระดูกมาเพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ จะพบเซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วง 7-10 วันแรก โดยพบการแสดงออกของจินคอลลาลเจนชนิดที่ I ร่วมด้วย จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะที่สองคือระยะการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตั้งต้นเป็นเซลล์สร้างกระดูกสมบูรณ์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารที่เหมาะสม ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก สาร β -glycerophosphate และสาร dexamethasone โดยเซลล์จะมีอัตราการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง และมีการแสดงออกของจินอัลคาลินฟอสฟาเตส เป็นอันดับแรก จากนั้นจะมีการแสดงออกของจินอื่นๆที่เป็นส่วนประกอบของสารอินทรีย์ของกระดูก เช่น osteopontin, bone sialophosphoprotein และ osteocalcin โดยในระยะที่สองนี้จะสังเกตเห็นเซลล์สร้างกระดูกมีการรวมตัวเป็นกลุ่ม (cell aggregation) และเริ่มมีการสร้างสารอินทรีย์ออกมาภายนอกเซลล์ จากนั้นเซลล์จะเริ่มเข้าสู่ระยะสุดท้าย ซึ่งเป็นระยะของการตกตะกอนของสารอนินทรีย์หรือตะกอนแคลเซียม (nodule formation and mineralization) โดยจะพบผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ในสารอินทรีย์ที่อยู่ระหว่างเซลล์ โดยจะใช้ระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 21 วัน

เซลล์ไขกระดูกตั้งต้น (Bone marrow stromal cell)¹⁶⁻¹⁷

โดยทั่วไปไขกระดูกจะประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ไขกระดูกเริ่มต้น (bone marrow stromal cell), เซลล์ตั้งต้นของเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) และเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในระยะต่างๆ โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูก จะพบว่า bone marrow stromal cell จะ

สามารถยึดเกาะติดกับงานเพาะเลี้ยงเซลล์และสามารถแบ่งตัว ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดจะไม่สามารถยึดเกาะติดกับงานเพาะเลี้ยงหรือแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจะพบ bone marrow stromal cell มีการแบ่งตัวสร้างเป็นกลุ่มเซลล์ (colony forming unit) โดยมีลักษณะคล้ายเซลล์สร้างเส้นใย เนื่องจาก bone marrow stromal cell เป็นเซลล์ที่ยังคงมีลักษณะเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell-like character) หากได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม จะสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้ เช่น เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เซลล์สร้างกระดูกอ่อน (chondroblast) เซลล์ไขมัน (adipose cell) เซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cell) เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiocyte) และ เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) เป็นต้น ปัจจุบันได้ มีแนวความคิดในการนำ bone marrow stromal cell มาใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาทดแทน (tissue regeneration) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาจริยธรรมในการนำเซลล์ตัวอ่อน (embryonic stem cell) มาใช้ องค์ประกอบของว่านหางจระเข้¹⁷⁻¹⁸

ปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรค ว่านหางจระเข้ (Aloe vera) จัดเป็นสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ทำผลิตภัณฑ์ทางด้านบำรุงดูแลผิวพรรณและทางการแพทย์กันอย่างกว้างขวาง เช่น เครื่องสำอางบำรุงผิว แชมพูสระผม เครื่องดื่มสมุนไพร ตลอดจนขนมหวาน จากภูมิปัญญาชาวบ้าน พบว่าส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ สามารถรักษาและบรรเทาอาการเจ็บปวดจากแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวกที่บริเวณผิวหนัง อีกทั้งว่านหางจระเข้สามารถปลูกและดูแลรักษาได้ง่าย จึงจัดเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจ เพื่อหาคุณสมบัติในแง่ต่างๆ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาทางอุตสาหกรรม

ว่านหางจระเข้มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Aloe barbadensis* Mill. มีชื่อพ้องคือ *Aloe vera* Linn. เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Liliaceae สารสกัดจากส่วนใบของว่านหางจระเข้ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ

- 1) สารสกัดจากส่วนยาง (exudate yellow sap) เป็นส่วนของเหลวสีเหลืองขุ่น ไหลออกมาจากขอบนอกของใบ มีรสขม ประกอบด้วยสารกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone) ได้แก่

emodin, barbaloin และ aloe-emodin เนื่องจากมีส่วนประกอบเป็นสารกลุ่มฟีนอล ซึ่งมีผลข้างเคียงในแง่ของการระคายเคืองต่อผิวหนัง และเนื้อเยื่อ จึงไม่ค่อยนิยมใช้กับร่างกาย

- 2) สารสกัดจากส่วนวุ้น (aloe vera gel extract) ลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน สิ้น ไม่มีรส ค่าความเป็นกรดค่าประมาณ 5-6 องศาประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำประมาณ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือประกอบด้วยสารต่างๆดังนี้

- 1.คาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเจล ส่วนใหญ่อยู่ในรูปโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) สามารถแบ่งย่อยเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

- 1) glucomannans ประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแมนโนส (mannose) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน มีคุณสมบัติในการควบคุมความยืดหยุ่น
- 2) acemannan^{17,19} ประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส โดยน้ำตาลแมนโนสจะถูกเติมกลุ่ม acetyl ลงไปในโมเลกุล จากการทดลองพบว่า สาร acemannan มีผลในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียต่อเซลล์ปอดของมนุษย์ กระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์ macrophage, leucocyte เร่งการหายของแผลที่ผิวหนัง แผลในช่องปาก และผิวหนังที่ไหม้จากการฉายแสงรังสี กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์สร้างเส้นใย ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสเชื้อ HIV และมีผลร่วมในการต่อต้านไวรัสเมื่อใช้ร่วมกับ azidothymidine และ acyclovir และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง fibrosarcoma เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบน้ำตาลกลุ่มอื่นๆ เช่น galactose, xylose, arabinose, rhamnose, cellulose

และ pentosan ในส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้

2. โปรตีน พบประมาณร้อยละ 0.01 ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไกลโคโปรตีน เช่น lectin, Alectin A และ Alectin B นอกจากนี้ได้มีการรายงานถึงผลของสารไกลโคโปรตีน ซึ่งมีมวลประมาณ 5.5 kDa มีผลกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และการสร้างไฟโบรเนคติน
3. สเตอรอล พบว่าในส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้มีคอเลสเตอรอลจำนวนน้อย
4. วิตามิน พบ provitamin A, riboflavin, thiamine, niacin และ ascorbic acid
5. เกลือแร่ ที่พบมากที่สุดคือ โปสแตสเซียม โซเดียม แมงกานีส อาจพบ ฟอสฟอรัส อลูมิเนียม แวนาเดียม แคลเซียม สโตเนียม เหล็ก และสังกะสี โดยปริมาณเกลือแร่จะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม

คุณสมบัติส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้

เนื่องจากส่วนประกอบของวุ้นหางจระเข้ประกอบด้วยสารหลายชนิด จึงทำให้ยากต่อการแยกส่วนประกอบของส่วนวุ้นอย่างสมบูรณ์¹⁸ และเป็นข้อจำกัดในการชี้ชัดถึงผลที่ได้จากการทดลองว่าเกิดขึ้นจากสารตัวใด ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าส่วนประกอบต่างๆภายในส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้มีการทำงานร่วมกัน คุณสมบัติของวุ้นหางจระเข้ พอสรุปได้ดังนี้

1. ช่วยเร่งการหายของแผลบริเวณผิวหนัง¹⁹

วุ้นหางจระเข้สามารถเร่งการหายของแผลบริเวณผิวหนังและช่องปาก ถึงแม้กลไกที่แท้จริงยังไม่ทราบชัดเจน แต่ได้มีการเสนอแนะว่า วุ้นหางจระเข้ทำให้แผลมีความชุ่มชื้น เร่งการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังจากบริเวณใกล้เคียงมายังบริเวณแผล กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์บุหลอดเลือดและการสร้างเส้นเลือดใหม่ หรือกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยและการสร้างคอลลาเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเนื้อเยื่อ

2. ยับยั้งการอักเสบ²⁰

ว่านหางจระเข้สามารถลดการอักเสบ โดยกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาสต์ และเม็ดเลือดขาว และยับยั้งการเคลื่อนที่ของ mast cell มายังบริเวณบาดแผล โดยพบเอนไซม์ peptidase (bradykinase) ซึ่งสามารถย่อยสาร bradykinin ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ นอกจากนี้ว่านหางจระเข้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสาร prostaglandin E-2 ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการปวดและอักเสบ

3. ลดระดับน้ำตาลในเลือดและป้องกันโรคเบาหวาน²¹

ผู้ป่วยโรคเบาหวานเมื่อดื่มว่านหางจระเข้ พบว่าระดับน้ำตาลและไตรกรีเซอไรด์ในกระแสเลือดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในหนูพบการเพิ่มขึ้นของระดับอินซูลินในกระแสเลือด ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง

4. ต่อต้านแบคทีเรีย²²

สารสกัด acemannan สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาสต์ (macrophage) ให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ (nitric oxide), TNF- α และ IL-6 ได้

5. อื่นๆ

มีการรายงานผลในผู้ป่วยที่ดื่มสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ สามารถรักษาโรคแผลในกระเพาะ²³ และลดระดับไทรอยด์ฮอร์โมนในกระแสเลือดของหนูทดลอง²⁴ นอกจากนี้สารโพลีแซคคาไรด์ที่อยู่ในส่วนหัวของว่านหางจระเข้สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส HIV ในการทดลองห้องปฏิบัติการ²⁵

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



วิธีการวิจัย

การเตรียมสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ (aloe vera gel and exudate)

การเตรียมสารสกัดของว่านหางจระเข้ ทำตามวิธีที่ผู้วิจัยเคยรายงานมาก่อน¹²⁻¹³ โดยย่อคือ ใบัวว่านหางจระเข้ พันธุ์ *Aloe barbadensis* ที่มีความกว้างบริเวณโคนใบ 6-10 เซนติเมตร จะถูกนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และลอกส่วนผิวที่เป็นสีเขียวออก เหลือแต่ส่วนวุ้นใส ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดส่วนยางที่อาจปนเปื้อนกับส่วนวุ้น จากนั้นหั่นส่วนวุ้นใสเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร แล้วทำให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer (Wheaton, NJ, USA) กรองผ่านผ้าขาวบางตามลำดับ ส่วนการเตรียมสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ เมื่อตัดใบัวว่านหางจระเข้ ส่วนยางจะไหลออกมาจากส่วนเปลือกด้านในของว่านหางจระเข้ตรงบริเวณรอยตัด รวบรวมประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางส่วนยางจากใบัวว่านหางจระเข้ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 50

สารสกัดที่ได้ทั้งสองชนิด จะถูกแยกกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการผ่านกระดาษไนโตรเซลลูโลส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดส่วนวุ้นและส่วนยางของว่านหางจระเข้ จะถูกคำนวณด้วยชุดวัดปริมาณโปรตีนของ Bio-Rad (CA, USA) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนอัลบูมิน (bovine serum albumin, fraction V) ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยทำตามคำแนะนำในเอกสารของบริษัทผู้ผลิต การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกของหนูและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

เซลล์สร้างกระดูกจากไขกระดูกจะถูกแยกด้วยวิธีที่มีรายงานไว้แล้ว²⁶ โดยย่อคือส่วนไขกระดูกที่อยู่ในส่วน diaphysis จะถูกรวบรวมในอาหารเลี้ยงเซลล์ alpha-modified Minimum Essential Medium (α -MEM) ที่ประกอบด้วย แอล-กลูตามีน (L-Glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, เพนิซิลิน-จี (Penicillin-G) ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เฮพาริน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ไขกระดูกจะถูกทำให้เจือจางเท่าตัวด้วย 0.9% โซเดียมคลอไรด์ เซลล์สร้างกระดูกจะแยกจากเซลล์อื่นๆในไขกระดูกด้วยสารละลาย Ficoll-Hypaque ที่ density gradient ($d = 1.077 \text{ g/ml}$, Pharmacia Biotech, Sweden) โดยนำไปปั่นที่ 2,900 รอบต่อนาที ($1300 \times g$) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเซลล์จะถูกรวบรวมและล้างด้วยสารอาหารเลี้ยงเซลล์สองครั้ง และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยเซลล์จะถูกนับจำนวนและหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 30,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนในวันรุ่งขึ้นเพื่อล้างเอาเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงออก โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนอาทิตย์ละสองครั้ง เซลล์ที่ได้จะถูกล้างเป็นรุ่นที่ 1 ในการทดลองนี้จะใช้เซลล์รุ่นที่ 2-5

โดยการศึกษาในระดับอนไซม์อัลคาลินฟอสฟาเตสและการตกผลึกของสารอนินทรีย์ เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 10 รวมทั้งกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร β -glyceralphosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และสาร dexamethasone ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 จะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนกับเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนูดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยสารเอ็มทีที (MTT assay)

วิธีการวิเคราะห์นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Freshney²⁷ โดยย่อคือ เซลล์จะถูกหว่านลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (Nunc, Denmark) ที่ความหนาแน่น 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากซีรัม 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่วโมง เพื่อล้างซีรัมออกและเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมที่มีสารสกัดของว่านหางจระเข้ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่กำหนด เซลล์จะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยสารเอ็มทีที

เมื่อครบกำหนด อาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยนเป็นอัลฟาเอ็มอีเอ็มชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด (α -MEM without phenol red) ที่มีสารละลายเอ็มทีที (MTT) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเข้าสู่ออบเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีเป็นฟลิคฟอร์มาแซน (formazan) ของเซลล์ที่ทราบจำนวน เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมจะคิดเป็นร้อยละ 100

ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้เซลล์จำนวน 4 หลุมในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดส่วนวันของว่านหางจระเข้ และสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ การทดลองจะถูกทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

การวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์สร้างกระดูก (alkaline phosphatase activity)

การวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส คัดแปลงมาจาก Kondo และคณะ²⁸ โดยอาศัยความสามารถของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในการเปลี่ยนสารตั้งต้น p-nitrophenolphosphate เป็นสาร p-nitrophenol (PNP) ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง โดยสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วิธีโดยย่อคือ เมื่อจำนวนเซลล์ไขกระดูกได้ประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่จานเพาะเลี้ยง เซลล์จะถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของซีรัมร้อยละ 10, กรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สาร β -glycerophosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และสาร dexamethasone ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยมีสารสกัดส่วนวันของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เซลล์จะถูกทดสอบจนครบตามเวลาที่กำหนด จากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) อย่างน้อย 2 ครั้ง และใส่สารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100) เพื่อให้เซลล์แตก นำสารละลายโปรตีนที่ได้ผสมกับสารละลาย substrate solution (25 mM Na_2CO_3 , 25 mM NaHCO_3 , 5 mM MgCl_2) pH 10 ที่มีสาร p-nitrophenolphosphate ความเข้มข้นร้อยละ 0.005 (w/v) เป็นเวลา 15-30 นาที ที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย NaOH (0.5 M) และนำสารละลายสีเหลืองที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร nitrophenol ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ส่วนความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายที่แยกจากเซลล์สร้างกระดูก จะถูกคำนวณด้วยชุดวัดปริมาณโปรตีนของ Bio-Rad (CA, USA) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนอัลบูมิน (bovine serum albumin, fraction V) ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยทำตามคำแนะนำในเอกสารของบริษัทผู้ผลิต โดยปริมาณของเอนไซม์จะคำนวณจากปริมาณสาร p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นต่อปริมาณโปรตีนที่ใช้ต่อนาที (nmol nitrophenol/ ug of total protein/minute) ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้เซลล์จำนวน 4 หลุมในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดส่วนหัวของวุ้นของวุ้นหางจระเข้ และการทดลองจะถูกทำซ้ำอย่างน้อยสามครั้ง

การแยกอาร์เอ็นเอของเซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงจากไขกระดูกหนูและการวิเคราะห์ระดับอาร์เอ็นเอ นำรหัสด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

การแยกสายอาร์เอ็นเอและการวิเคราะห์ระดับอาร์เอ็นเอ นำรหัส ด้วยวิธี RT-PCR ทำตามวิธีที่ผู้วิจัยเคยรายงานมาก่อน²⁹ โดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออกและใส่สาร TRI reagent (Molecular Research Center Inc., Ohio, USA) สารละลายอาร์เอ็นเอจะถูกรวบรวมใส่หลอดทดลอง นำไปเขย่าอย่างแรงเพื่อแยกกลุ่มโปรตีนออกจากสายอาร์เอ็นเอ ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นที่ความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายชั้นสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดทดลองที่มีสาร isopropanol ปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าและทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที หลอดทดลองจะถูกปั่นที่ความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที 30 นาที เพื่อตกตะกอนสายอาร์เอ็นเอ และล้างสายอาร์เอ็นเอ นำรหัสด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และละลายด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase

ปริมาณของอาร์เอ็นเอที่แยกได้จะถูกวิเคราะห์และคำนวณด้วย UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 จากนั้นอาร์เอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองจะถูกเปลี่ยนเป็น single strand cDNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase และ ขยายสัญญาณด้วยปฏิกิริยา PCR 25-30 รอบ โดยใช้ forward และ reverse primers ที่ออกแบบให้สอดคล้อง (complementary) กับ cDNA ของจีนอัลคาลีนฟอสฟาเตสของหนู 5'- GAC AGC AAG CCC AAG AGA CCTT-3' และ 5'- CGA TGT CCT TGA TGT TGT GC-3' ตามลำดับ โดยสัญญาณที่ได้จะแสดงถึงระดับอาร์เอ็นเอรหัสของจีนเอนไซม์อัลคาลีนฟอสฟาเตส เพื่อเป็นการยืนยันว่า จำนวนอาร์เอ็นเอรหัสเริ่มต้นที่ใช้ในการขยายสัญญาณของจีนเอนไซม์อัลคาลีนฟอสฟาเตสมีปริมาณเท่ากัน สัญญาณของจีน glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็น house keeping gene จะถูกนำมาขยายสัญญาณด้วย forward and reverse primers ที่ออกแบบให้สอดคล้อง (complementary) กับ cDNA ของจีน GAPDH เพื่อเป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดย PCR product จะนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (gel electrophoresis) เพื่อเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้จากแต่ละกลุ่มทดลอง การตรวจวัดการตกผลึกของตะกอนแคลเซียมต่อ สารอนินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูก

จำนวนผลึกของตะกอนแคลเซียมที่เกิดจากกลุ่มของเซลล์สร้างกระดูก จะถูกย้อมและนับด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี Alizarin Red S โดยอาศัยหลักการที่สี Alizarin Red S จะจับกับแคลเซียมที่อยู่ในก้อนตกผลึกของสารอนินทรีย์ ซึ่งดัดแปลงมาจาก Puchtler³⁰ โดยย้อมคือ เซลล์สร้างกระดูกเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของซีรัมร้อยละ 10, กรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, β -glycerophosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ dexamethasone ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ จะถูกทดสอบด้วยสารสกัดส่วนหัวของวุ้นหางกระซู่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์ถูกทดสอบครบเป็นเวลา 21 วัน จะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และตรึงด้วย absolute methanol เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยสารฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และย้อมด้วยสารละลาย Alizarin Red S ที่

ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นจำนวน 3-5 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง ในอุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจนับจำนวนผลึกตะกอนของสารอนินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) หาค่าเฉลี่ย (mean) และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากว่านหางจระเข้กับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกทางเดียว (One-way Analysis of Variance) และแบบทดสอบของเชฟเฟ (Scheffe' Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทั้งนี้ในการวัดผลเอ็มทีที่จะให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100

ผลการวิจัย

เซลล์ที่แยกได้จากไขกระดูกของหนูมีลักษณะเป็นเซลล์สร้างกระดูก

เซลล์ที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 10, กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สาร β -glycerophosphaten ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ สาร dexamethasone ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ พบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเซลล์สร้างกระดูก (nodule formation) ตั้งแต่วันที่ 7 และเริ่มพบการตะกอนสารอนินทรีย์ (mineralization) เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน และเห็นได้ชัดเจนมากขึ้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน (รูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อน¹⁴⁻¹⁵

สารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนูและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 111.73 ± 6.13 , 115.54 ± 5.9 และ 121.75 ± 9.39 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่2)

เซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 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 (รูปที่2)

สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนูและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.05$) โดยลดลงเป็นร้อยละ 85.43 ± 8.61 , 78.07 ± 15.72 , 77.03 ± 14.56 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งกำหนดให้มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 3)

สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อทดสอบเป็นเวลา 7 วัน

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อทดสอบครบเป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน

ภายในเวลา 1 และ 3 วัน พบว่าสารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ที่ทดสอบไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) แต่เมื่อทดสอบเป็นเวลา 7 วันพบว่า สารสกัดส่วนยางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) โดยที่ระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก ที่ 3 และ 7 วัน โดยทั่วไปมีค่าสูงขึ้นประมาณ 2 และ 5 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าของเอนไซม์ที่เวลา 1 วัน (รูปที่ 4)

สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 วัน

เซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู ทดสอบด้วยสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบครบเป็นเวลา 1 และ 3 วัน จะนำมาตรวจวัดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธี RT-PCR

ภายในเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้พบไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก (รูปที่ 5A และ C) แต่เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 วันพบว่าสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของจีนเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 5B และ C)

ผลของสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ต่อการตกผลึกของสารอนินทรีย์ใน bone marrow stromal cell

เนื่องจากสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสและการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาผลที่มีต่อการตกผลึกของสารอนินทรีย์ใน bone marrow stromal cell ต่อไป

จากการนับจำนวนผลึกของสารอนินทรีย์ที่ย้อมติดสี Alizarin Red พบว่าภายในเวลา 21 วัน สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการตกผลึกของสารอนินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ใส่กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สาร β -

glycerophosphate ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และสาร dexamethasone ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์
จะไม่พบการตกตะกอนของสารอนินทรีย์เลย (รูปที่ 5)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ ระดับอาร์เอ็นเอการหาค่าและการทำงานของเอนไซม์อัลคาลีนฟอสฟาเตส รวมทั้งการตกตะกอนของสารอนินทรีย์ในเซลล์ที่แยกจากไขกระดูกของหนู โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ วิธี reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อวัดระดับอาร์เอ็นเอการหาค่า วิธีตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาลีนฟอสฟาเตส ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น p-nitrophenolphosphate เป็นสาร p-nitrophenol ที่มีสีเหลือง เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ในเซลล์สร้างกระดูก และการย้อมและนับจำนวนตะกอนสารอนินทรีย์ด้วยการย้อมสี Alizarin Red ซึ่งเป็นสาร chelating agent ที่สามารถจับกับแคลเซียมไอออนที่อยู่ในผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ เพื่อตรวจวัดความสามารถของสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ในการเร่งการตกตะกอนสารอนินทรีย์

จากการตรวจวัดด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูก และที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดส่วนหางของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีน 20, 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกและเซลล์ไลน์สร้างกระดูก MC3T3-E1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของกลุ่มผู้วิจัยที่พบว่า สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน ในขณะที่สารสกัดส่วนหางมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งสามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ¹²⁻¹³ เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติของเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกของหนู ซึ่งเป็น primary cell และมีคุณสมบัติการ

รวมกลุ่มและตกตะกอนสารอนินทรีย์ ขณะที่เซลล์ MC3T3-E1 เป็นเซลล์ไลน์ที่อาจมีการเปลี่ยนทางด้านจีนและโครงสร้างโมเลกุลบางอย่างได้ ผู้วิจัยจึงตัดสินใจนำเซลล์สร้างกระดูกที่แยกจากไขกระดูกมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เนื่องจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ตั้งต้น เป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการสร้างกระดูก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่มีต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตั้งต้นเป็นเซลล์สร้างกระดูก และการตกตะกอนสารอนินทรีย์ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สองและสามของการสร้างกระดูก โดยการศึกษาผลของสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ผู้วิจัยอาศัยการตรวจวัดระดับอาร์เอ็นเอไรโบสและการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นจีนอ้างอิง (gene marker) ของการเริ่มต้นการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูก¹⁴⁻¹⁵ โดยผลการทดลองพบว่าสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับอาร์เอ็นเอไรโบส เมื่อทดสอบเป็นเวลา 1 และ 3 วัน และไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อทดสอบเป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน ในขณะที่สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอไรโบสและปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ไขกระดูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 และ 7 วัน ตามลำดับ

การที่สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดระดับอาร์เอ็นเอไรโบสของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่ไม่มีผลลดปริมาณเอนไซม์เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 วัน อาจเกิดจากระดับอาร์เอ็นเอไรโบสเพิ่งเริ่มลดลงในวันที่ 3 ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการอ่านสัญญาณของสายอาร์เอ็นเอและตัดแปลงเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์ (translation and protein modification) จึงทำให้ระดับโปรตีนของเอนไซม์ในวันที่ 3 ยังไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่พบว่า การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบเป็นเวลา

7 วัน อีกทั้งระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสและการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลล์ที่ทดสอบเป็นเวลา 1 วัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สาเหตุที่ผู้วิจัยเลือกใช้สารสกัดส่วนวุ้นที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาศึกษาผลต่อการตกตะกอนสารอนินทรีย์ เนื่องจากสารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลลดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ระยะเวลา 7 วัน และการศึกษาผลของสารที่มีต่อการตกตะกอนสารอนินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูก ต้องใช้เวลาทดสอบอย่างน้อย 21 วัน ซึ่งผลจากการทดลอง (รูปที่ 5) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการตกตะกอนสารอนินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือน้อยกว่า ไม่มีผลรบกวนต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกและการตกตะกอนสารอนินทรีย์

การที่สารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการตกตะกอนแคลเซียมในเซลล์สร้างกระดูก จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบมีการรายงานถึงผลของสารกลุ่ม growth factor เช่น platelet derived growth factor และ fibroblast growth factor-2 ที่มีผลต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูก แต่ไม่มีผลต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตั้งต้นเป็นเซลล์สร้างกระดูก และการตกตะกอนสารอนินทรีย์ ในขณะที่สาร BMP-2 ที่มีผลต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกและการตกตะกอนแคลเซียม จะไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์³¹⁻³⁵ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า โดยทั่วไปสารกลุ่ม growth factor หากมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ก็จะไม่มีผลต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูก หรือหากมีผลต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์สร้างกระดูกก็จะไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์

ถึงแม้การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจะไม่สามารถบอกถึงกลไกที่แท้จริงของสารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ได้มีการรายงานถึงสารกลุ่มโพลีแซคาไรด์ เช่น acetylated acemannan,

mannose-6-phosphate และ lectin-like molecule ที่แยกมาจากส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ ถึงผลที่มีต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์¹⁷ อีกทั้งการวิจัยครั้งนี้มีข้อจำกัดหลายประการ ที่ต้องปรับปรุงแก้ไขในการศึกษาครั้งต่อไป คือ สารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ที่ใช้ เป็นสารสกัดโดยรวมที่ประกอบไปด้วยสารหลายชนิด¹⁸ ซึ่งทำให้ไม่สามารถชี้ชัดถึงผลที่ได้จากการทดลองว่าเกิดขึ้นจากสารตัวใด แต่อาจอธิบายได้ว่าสารที่เป็นส่วนประกอบในส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณมากพอที่จะมีผลต่อการสร้างเอ็นไซม์อัลคาลินฟอสฟาเตสในระดับอาร์เอ็นเอในรหัสและโปรตีน อย่างไรก็ตามการนำสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกจากส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้มาทดสอบ เป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการยืนยันแนวความคิดดังกล่าว เพื่อเป็นการนำวุ้นหางจระเข้มาพัฒนาใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกต่อไป ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งคือผู้วิจัยใช้โปรตีนเป็นตัวแทนของความเข้มข้นของสารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ แทนการใช้สารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่า เป็นสารที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่อย่างไรก็ดีผู้วิจัยเชื่อว่า ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนหนึ่ง ก็จะมีปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ค่าหนึ่ง เมื่อเราเพิ่มจำนวนโปรตีนเพิ่มขึ้น ปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ก็ควรจะเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่สอดคล้องกัน

จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ และไม่มีผลรบกวนต่อการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกสมบูรณ์ และการตกตะกอนสารอนินทรีย์ในเซลล์สร้างกระดูก ดังนั้น สารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้จึงเป็นสารที่น่าสนใจในการเร่งการสร้างกระดูก โดยผ่านขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้นและส่งผลให้เกิดการสร้างกระดูกเพิ่มมากขึ้น การนำสารสกัดส่วนวุ้นของวุ้นหางจระเข้มาผสมร่วมกับสารอื่นที่มีผลในการเร่งการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก และการตกตะกอนสารอนินทรีย์ เช่น สาร bone morphogenic

proteins (BMPs) อาจช่วยเร่งการกระบวนการสร้างกระดูกให้เร็วมากยิ่งขึ้น ก็เป็นแนวความคิดที่น่าสนใจในการศึกษาขั้นต่อไป

ข้อสรุป

สารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดส่วนหัวที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการตกตะกอนสารอนินทรีย์ในเซลล์ไขกระดูก ส่วนสารสกัดส่วนหัวที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 และ 7 วัน ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการทันตสุขภาพแห่งชาติ, กองทันตสาธารณสุข. รายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ 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. Libin BM, Ward H, Fishman L. Decalcified, lyophilized bone allografts for use in human periodontal defects. *J Periodontol*;1975;46:51-6.
5. Rummelhart JM, Mellonig JT, Gray JL, Towle HJ. Comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal defects. *J Periodontol* 1989;60:655.
6. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000, 1999;19:40-58.
7. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontal Res*. 1992;27:285-90.
8. Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc* 2002;133:1383-6.

9. Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. *J Periodontol* 2002;73:813-22.
10. 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.
11. 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.
12. Thunyakitpaisal P, Damrongsri D, Charearnwetchatom N, Boonyaratanasootorn 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.
13. Thunyakitpaisal 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.
14. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In : Bilezikian JP, Raisz LG, RodanGA, editors. *Principle of Bone Biology* 1st edition. San Diego : Academic Press,1996:69-88.
15. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol*. 1998;76:899-910.
16. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11917-23.

17. Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel : a review update. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 68:3-37.
18. Agarwala OP. Whole leaf aloe gel vs. standard aloe gel. *Drug and Cosmetics Industry* February, 22-28.
19. Choi SW, Son BW, Son YS, Par YI, Lee SK, Chung MH. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera, *British Journal of Dermatology*, 2001, 145:535-45.
20. Vazquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. Anti-inflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. *J Ethnopharmacol* 1996; 55:69-75.
21. Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sutlupinar N. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. *Phytother Res* 2001;15:157-61.
22. 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.
23. ศิริมา มหัทธนาคุณย์ 2539.ฤทธิ์สมุนไพรร่ว่านทางจระเข้ในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร ว.สงขลานครินทร์ (Songklanakarin J Sci Technol) 18(1): 49-57.
24. Kar A, Panda S, Bharti S. Relative efficacy of three medicinal plant extracts in the alteration of thyroid hormone concentrations in male mice. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81:281-5.
25. Kahlon JB, Kemp MC, Carpenter RH, McAnalley BH, McDaniel HR, Shannon WM. Inhibition of AIDS virus replication by acemannan in vitro. *Mol Biother* 1991; 3:127-35.

26. Kim CH, Kim HK, Shong YK, Lee KU, Kim GS. Thyroid hormone stimulates basal and interleukin-1-induced IL-6 production in human bone marrow stromal cells : a possible mediator of thyroid hormone-induced bone loss. *J Endocrinology* 1999;160:97-102.
27. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3rd edition. New York: Wiley-Liss, Inc.,1994.
28. 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.
29. Thunyakitpisal PD, Chaisuparat R. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduced the expression of matrix metalloproteinase-9 (Gelatinase B) in osteoblastic cells and HT1080 fibrosarcoma cells. *J Pharmacol Sci.* 2004 ;94:403-9.
30. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the histology and mechanism of alizarin and alizarin RedS stain for calcium. *J Histochem Cytochem* 1969;17:110-24.
31. Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone.* 2004;34:402-11.
32. Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats.*Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003;41:173-8.
33. Onyia JE, Miller B, Hulman J, Liang J, Galvin R, Frolik C, Chandrasekhar S, Harvey AK, Bidwell J, Herring J, Hock JM. Proliferating cells in the primary spongiosa express osteoblastic phenotype in vitro. *Bone.* 1997;20:93-100.

34. Huang W, Rudkin GH, Carlsen B, Ishida K, Ghasri P, Anvar B, Yamaguchi DT, Miller TA. Overexpression of BMP-2 modulates morphology, growth, and gene expression in osteoblastic cells. *Exp Cell Res.* 2002 ;274:226-34.
35. 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.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

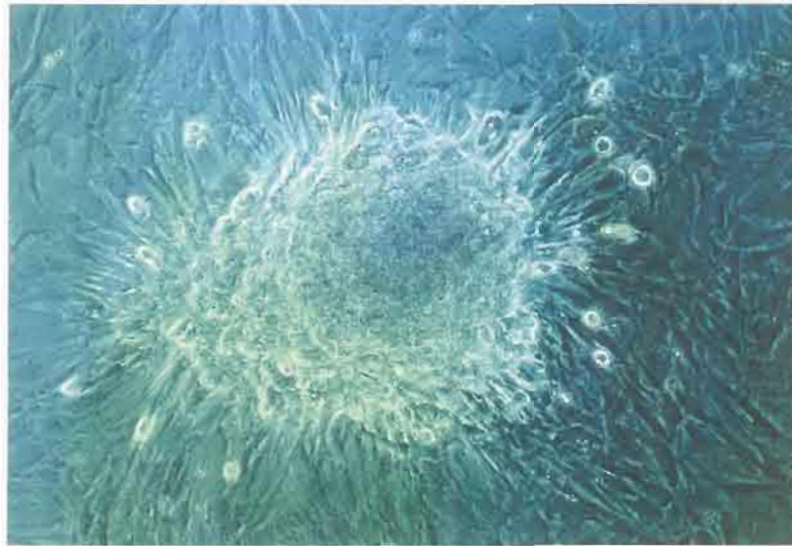
**Nodule formation****Calcification**

Figure 1. Primary bone marrow stromal cells were treated with 10% serum α -MEM supplemented with 50 μ g/ml ascorbic acid, 1 mM β -glycerophosphate and 0.1 μ M dexamethasone.

- a. the nodule formation of primary bone marrow stromal cell at day 7
- b. the matrix calcification of primary bone marrow stromal cell at day 14. Cells were fixed and stained with Alizarine Red S solution.

รูปที่ 2

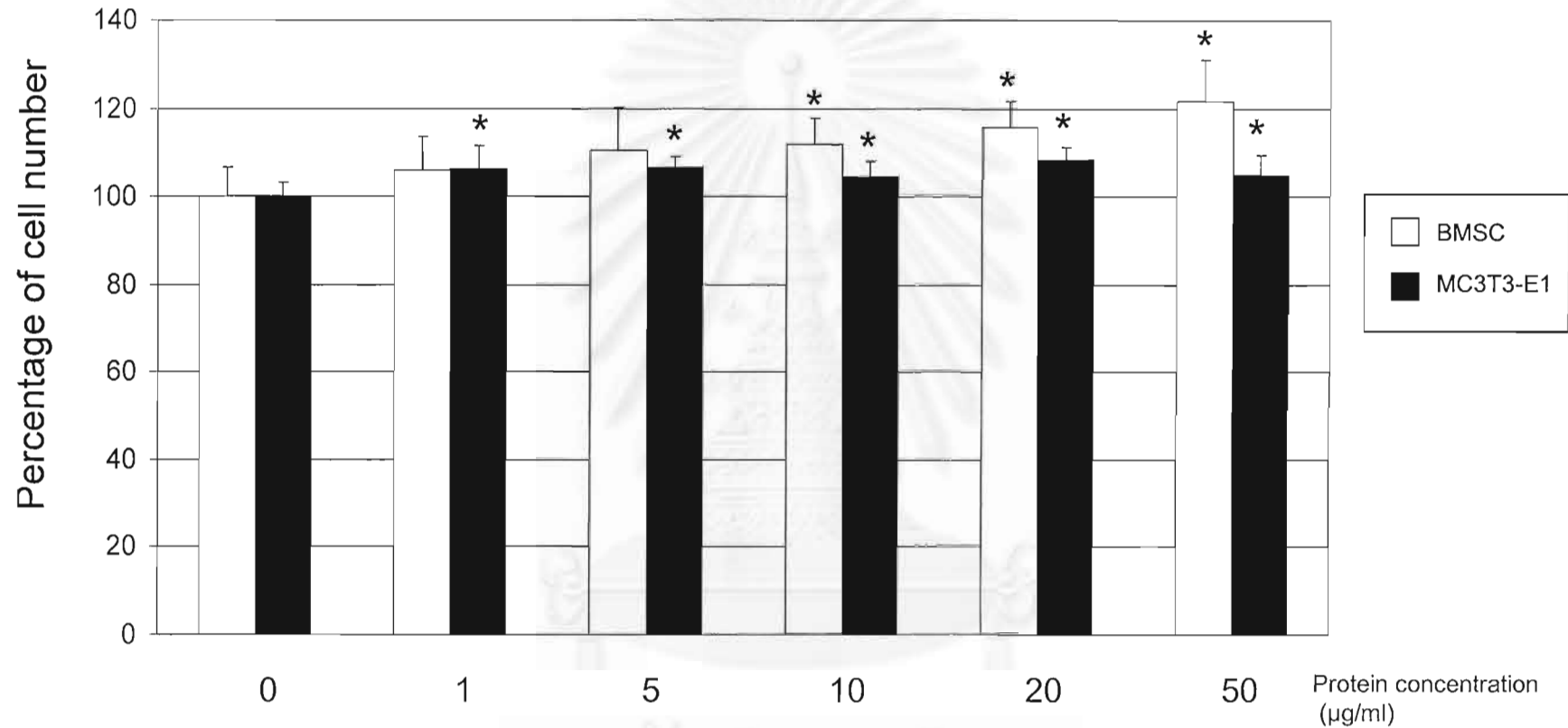


Figure 2. shows the effect of aloe vera gel extract on the proliferation of primary bone marrow stromal cells and MC3T3-E1 osteoblast cell line via the MTT assay. Cells were treated with aloe vera gel extract at different protein concentrations for 24 hours. Data showed in mean \pm S.D from triplicate cultures. (* demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $n=12$)

รูปที่ 3

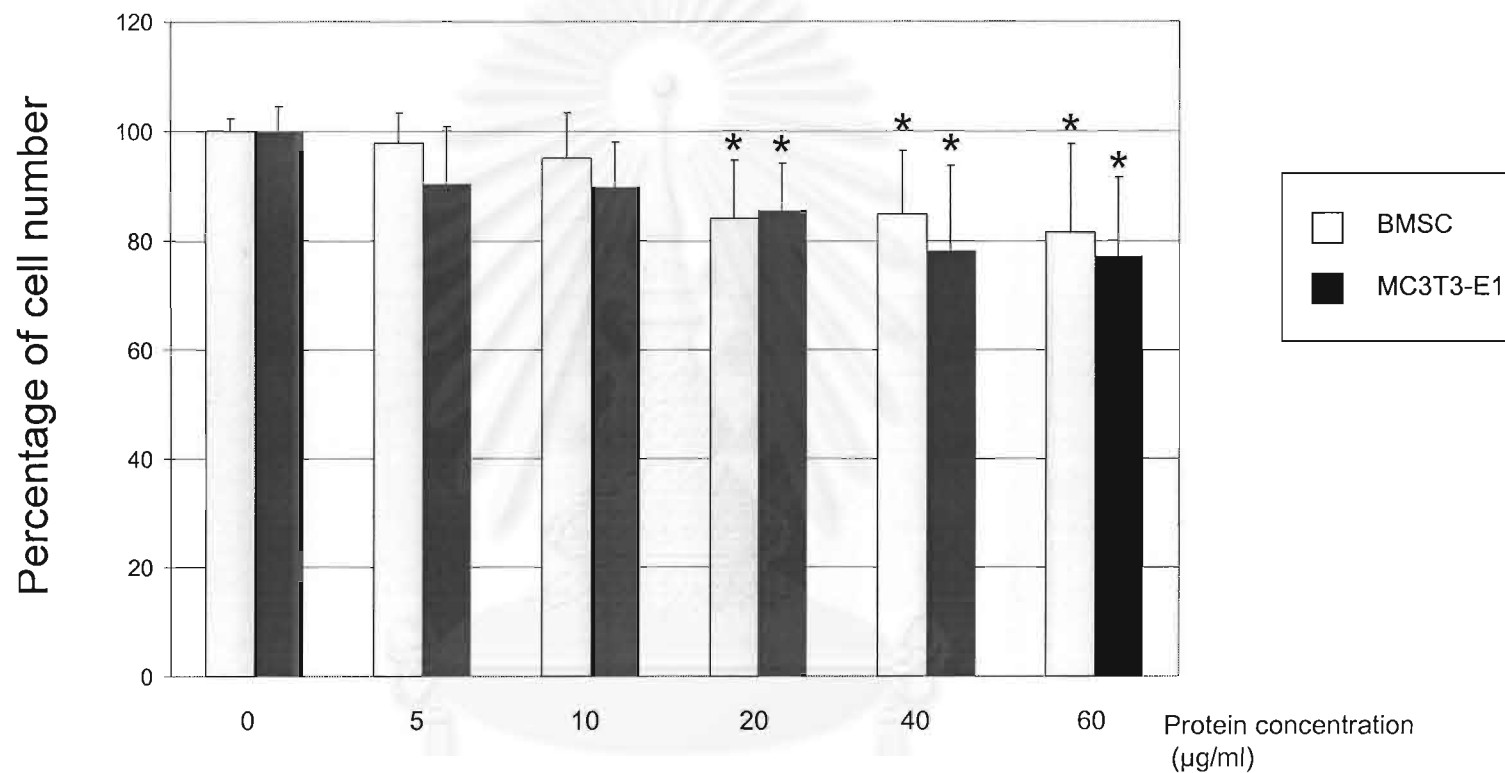


Figure 3. shows the effect of aloe vera exudate on the proliferation of primary bone marrow stromal cells and MC3T3-E1 osteoblast cell line via the MTT assay. Cells were treated with aloe vera exudate at different protein concentrations for 24 hours. Data showed in mean \pm S.D from triplicate cultures. (* demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $n=12$)

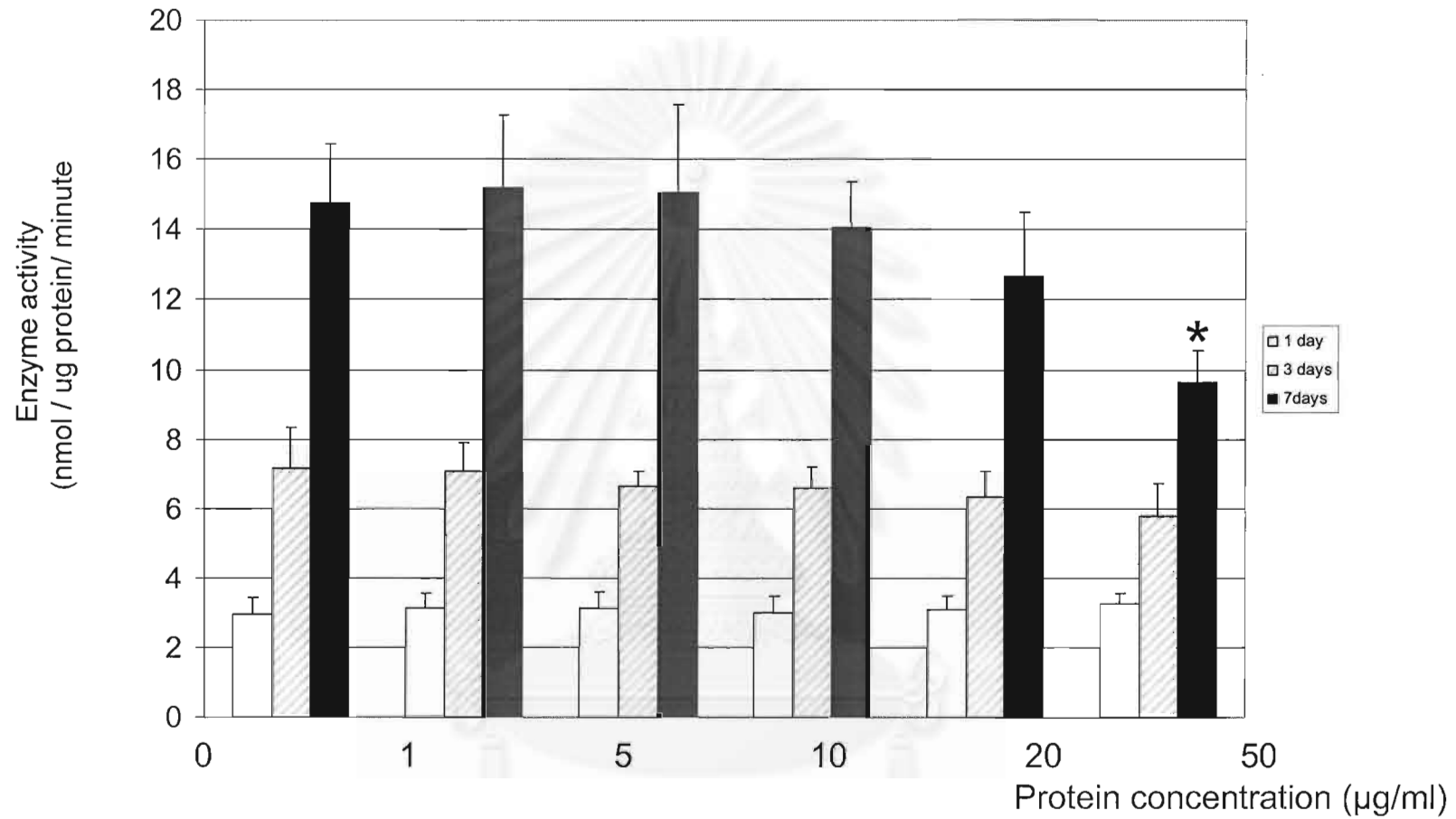


Figure 4. shows the effect of aloe vera gel extract on alkaline phosphatase activity in primary bone marrow stromal cells . Cells were treated with aloe vera gel extract at different protein concentrations for 1, 3 and 7 days. The enzyme activity is given as nmol p-nitrophenol/ µg protein/minute. Data showed in mean \pm S.D from triplicate experiments.

(* demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $n=12$)

A.

รูปที่ 5

32

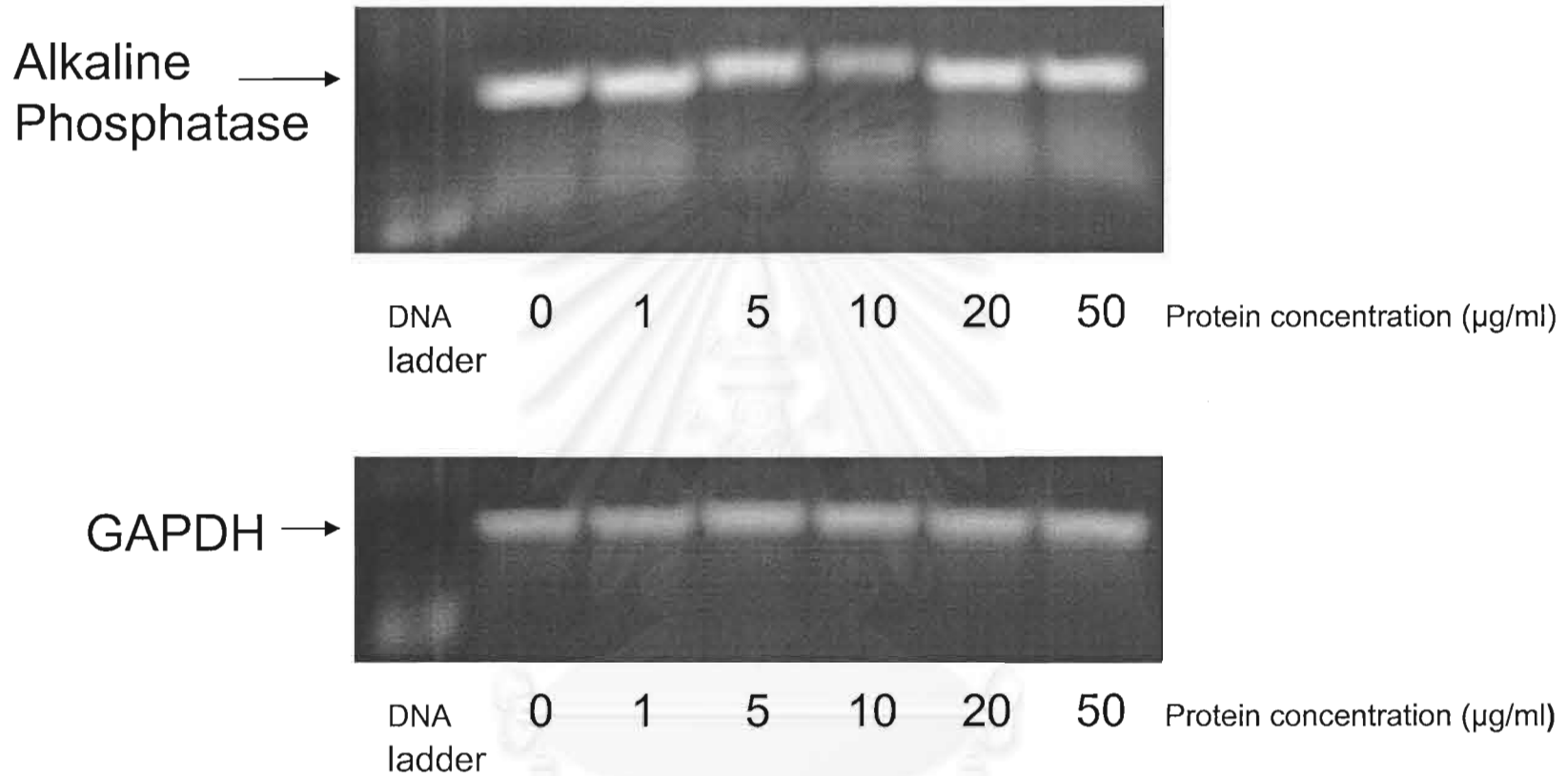


Figure 5. shows the effect of aloe vera gel extract on alkaline phosphatase mRNAs level of primary bone marrow stromal cells.

Cells were treated with aloe vera gel extract at different protein concentrations for 1 and 3 days. RT-PCR were performed by using specific primers and its products were subjected to gel electrophoresis (**A** for 1 day and **B** for 3 day). The products were quantified by densitometric analysis and the expression levels of mRNA were normalized to the amount of GAPDH product detected in the same Samples. **C.** Data showed in the percentage mean mRNA levels \pm S.D relative to control of three separate experiments.

(* demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $n=3$)

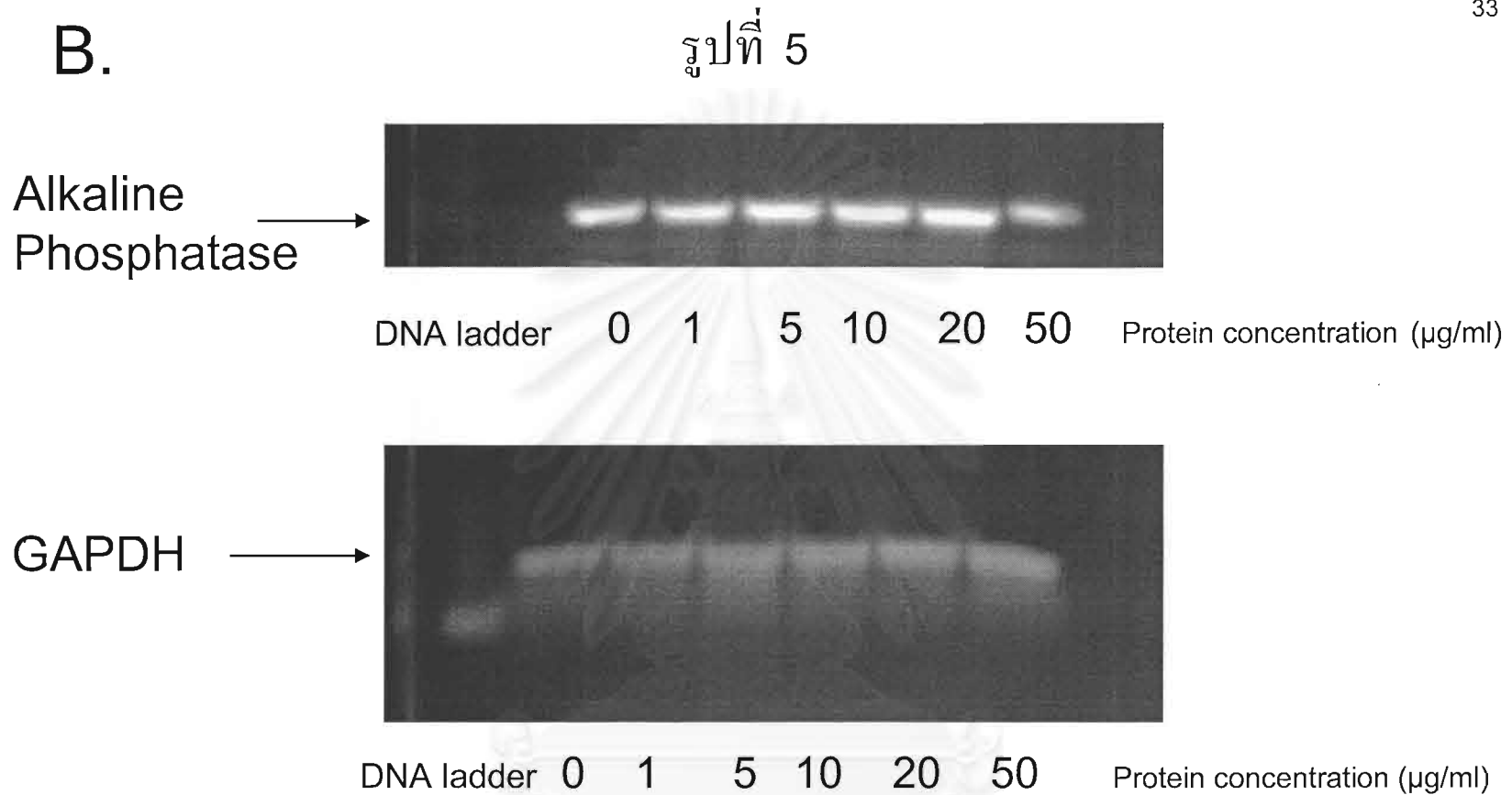


Figure 5. shows the effect of aloe vera gel extract on alkaline phosphatase mRNAs level of primary bone marrow stromal cells. Cells were treated with aloe vera gel extract at different protein concentrations for 1 and 3 days. RT-PCR were performed by using specific primers and its products were subjected to gel electrophoresis (A for 1 day and B for 3 day). The products were quantified by C. Densitometric analysis and the expression levels of mRNA were normalized to the amount of GAPDH product detected in the same Samples. Data showed in the percentage mean mRNA levels \pm S.D of alkaline phosphatase relative to GAPDH of three separate experiments. (* demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $n=3$)

C.

รูปที่ 5

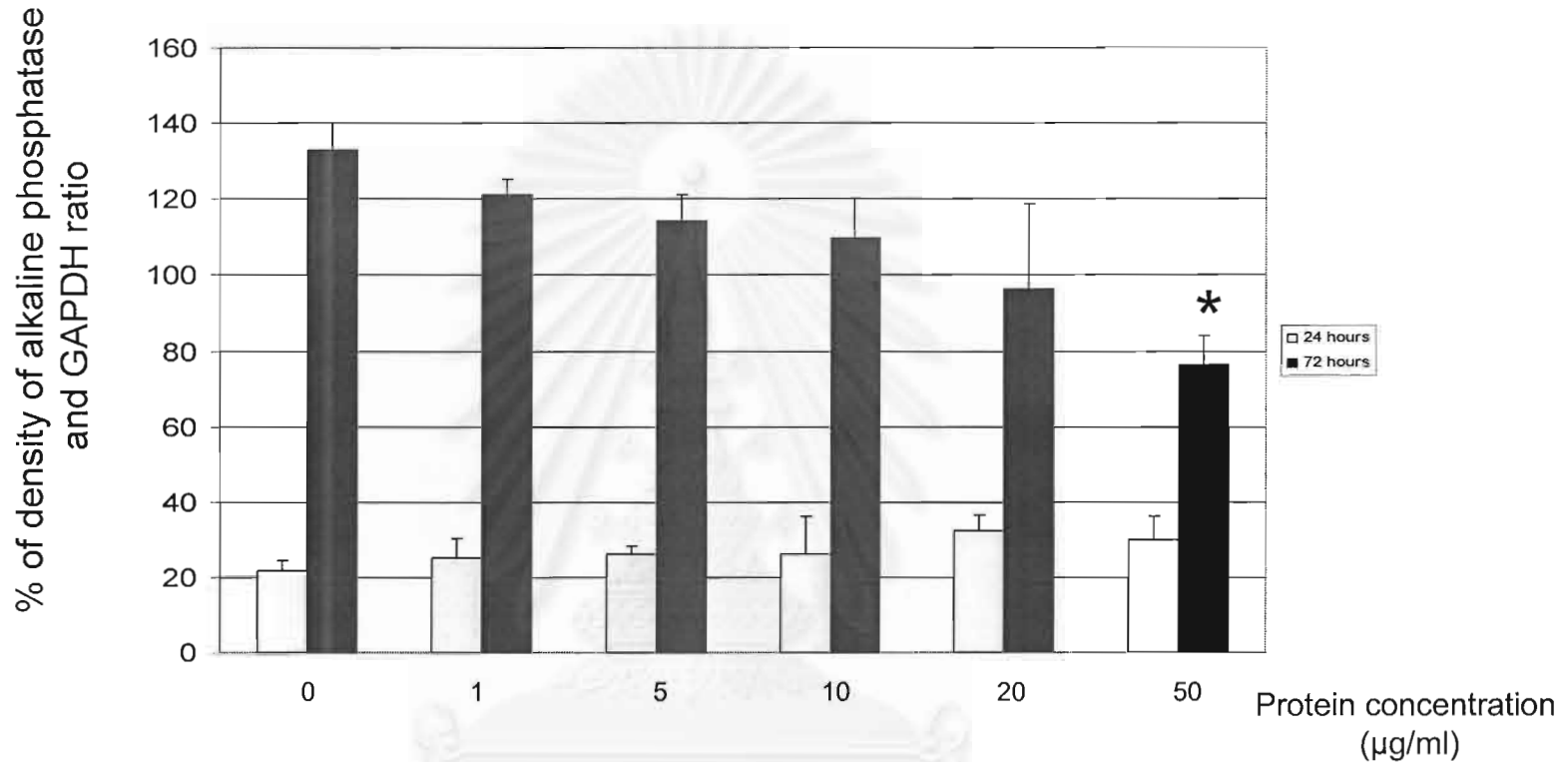


Figure 5. shows the effect of aloe vera gel extract on alkaline phosphatase mRNAs level of primary bone marrow stromal cells.

Cells were treated with aloe vera gel extract at different protein concentrations for 1 and 3 days. RT-PCR were performed by using specific primers and its products were subjected to gel electrophoresis (A for 1 day and B for 3 day). The products were quantified by C. Densitometric analysis and the expression levels of mRNA were normalized to the amount of GAPDH product detected in the same Samples. Data showed in the percentage mean mRNA levels \pm S.D relative to control of three separate experiments.

(* demonstrates significance from the control group at $p < 0.05$, $n=3$)

รูปที่ 6

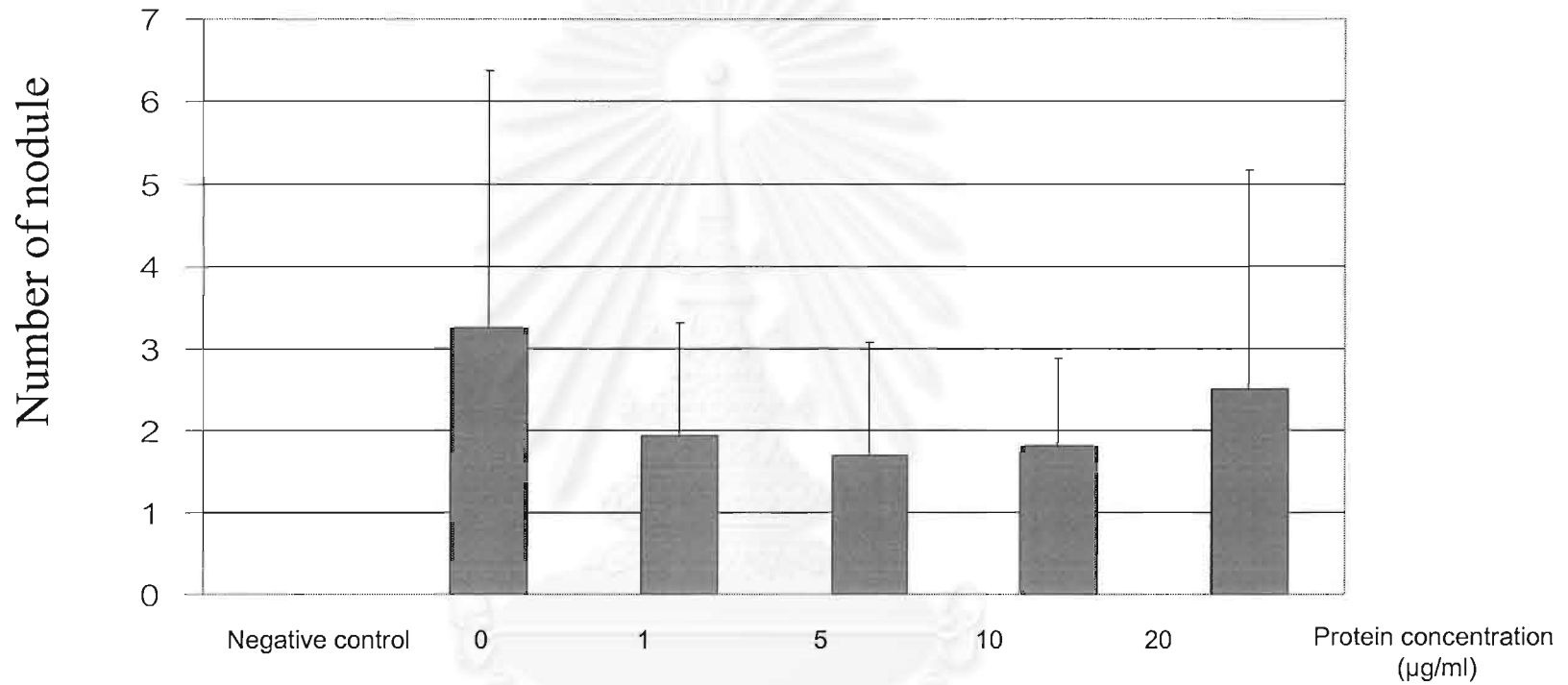


Figure 6. show the effect of aloe vera gel extract on mineralization in primary bone marrow stromal cells. Cells were treated with aloe vera gel extract at different protein concentrations for 21 days. The cells were fixed in absolute methanol and stained with 1% alizarin red. The mineralization nodules were counted and analyzed. Data showed in mean \pm S.D from duplicate cultures (n=8)