



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลของสารสกัดพืชท้องถิ่นที่พบในประเทศไทยในเซลล์เพาะเลี้ยง
(In vitro Wound Healing Effect of Thai Local Plant Extracts in Cell Culture
System)

โดย

นสภ. ชัญญา บุญส่ง รหัสนิต 60210110

นสภ. ภัทธิยา หอมเสียง รหัสนิต 60210253

นสภ. จิราพร กองเกิด รหัสนิต 60210258

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลของสารสกัดพืชท้องถิ่นที่พบในประเทศไทยในเซลล์เพาะเลี้ยง
(In vitro Wound Healing Effect of Thai Local Plant Extracts in Cell Culture System)

โดย

นสภ. ชัญญา บุญส่ง

รหัสบัณฑิต 60210110

นสภ. ภัทริยา หอมเสียง

รหัสบัณฑิต 60210253

นสภ. จิราพร กองเกิด

รหัสบัณฑิต 60210258

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานประกอบโครงงานวิจัยเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชา โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 (Research Project in Pharmaceutical Sciences II) รหัสวิชา 791591 มีขอบเขตการศึกษาเกี่ยวกับ กระบวนการวางแผน การวิจัยการเขียนโครงร่างงานวิจัยและการนำเสนอโครงร่างงานวิจัยสำหรับนิสิตเภสัชศาสตร์ชั้นปีที่ 5 สาขาเน้น อุตสาหการ โดยคณะผู้จัดทำสนใจศึกษาฤทธิ์สมานแผลจากพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยใช้โมเดลของเซลล์ เยื่อบุไตลิง (Vero cell)

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานประกอบโครงงานวิจัยเล่มนี้จะเป็นข้อมูลสนับสนุนการศึกษา พัฒนาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยในระดับสูงขึ้นไป และเป็นประโยชน์ เพื่อนำไปใช้ในการต่อยอดหรือพัฒนาการ นำพืชไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ในอนาคต

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2565

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลของสารสกัดพืชท้องถิ่นที่พบในประเทศไทยในเซลล์เพาะเลี้ยง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|--------------------------|--------------------|
| 1. นสภ. ชัญญา บุญส่ง | รหัสนิสิต 60210110 |
| 2. นสภ. ภัททิยา หอมเสียง | รหัสนิสิต 60210253 |
| 3. นสภ. จิราพร กองเกิด | รหัสนิสิต 60210258 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. ญ.อ.ดร. ภัทรวดี ศรีคุณ | (ที่ปรึกษาหลัก) |
| 2. ดร. สันติ โพธิ์ศรี | (ที่ปรึกษาร่วม) |

บทคัดย่อ

การสมานแผล (Wounds healing) เกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อเกิดบาดแผล ร่างกายจะเกิดกลไกในการสมานแผล โดยมีกลไก 4 ระยะ ซึ่งกระบวนการสมานแผลมีความเกี่ยวข้องกับกลไกในการอักเสบ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม ปัจจุบันมีการนำผลิตภัณฑ์หลากหลายที่ใช้ในการรักษาแผล เช่นเดียวกับสารสกัดจากธรรมชาติที่ได้รับความนิยมสนใจอย่างต่อเนื่อง

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์สมานแผลของพืชที่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ด้านการอักเสบ ได้แก่ มะกอกเกลื้อน และลำโรง ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นในประเทศไทย โดยทำการสกัดด้วยสารละลายเมทานอล และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP วิธี DPPH และวิธี NO scavenging พบว่าสารสกัดมะกอกเกลื้อนและลำโรงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%inhibition) มีค่า IC_{50} ที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดมะกอกเกลื้อน และลำโรง คือ 176.38 ± 7.70 และ 196.11 ± 21.03 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (TEAC_{FRAP} ของสารสกัดมะกอกเกลื้อนและลำโรง มีค่า 353.18 ± 6.97 และ 344.62 ± 11.68 มิลลิกรัม Trolox / กรัมของสารสกัด ตามลำดับ และ TEAC_{DPPH} มีค่า 80.56 ± 0.12 และ 81.24 ± 0.25 มิลลิกรัม Trolox / กรัมของสารสกัด ตามลำดับ) ค่า IC_{50} ของ NO scavenging คือ 76.47 ± 4.26 และ 196.41 ± 22.26 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และทดสอบฤทธิ์สมานแผลด้วยวิธี Scratching assay ในเซลล์เยื่อบุไตลิง (Vero) พบว่าสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการสมานแผล โดยเปรียบเทียบระยะห่างระหว่างเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง เท่ากับ 706.07 ± 95.24 (สารสกัดมะกอกเกลื้อน ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 736.07 ± 82.44 (สารสกัดลำโรง ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ 589.67 ± 60.91 (ตัว

ควบคุม) ซึ่งผลที่ได้ตรงข้ามกับสมมติฐานในการหาสารสกัดที่ช่วยในการสมานแผล ทั้งนี้ควรมีการศึกษาโดยการนำสารไปทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องอื่นๆ ต่อไป รวมทั้งการทดสอบในเซลล์ชนิดที่เป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

คำสำคัญ: มะกอกเกลื่อน, สำโรง, ฤทธิ์สมานแผล

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2021

Title: In vitro Wound Healing Effect of Thai Local Plant Extracts in Cell Culture System

By 1. Ms. Chanya Boonsong ID 60210110
 2. Ms. Phatthiya Homsiang ID 60210253
 3. Ms. Jiraporn Kongkerd ID 60210258

Advisory committee: Dr. Pattaravadee Srikoon, R.Ph. (Advisor)
 Dr. Santi Phosri (Co-advisor)

ABSTRACT

Wounds healing is a natural process occurring by immune responses from skin wounds to cause losing its skin structure and functions. Wound healing processes consist of 4 steps which mainly involve the inflammatory mechanisms. Nowadays, many products commercially available. Natural products are famous for decades.

This study aimed to investigate wound healing effects of local Thai plants which have been reported their anti-inflammatory effects such as *Canarium subulatum* Guillaumin (Makok Lueam, CS), and *Sterculia foetida* (Sam Rong, SF). Methanolic extracts were investigated the antioxidant activities by FRAP, DPPH, and NO scavenging assay. The antioxidant activities were found at $IC_{50, DPPH}$ value of CS and SF as 176.38 ± 7.70 and 196.11 ± 21.03 $\mu\text{g/mL}$, respectively and $IC_{50, NO}$ of CS and SF are 76.47 ± 4.26 and 196.41 ± 22.26 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The $TEAC_{FRAP}$ of CS and SF are 353.18 ± 6.97 and 344.62 ± 11.68 mg Trolox /g extract, respectively. By which the $TEAC_{DPPH}$ of CS and SF are 80.56 ± 0.12 and 81.24 ± 0.25 mg Trolox /g extract, respectively. Cell viability was analyzed by MTT assay in African green monkey kidney cell line (Vero cell). Then scratching assay was used for evaluating their wound healing effects compared with the untreated control.

The results revealed that CS and SF extracts inhibit wound healing activity by comparing wound distance at different concentrations and incubation times. The wound closed at 12 hours are 706.07 ± 95.24 (CS 2.5 mg/mL), 736.07 ± 82.44 (SF 2 mg/mL), and 589.67 ± 60.91 (control).

The results were contrary to the hypothesis of finding extracts that aid in wound healing. Further studies of the CS and SF extracts should be carried out to test for potential effects, including intracellular types of connective tissue.

Keywords: *Canarium subulatum* Guillaumin, and *Sterculia foetida*, wound healing

(.....)

Dr. Pattaravadee Srikoon

Advisor

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ ได้รับทุนวิจัยสนับสนุนบางส่วนจากเงินสนับสนุนนิสิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีการศึกษา 2564 และทุนวิจัยส่วนตัวของอาจารย์ที่ปรึกษา ญ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ และ อ.ดร.สันติ โพธิ์ศรี ในการศึกษาวิจัยขั้นต้นนี้ พร้อมคำแนะนำในการทำวิจัย รวมทั้งเพื่อน ๆ ในกลุ่มวิจัยภายใต้การดูแลของ ญ.ดร.ภัทรวดี ศรีคุณ ทุกคน

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2565

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อภาษาไทย	๘
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	๙
กิตติกรรมประกาศ	๑๐
สารบัญ	๑๑
สารบัญตาราง	๑๒
สารบัญรูปภาพ	๑๓
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 กรอบแนวคิด	2
1.5 แผนการปฏิบัติงาน	4
1.6 งบประมาณค่าใช้จ่าย	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	6
2.1 การสमानแผล	6
2.1.1 กระบวนการสमानแผล	6
2.1.2 วิถี Nuclear factor kappa-B (NF-kB)	7
2.1.3 พืชหรือสารชนิดอื่นที่มีฤทธิ์สमानแผล	8
2.2 กลไก NF-kB ในพืชสมุนไพรตัวอย่าง	9
2.2.1 มะกอกเกลื้อน	9
2.2.2 สำโรง	9
2.3 พืชสมุนไพรมะกอกเกลื้อน	11
2.4 พืชสมุนไพรสำโรง	13

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.1 ตัวอย่างพืชและการสกัด	15
3.2 เซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์	15
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	15
3.3.1 FRAP assay	15
3.3.2 DPPH assay	16
3.3.3 Nitric oxide radical scavenging	17
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	17
3.5 การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล	18
3.6 สถิติ	18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	19
4.1 การสกัดพืช	19
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	19
4.2.1 FRAP assay	19
4.2.2 DPPH assay	20
4.2.3 ผลจากการศึกษา DPPH assay ในงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	22
4.2.4 Nitric oxide radical scavenging	23
4.2.5 ผลจากการศึกษา nitric oxide radical scavenging ในงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	24
4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)	27
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของการศึกษาจากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	28
4.5 การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล (scratching assay)	29
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	33
ข้อเสนอแนะ	33
บรรณานุกรม	34

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงกระบวนการสมานแผล	10
ตารางที่ 2	แสดงน้ำหนักตัวอย่างพืชและผลการสกัด	19
ตารางที่ 3	แสดงค่า TEAC ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ DPPH assay พร้อมทั้งแสดงค่า %inhibition และ IC_{50} ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay และ Nitric oxide radical scavenging (NO) ของสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสำโรง	26

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปภาพที่ 1	กระบวนการสमानผลผ่านวิถีของ NF-kB	8
รูปภาพที่ 2	ลักษณะผลมะกอกเกลื้อน, ผลและเมล็ดมะกอกเกลื้อน, ใบมะกอกเกลื้อน	11
รูปภาพที่ 3	แสดงผลของ Cs-ME ต่อการผลิต NO ในมาโครฟาจ (A และ B) ระดับของการผลิต NO ในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และมาโครฟาจในช่องท้อง ซึ่งกระตุ้นด้วย LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แบบทั้งที่มีและไม่มี Cs-ME ศึกษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดโดย Griess assay	12
รูปภาพที่ 4	ลักษณะผลและใบสำโรง, ต้นสำโรง, ผลสำโรง	13
รูปภาพที่ 5	แสดงกราฟสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดสำโรงแสดงการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับ ascorbic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	14
รูปภาพที่ 6	แสดงกราฟมาตรฐาน Trolox วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	20
รูปภาพที่ 7	แสดงกราฟมาตรฐาน Trolox วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	21
รูปภาพที่ 8	แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื้อน (CS) และสำโรง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean + SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (* p<0.05, ***p<0.001)	21
รูปภาพที่ 9	แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื้อนด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์ (b) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสำโรงด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์	22
รูปภาพที่ 10	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื้อน (CS) และสำโรง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี nitric oxide radical scavenging ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ (*p<0.05, **p<0.01 และ ***p<0.001)	23
รูปภาพที่ 11	แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื้อนด้วยวิธี nitric oxide radical scavenging ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์ (b) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสำโรงด้วยวิธี nitric oxide radical scavenging ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์	24

รูปภาพที่ 12	แสดงกราฟ %Viability ที่ 24 ชั่วโมง ของมะกอกเกลื้อน (CS) และสำโรง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ	27
รูปภาพที่ 13	แสดงกราฟ %Viability ที่ 48 ชั่วโมง ของมะกอกเกลื้อน (CS) และสำโรง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ	28
รูปภาพที่ 14	แสดงจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์เมื่อได้รับสารสกัดเมทานอลมะกอกเกลื้อน	29
รูปภาพที่ 15	แสดงจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ normal osteoblast เมื่อได้รับสารสกัดเมล็ดสำโรงเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง โดยวัดระยะห่างด้วยโปรแกรม image J	29
รูปภาพที่ 16	แสดงระยะห่างของเซลล์เยื่อบุไตลิง (Vero) ภายหลังจากทำ scratching และเติมสารสกัดมะกอกเกลื้อน (CS) และสารสกัดสำโรง (SF) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยถ่ายภาพ ณ เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง	31
รูปภาพที่ 17	แสดงระยะห่างของเซลล์เยื่อบุไตลิง (Vero) ภายหลังจากทำ scratching และเติมสารสกัดมะกอกเกลื้อน (a) และสารสกัดสำโรง (b) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง	32

บทที่ 1

บทนำ

เมื่อเกิดบาดแผลร่างกายจะมีการตอบสนองและเกิดกระบวนการสมานแผลขึ้น ระยะเวลาในการซ่อมแซมบาดแผลขึ้นกับขนาดและความรุนแรงของบาดแผล การรักษาบาดแผลเป็นกระบวนการที่น่าสนใจและมีความสำคัญสำหรับการดำรงชีวิตของมนุษย์ ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ค้นหาสารจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการสมานแผล เนื่องจากพืชสมุนไพรมีส่วนประกอบทางเคมีหลายชนิด และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการที่สามารถนำมาใช้ในการช่วยให้บาดแผลสมานตัวได้เร็วมากขึ้น

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

บาดแผล (Wound) หมายถึง การบาดเจ็บทุกชนิดที่ก่อให้เกิดการเสียหายของผิวหนัง หรือเยื่อส่วนอื่น ๆ ของร่างกายรวมทั้งการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นแก่เนื้อเยื่อที่อยู่ส่วนล่างลงไปจากผิวหนังหรือเยื่อ โดยบาดแผลส่วนใหญ่สามารถหายได้เองตามธรรมชาติ แต่หากแผลนั้นมีการบาดเจ็บรุนแรงอาจต้องอาศัยระยะเวลาที่นานขึ้น กระบวนการสมานแผลที่สมบูรณ์จะสามารถป้องกันการเกิดรอยแผลเป็นได้ กระบวนการสมานแผลประกอบด้วย 4 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 hemostasis เป็นระยะที่เกิดขึ้นทันทีหลังได้รับบาดเจ็บเพื่อห้ามเลือดและลดการสูญเสียเลือด ระยะที่ 2 inflammation เป็นระยะที่มีการกำจัดเชื้อและเศษของเซลล์ออก และเริ่มมีการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ระยะที่ 3 proliferation เป็นระยะที่เนื้อเยื่อมีการเพิ่มจำนวน นำไปสู่การสมานแผล และระยะที่ 4 remodeling เป็นระยะที่มีการหดของแผล และการปรับเปลี่ยนของคอลลาเจนเพื่อให้มีสภาวะใกล้เคียงเนื้อเยื่อปกติ⁽¹⁾ โดยกระบวนการสมานแผลนั้นผ่านกลไกของ NF- κ B transcription factors^(1, 2) ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในระยะ inflammation ของการสมานแผลจากการสร้างสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) และ Vascular endothelial growth factor (VEGF) ที่ใช้ในการสร้างหลอดเลือดใหม่⁽³⁾ โดยพบว่าสารประกอบธรรมชาติจากพืชที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และต้านจุลชีพ (antimicrobial) สามารถสมานแผลได้เร็วขึ้นจากการยับยั้งการอักเสบผ่านการ inactivation NF- κ B pathway^(2, 4, 5)

ภูมิปัญญาของไทยมีการใช้พืชสมุนไพรเพื่อรักษาบาดแผล เช่น ว่านหางจระเข้ ใบบัวบก และสาบเสือ เป็นต้น⁽⁶⁻⁸⁾ นอกจากนี้พบว่า มะกอกเกลื้อน (*Canarium subulatum* Guillaumin) วงศ์ BURSERACEAE และสำโรง (*Sterculia foetida* L.) วงศ์ STERCULIACEAE มีรายงานฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) และต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)⁽⁹⁻¹²⁾ โดยพืชเหล่านี้มีข้อมูลการใช้ทางด้านอายุรเวทตามภูมิปัญญาท้องถิ่น เช่น มะกอกเกลื้อน มีสารสำคัญ คือ เคอเซทิน ลูทีโอลิน และแคมป์เฟอร์อล โดยมีการนำส่วนของยางมาใช้เพื่อบรรเทาอาการคันจากผื่น⁽¹⁵⁾ ปกป้องความเป็นพิษต่อตับ ป้องกันโรคเบาหวาน และต้านอนุมูลอิสระ^(16, 17)

และลำโพงถูกนำมาใช้ในการต้านการอักเสบและระงับอาการปวด ใบและเปลือกต้นมักนำมาใช้ในการขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ และใช้เป็นยาระบาย นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โรคอ้วน โรคหนองใน อากาโรบวม และโรคผิวหนัง มีสารสำคัญ คือ อัลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์, เทอร์ปีนอยด์, ฟีนอล และสเตียรอยด์ อีกทั้งสารสกัดเอทานอลของเมล็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง⁽¹³⁾ จากการศึกษาของ Choi E et al., 2019 พบว่ามะกอกเกลื้อนมีกลไกระดับโมเลกุลในการต้านการอักเสบและการต้านอนุมูลอิสระซึ่งผ่านกลไกเดียวกันกับกลไกการสลายแฟลค คือ NF-kB pathway ส่วนลำโพงนั้นมีกลไกที่ผ่าน NF-kB pathway ในการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแสดงออกของ adhesion molecule ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง (cancer metastasis)⁽¹³⁾ ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาฤทธิ์ในการสลายแฟลคของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลของมะกอกเกลื้อน และลำโพง โดยใช้ Vero epithelial cell line จากไตลิง

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์สลายแฟลคของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลของมะกอกเกลื้อน และลำโพง ในเซลล์เยื่อไตลิง (Vero)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

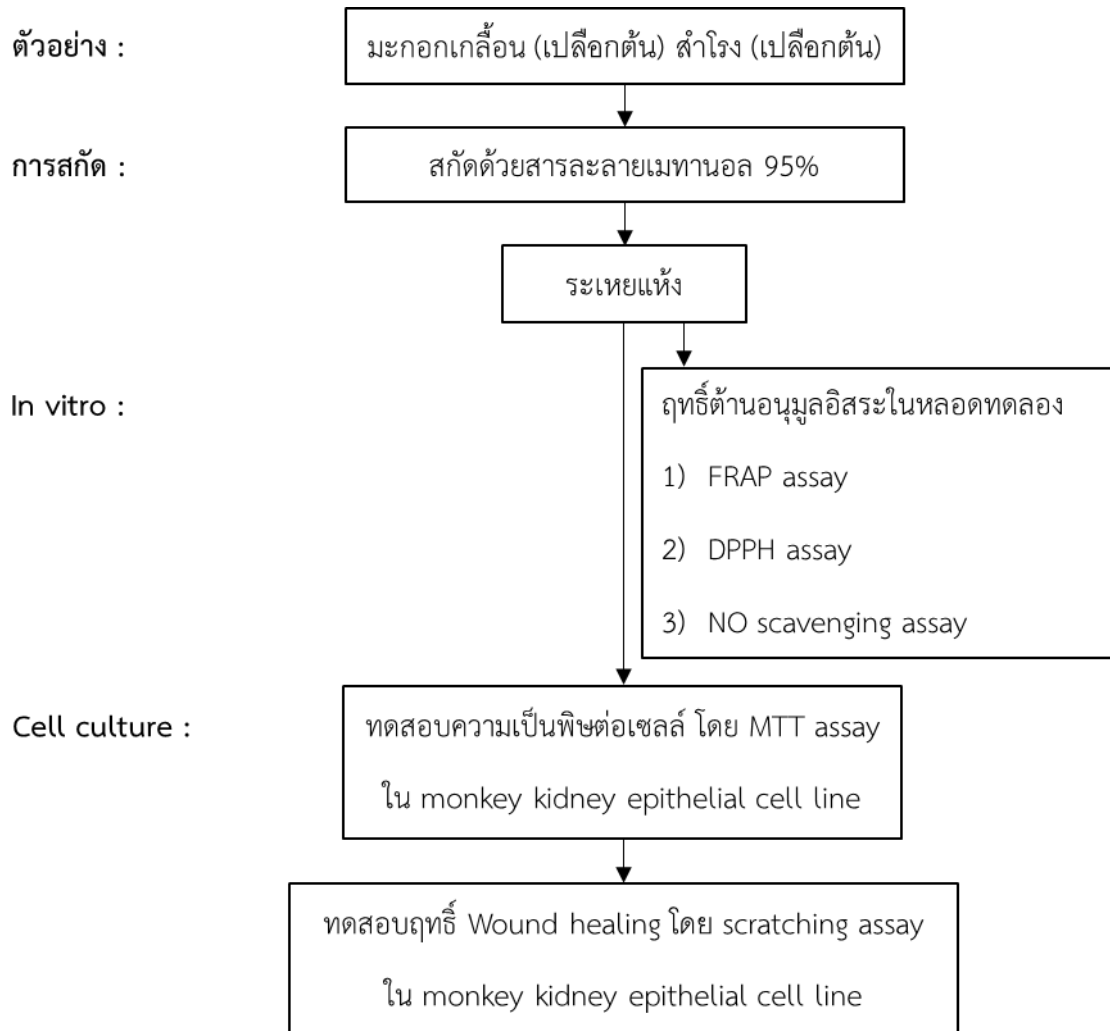
1. ทราบฤทธิ์ของมะกอกเกลื้อน และลำโพงในการสลายแฟลค ในระดับเซลล์
2. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการพัฒนาสูตรตำรับยาสลายแฟลคที่มีส่วนผสมของสารสกัดมะกอกเกลื้อน หรือลำโพง

1.4 กรอบแนวคิด

การศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์การสลายแฟลคเบื้องต้นในเซลล์เยื่อไตลิง (Vero) ของสารสกัดมะกอกเกลื้อน และลำโพง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)
 - 1.1 เซลล์เยื่อไตลิง (African green monkey kidney cell line, Vero)
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง
 - 2.1 FRAP assay
 - 2.2 DPPH assay
 - 2.3 NO scavenging assay
3. การทดสอบฤทธิ์สลายแฟลคในเซลล์เพาะเลี้ยง
 - 3.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย MTT assay

3.2 การทดสอบฤทธิ์สมานแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (in vitro wound healing model) โดย scratching assay



1.5 แผนการปฏิบัติงาน

รายละเอียด	2564						2565			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
1. ทบทวนวรรณกรรม	✓	✓	✓							
2. จัดทำเค้าโครงงานวิจัย		✓	✓	✓						
3. สอบเค้าโครงงานวิจัย					✓					
4. ฝึกทักษะการเลี้ยงเซลล์					✓	✓				
5. MTT assay						✓	✓			
6. Scratching assay							✓	✓	✓	
7. วิเคราะห์และแปลผล					✓	✓	✓	✓	✓	
8. จัดทำรูปเล่มรายงานฉบับสมบูรณ์									✓	
9. สอบป้องกันโครงงานวิจัย										✓

1.6 งบประมาณค่าใช้จ่าย

หมวด	งบประมาณ
1. งบดำเนินการ: ค่าวัสดุอุปกรณ์ - ค่าสารเคมีและวัสดุการทดลอง : ค่าสารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเซลล์, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA, sterile water for injection, PBS buffer, 95% methanol, trypan blue, round bottom 96-well plate, culture dish (60 mm, 100 mm), micro centrifuge tubes, culture 24-, 48-well plates, pipette tips, falcon tubes (25, 50 ml), กระจกขาว autoclave : ค่าสารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ MTT solution, isopropanol	8,500
2. งบดำเนินการ: ค่าใช้สอย - ค่าใช้จ่ายในการเผยแพร่ผลงาน ได้แก่ จัดทำโปสเตอร์	500

- ค่าจ้างเหมาจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์ ได้แก่ ค่าถ่ายเอกสาร ค่าเช่าเล่ม ค่ากระดาษ	
รวม	9,000 (เก้าพันบาทถ้วน)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ในการศึกษาโครงการวิจัย การศึกษาพืชที่มีฤทธิ์ด้านอักเสบเพื่อทดสอบฤทธิ์การสมานแผลจำเป็นต้องมีการทบทวนวรรณกรรมของพืชสมุนไพรมะกอกเกลื้อน และสำโรง รวมถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชนั้น ๆ และกระบวนการสมานแผล ดังนี้

2.1 การสมานแผล

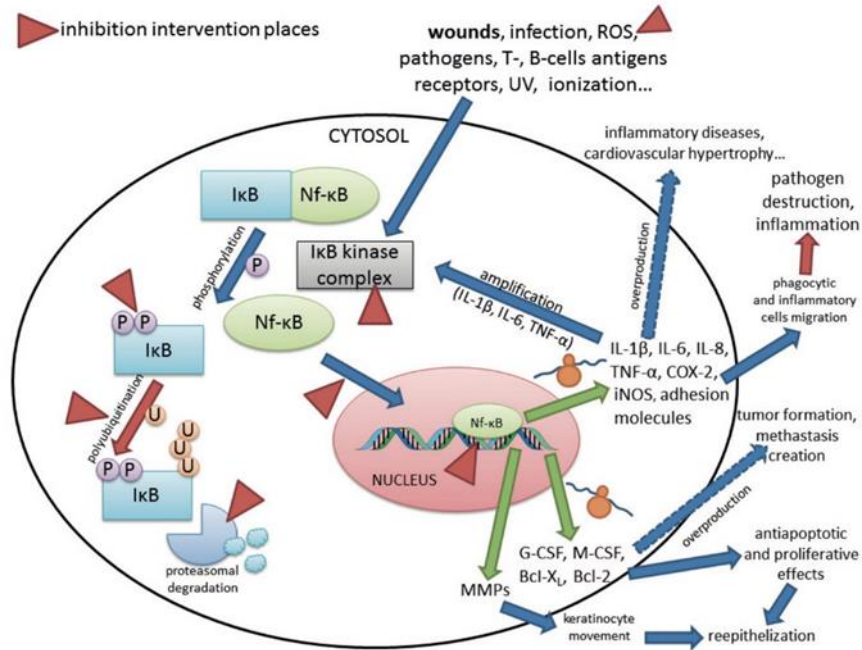
2.1.1 กระบวนการสมานแผล

กระบวนการสมานแผลถือว่าเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับหลายกลไกทั้งทางระบบชีวภาพและภูมิคุ้มกันของร่างกาย กระบวนการสมานแผลมีทั้งหมด 4 ระยะ ได้แก่ hemostasis, inflammation, proliferation และ remodeling โดยระยะแรก คือ hemostasis เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นทันทีหลังจากเกิดบาดแผล หลอดเลือดมีการหดตัวเพื่อลดการสูญเสียเลือด เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด และมีการสร้างไฟบรินเพื่อห้ามเลือด ระยะที่สอง คือ inflammation เป็นระยะที่มีโมเลกุลในระบบภูมิคุ้มกันมาเกี่ยวข้อง เช่น นิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์ มีบทบาทในการกำจัดเชื้อและเศษซากของเซลล์ ส่วนมาโครฟาจมีบทบาทโดยช่วงแรกเป็นการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบและกำจัดเซลล์ที่ตายแล้ว ช่วงต่อมาเป็นการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ไปกระตุ้น เคอราติโนไซต์ ไฟโบรบลาสต์ และการสร้างหลอดเลือด เพื่อกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ระยะที่สาม คือ proliferation เป็นระยะที่เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และมีไฟโบรบลาสต์ที่ช่วยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือด คอลลาเจน และเนื้อเยื่อแกรนูล และระยะที่สี่ คือ remodeling เป็นระยะที่มีการลดความหนาแน่นของหลอดเลือดที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ ทำให้ความหนาแน่นของหลอดเลือดบริเวณที่เกิดบาดแผลกลับสู่ภาวะปกติ โดยลักษณะสำคัญของระยะนี้ คือ การจัดเรียงรูปแบบของ extracellular matrix เพื่อให้มีสภาวะใกล้เคียงเนื้อเยื่อปกติ อย่างไรก็ตามกระบวนการสมานแผลของระยะ inflammation, proliferation และ remodeling มีโมเลกุลที่เกี่ยวข้องที่สามารถใช้เป็น marker ในการติดตามกระบวนการต่าง ๆ และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าหนึ่งในวิถีที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสมานแผล คือ วิถีของ NF- κ B transcription factors ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการอักเสบของเซลล์ การเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่

(1) ดังแสดงในตารางที่ 1

2.1.2 วิธี Nuclear factor kappa-B (NF- κ B)

NF- κ B เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบและการตอบสนองภาวะเครียดออกซิเดชัน รวมถึง differentiation, proliferation, apoptosis และ cell adhesion โดยโปรตีน NF- κ B จะถูกเก็บในไซโทพลาสซึม และจับกับโปรตีน inhibitor of κ B (I κ B) ทำให้ NF- κ B ถูกยับยั้งไม่ให้เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ในสถานะที่ถูกกระตุ้น I κ B จะถูกทำลาย จากนั้น NF- κ B จะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส นำไปสู่การสร้าง cytokine, chemokine, adhesion molecules, เอนไซม์ที่ผลิตสารสื่อกลางการอักเสบครั้งที่สอง (secondary inflammatory mediators), แอนติเจน major histocompatibility complex class II และการยับยั้ง apoptosis ดังแสดงในรูปภาพที่ 1 โดยปัจจัยต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น IL-1 β , IL-6, IL-8, vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, inducible NO-synthase และ cyclooxygenase-2 ล้วนมีความสำคัญในการตอบสนองการป้องกันต่อเชื้อโรคในชั้นต้น และยังจำเป็นต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ฟาโกไซต์และเซลล์อักเสบที่ไปสู่เนื้อเยื่อ ในทางกลับกัน ความผิดปกติในการควบคุม NF- κ B โดยเฉพาะการกระตุ้นที่มากเกินไป (up-regulation) สามารถทำให้เกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เนื่องด้วย NF- κ B ควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation), การส่งถ่ายดีเอ็นเอ (transformation) และการอยู่รอดของเซลล์ (Bcl-XL, Bcl-2) โดยผลการ anti-apoptotic และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferative) ของการอยู่รอดของเซลล์ สามารถกระตุ้นการสร้างเนื้องอกและการแพร่กระจายของมะเร็ง ซึ่งในระหว่างสมานแผล ผลของการเพิ่มจำนวนเซลล์จะทำให้เกิดการสร้างเยื่อใหม่ (re-epithelization) จากการไปควบคุมการเพิ่มจำนวน และการเคลื่อนที่ของเซลล์เคอราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์ นอกจากนี้ NF- κ B ยังควบคุมการแสดงออกของ matrix metalloproteinases ที่ช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์เคอราติโนไซต์ การควบคุมการหลั่ง และความคงตัวของไซโตไคน์และโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) ในการสมานแผลที่ผิวหนัง⁽¹⁾ นอกจากนี้ ไฟโบรบลาสต์ยังมีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผ่านการสังเคราะห์คอลลาเจนและสร้างไฟโบรเนคติน



รูปภาพที่ 1 กระบวนการสแกนผ่านผ่านวิถีของ NF-κB⁽¹⁾

2.1.3 พืชหรือสารชนิดอื่นที่มีฤทธิ์สมานแผล

ปัจจุบันนี้ยังมีการนำพืชหรือสารสกัดจากพืชมาใช้ในการสมานแผลมักพบได้ตามชนบทท้องถิ่น หรือภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีการสืบทอดกันมา

Commiphora africana (A. Rich.) Engl. เป็นพืชวงศ์ BURSERACEAE มีสารสำคัญ ได้แก่ พาราควมาริกเอซิด เฟอรูลิกเอซิด ไอโซเคอซิทีน เคอซิทีน รุทีน แคมป์เฟอร์อล และอะพิจินีน สรรพคุณใช้ทั่วไป ได้แก่ รักษาเมะเร็ง มาลาเรีย ต้านอักเสบ และสมานแผล⁽²¹⁾

Waltheria douradinha St Hil. เป็นพืชวงศ์ STERCULIACEAE มีสารสำคัญ ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ ฟลาโวนอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ สรรพคุณที่ใช้ทั่วไป คือ รักษาบาดแผล⁽²²⁾

พืชที่มีฤทธิ์สมานแผลเหล่านี้ส่วนมากไม่สามารถพบได้ในประเทศไทย แต่ยังมีพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน และมีสารสำคัญที่คล้ายกันที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทยที่คาดว่าจะมีฤทธิ์สมานแผลได้เช่นกัน ได้แก่ มะกอกเกลื้อน (*Canarium subulatum* Guillaumin) วงศ์ BURSERACEAE และ สำโรง (*Sterculia foetida* L.) วงศ์ STERCULIACEAE

2.2 กลไก NF- κ B ในพืชสมุนไพรตัวอย่าง

2.2.1 มะกอกเกลื้อน

สารสกัดเมทานอลของมะกอกเกลื้อนทำให้เกิดการยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของ IKB α , IKK α/β , Src และ Syk ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งวิถี NF- κ B เช่นกัน⁽¹⁰⁾

2.2.2 สำโรง

สารสกัด sterculic acid (SA) จากเมล็ดสำโรง มีผลลดระดับ 7KCh-induced IL-6 ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเนื้องอกและ epithelial-mesenchymal (EMT) ผ่านการส่งสัญญาณของ STAT3 ในเซลล์จอประสาทตา โดยสัมพันธ์กับวิถี NF- κ B ซึ่งจะไปลดระดับ IL-6 ลดการเคลื่อนที่ของเซลล์ ลดการรุกรานของเซลล์ และเปลี่ยนแปลง EMT marker สุดท้ายจึงมีผลในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ควบคุม cell adhesion, สารประกอบ extracellular matrix (ECM) และ ECM remodeling⁽¹³⁾

ตารางที่ 1 กระบวนการสมานแผล ปรับปรุงข้อมูลจาก Ambrozova และคณะ⁽¹⁾

ระยะ	กระบวนการที่เกิดขึ้น	โมเลกุลที่เกี่ยวข้องที่สามารถใช้เป็น marker
hemostasis	หลอดเลือดหดตัว	-
	เกล็ดเลือดรวมตัวและเกิดลิ่มเลือด	-
inflammation	กระบวนการอักเสบ	IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, NF-kB, Nrf2, MMP-2, HGF, PDGF, TGF- β , TNF- α
	เซลล์เคลื่อนที่เข้าหากัน	EGF, HGF, KGFs, NF-kB, NGF β
	การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์	IL-10, EGF, FGFs, TGF- β
	เซลล์ภูมิคุ้มกันตอบสนอง	IL-10, IL-10, IL-27, PDGF, TGF- β , G-CSF, TNF- α
proliferation	การเพิ่มจำนวนของเซลล์	IL-1, IL-10, EGF, FGFs, IGF-1, KGFs, NF-kB, NGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , G-CSF, GM-CSF, TNF- α
	การสร้างเยื่อใหม่	IL-1, IL-6, EGF, FGFs, HGF, NF-kB, PDGF, TGF- α , TGF- β 1
	การสร้างหลอดเลือดใหม่	IL-1, IL-6, MMP-2, FGFs, HGF, TGF- β , VEGF
	การสร้างคอลลาเจน และ extracellular matrix	IL-4, IL-27, IGF-1, PDGF, TGF- β
	การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูโล	EGF, FGFs, HGF, TGF- α , TGF- β
remodeling	การจัดเรียงรูปแบบของคอลลาเจน และ extracellular matrix	IL-1, IL-6, MMPs, TIMPs, PDGF, TGF- β
	การยึดติดของบาดแผล	IL-8, IL-10, FGFs, NGF, TGF- β
	การเกิดแผลเป็น (fibrosis)	MMP-2, MMP-9, TIMP-1

2.3 พืชสมุนไพรมะกอกเกลื่อน

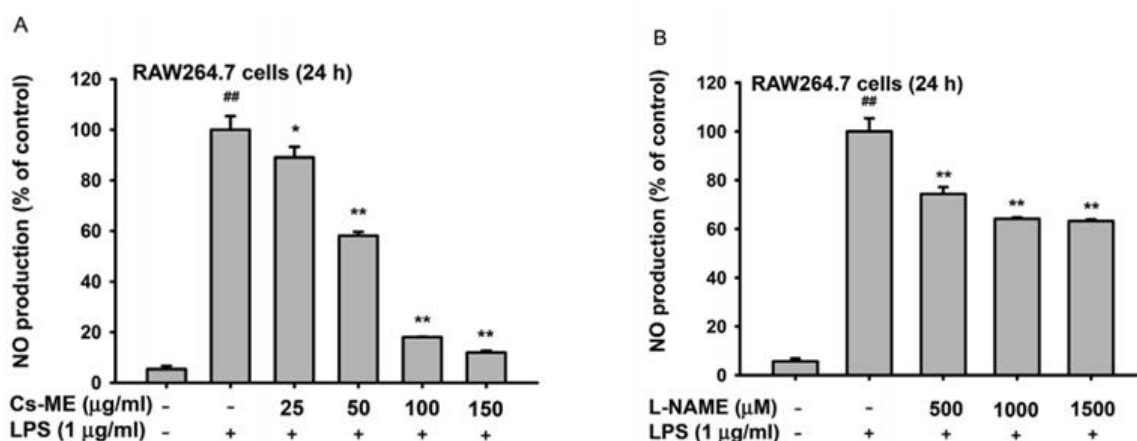
ชื่อทั่วไป	มะกอกเกลื่อน
ชื่อท้องถิ่น	กอกกัน มะกอกเกลื่อน มะเลื่อม มะกอกเลือด โมกเลื่อม มะเกิ้ม บักเหลียม มะเหลียม มะเหลียมหิน
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Canarium subulatum</i> Guillaumin
วงศ์	BURSERACEAE



รูปภาพที่ 2 ผลมะกอกเกลื่อน⁽²⁶⁾ (ซ้าย) ผลและเมล็ดมะกอกเกลื่อน⁽²⁷⁾ (กลาง) ใบมะกอกเกลื่อน (ขวา)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ไม้ยืนต้น สูง 10-15 เมตร เปลือกสีน้ำตาล เมื่อสัมผัสจะมีกลิ่นหอม และมียางสีขาว ตามกิ่งมีแผลจากก้านใบเห็นเด่นชัด ใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อย 2-5 คู่ มีตั้งแต่รูปค่อนข้างกว้าง จนกระทั่งรูปหอกกว้าง 3.5-11 เซนติเมตร ยาว 9-18 เซนติเมตร ด้านบนมีขนประปราย ที่เส้นกลางใบและขอบใบ ด้านล่างมีขนสั้น ๆ ส่วนโคนใบของใบย่อยคู่ล่างสุดไม่เบี้ยว โคนใบย่อยคู่อื่นมักเบี้ยว ขอบใบหยักแบบซี่เลื่อยตื้น ๆ มีขนเป็นกระจุกเล็ก ๆ ตามรอยหยัก เส้นใบขนเด่นชัดทางด้านล่าง ดอกออกเป็นช่อตามง่ามใบ ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ช่อดอกเพศผู้ยาว 7-11 มิลลิเมตร มีขนทั่วไป กลีบรองของกลีบดอกเชื่อมกันเป็นรูปถ้วยยาว 2.5-3.5 มิลลิเมตร ขอบหยัก เกสรผู้ 6 อัน ในดอกเพศเมีย เกสรผู้มีขนาดเล็ก ช่อผล ช่อหนึ่ง ๆ มักมีเพียง 1-4 ผล ผลรูปไข่หรือค่อนข้างกลม กว้าง 1.5-2 เซนติเมตร ยาว 2.7-3.5 เซนติเมตร มีกลีบรองกลีบดอกรูปถ้วยเล็ก ๆ เชื่อมติดอยู่กับก้านช่อดอก

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้านการต้านอักเสบมีรายงานผลของสารสกัดมะกอกเกลือด้วยเมทานอล (Cs-ME) ที่ศึกษาในเซลล์มาโครฟาจของ (RAW264.7) มีผลลดระดับไนตริกออกไซด์ (NO) การสร้างโปรตีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ interleukin-6 (IL-6) แบบขึ้นกับขนาดของสารดังรูปภาพที่ 3 พร้อมทั้งยับยั้ง MyD88 และ NF- κ B โดยการยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของ IKK α , IKK α/β , Src และ Syk ผลจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่ามะกอกเกลือมีสารเคอเซทิน ลูทีโอลิน และ แคมป์เฟอร์อล ที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ⁽¹⁰⁾

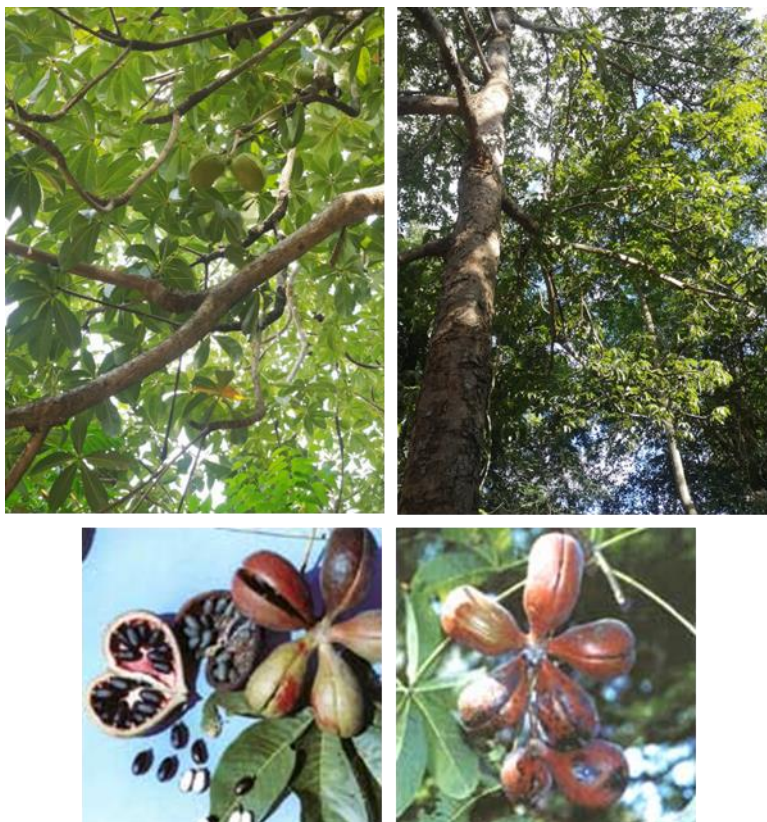


รูปภาพที่ 3 ผลของ Cs-ME ต่อการผลิต NO ในมาโครฟาจ (A และ B) ระดับของการผลิต NO ในเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS (กราฟด้านซ้าย) และมาโครฟาจในช่องท้อง (กราฟด้านขวา) ซึ่งกระตุ้นด้วย LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แบบทั้งที่มีและไม่มี Cs-ME ศึกษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดโดย Griess assay⁽¹⁰⁾

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้านการต้านอนุมูลอิสระมีรายงานว่าสารสกัดมะกอกเกลือด้วยเมทานอล (Cs-ME) สามารถยับยั้งการสร้าง reactive oxygen species (ROS) จากรังสี UV ใน HaCaT cell ได้ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ ABTS) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์จาก H₂O₂ ดังนั้นสามารถกล่าวโดยรวมได้ว่า Cs-ME มีคุณสมบัติปกป้องเซลล์ (cytoprotective) และชะลอวัยของผิว (anti-aging) ได้⁽⁹⁾

2.4 พืชสมุนไพรสำโรง

ชื่อทั่วไป	สำโรง
ชื่อท้องถิ่น	จำมะโอง มะโรง มะโหรัง โหมโรง
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Sterculia foetida</i> L.
วงศ์	MALVACEAE

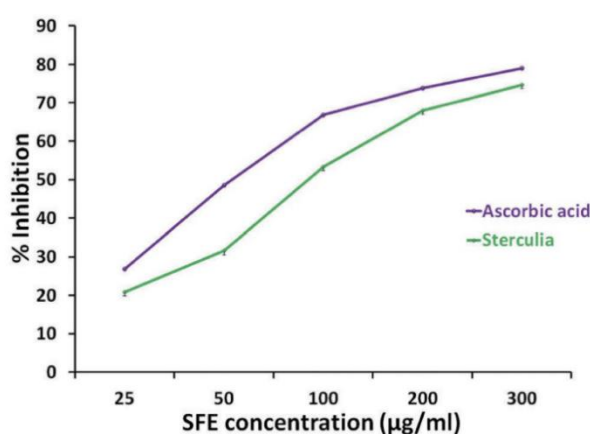


รูปภาพที่ 4 ผลและใบสำโรง (บนซ้าย) ต้นสำโรง (บนขวา) ผลสำโรง (ล่างซ้าย)⁽²⁸⁾ ผลสำโรง (ล่างขวา)⁽²⁸⁾

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ผลัดใบ ที่มีความสูงของต้นประมาณ 15-20 เมตร และอาจสูงได้ถึง 30 เมตร ลำต้นตั้งตรงและสูงชะลูด เรือนยอดเป็นรูปไข่ถึงทรงกระบอก ทรงพุ่มโปร่งไม่ทึบ กิ่งก้านแตกแขนงในลักษณะตั้งฉากกับลำต้นและแผ่กว้างออกไปรอบ ๆ ต้น และการแตกกิ่งก้านจะออกเป็นระยะ ๆ ทำให้เห็นทรงพุ่มเป็นชั้น ๆ ดอกคล้ายฉัตร และในแต่ละชั้นจะมีระยะห่างใกล้เคียงกัน และจะแตกกิ่งก้านที่ระดับความสูงตั้งแต่ 8-10 เมตร เปลือกลำต้นค่อนข้างเรียบและค่อนข้างหนาและเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาลปนเทา ปรากฏร่องรอยแผลเป็นของก้านใบที่หลุดลอกรอบต้นอย่างชัดเจน และมีลักษณะเป็นเส้นใยหยาบ ๆ สีน้ำตาล ส่วนโคนต้นแก่แตกเป็นพุ่มขนาดเล็กน้อย เนื้อไม้หยาบและเป็นไม้เนื้ออ่อนค่อนข้างเหนียว ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ในประเทศไทยพบต้นสำโรงกระจายพันธุ์อยู่ตามป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง และตามป่าโปร่งทั่วไป

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้านการต้านอักเสบของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกของลำโรง (MESF) ใช้ศึกษาใน human Red Blood Cells (HRBCs) membrane แล้วทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอักเสบกับยา diclofenac sodium 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากลำโรงที่แตกต่างกันดังนี้ 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการศึกษาขั้นต้นพบว่าสารสกัดลดการแตกของ HRBCs membrane แบบขึ้นกับความเข้มข้น โดยฤทธิ์การต้านอักเสบนี้คาดว่ามาจากการที่สารสกัด MESF มีสารอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ และเทอร์ปีนอยด์⁽²⁹⁾

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเมล็ดลำโรง (SFE) ด้วยวิธี free radical scavenging method (DPPH) พบว่า SFE มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบขึ้นกับความเข้มข้น ที่ IC_{50} เท่ากับ 73.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร⁽³⁰⁾



รูปภาพที่ 5 สารสกัดเอทานอลจากเมล็ดลำโรงแสดงการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับ ascorbic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร⁽³⁰⁾

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้านการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Adhesion molecules และสารประกอบ extracellular matrix ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด โดยใช้สารสกัด sterculic acid (SA) จากเมล็ดลำโรง ทำการทดลองในเซลล์ A549 และ H1299 พบว่า SA ที่ขนาดสูง จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ tumor cell แต่ SA ในขนาดต่ำเหนี่ยวนำให้เกิดการลดลงของ cell adhesion-migration capacity ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ integrins และสารประกอบ extracellular matrix⁽¹³⁾

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชและการสกัด

เปลือกต้นลำโรง และเปลือกต้นมะกอกเกลื้อน ทำการเก็บจากป่าชุมชนบ้านโสกนาค จ.ขอนแก่น ช่วงเดือนกรกฎาคม 2564 จากนั้นทำให้ตัวอย่างที่ได้มาแห้งด้วยเครื่อง hot air oven (KENTON KH-100A) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ติดต่อกันนาน 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่แห้งไปปั่นด้วยเครื่องปั่นพืชให้ละเอียด จากนั้นสกัดด้วยสารละลายเมทานอล 95% และนำสารสกัดไประเหยด้วยเครื่อง evaporator อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้เป็นสารสกัดหยาบ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

3.2 เซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุไตลิง (Vero) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ชนิดมีกลูโคสสูง เติมน้ำ 10% fetal bovine serum (FBS) antibiotics ความเข้มข้น 1% (Penicillin/Streptomycin 1,000 ยูนิต/มิลลิลิตร) กรดอะมิโนไม่จำเป็น (NEAA) 1% และ L-glutamine 2 ไมโครโมลาร์ บ่มเซลล์ในตู้บ่มควบคุมความชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะควบคุม 5% CO₂

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.3.1 FRAP assay

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) ใช้หลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระให้กับสารประกอบเชิงซ้อน Fe³⁺-TPTZ เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบ Fe²⁺-TPTZ ซึ่งจะเปลี่ยนสีจากสารละลายสีเหลืองเป็นสีน้ำเงินม่วง โดยสารประกอบเชิงซ้อน Fe²⁺-TPTZ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

การวิเคราะห์นี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Csepregi K et al., 2016 โดยเตรียม FRAP reagent จาก 300 mM acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร, 10 mM 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ใน 40 mM HCl ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ 20 mM ferric chloride ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์โดยปิเปตสารสกัดมะกอกเกลื้อนและลำโรงที่ละลายใน DI water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 0, 0.125, 0.25, 1.25, 2.5, 12.5 และ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมกับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง

จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (FLUOstar Omega) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถคำนวณเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของ Trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม

3.3.2 DPPH assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีฟิพีเอช (diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบโดยใช้สารที่มีสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียร มีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515-520 นาโนเมตร โดยเมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอน DPPH จะกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร และทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง

การวิเคราะห์นี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Sameenoi Y., 2017 โดยเติมสารสกัดมะกอกเกลื่อนและลำโรง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 1.25 และ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเติมสารละลาย 0.15 mM DPPH ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (FLUOstar Omega) โดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน และรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการคำนวณ % inhibition ของสารสกัดเทียบกับตัวควบคุม จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100$$

และคำนวณหาค่า IC₅₀ ของสารสกัดมะกอกเกลื่อนและลำโรง

3.3.3 Nitric oxide radical scavenging

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ เมื่อไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับ Griess Reagent จะได้สารประกอบที่มีสีที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น⁽³³⁾

การวิเคราะห์นี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jing L et al., 2015 โดยเติม 10 mM sodium nitroprusside ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารสกัดมะกอกเกลือและสำโรง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 0, 0.125, 0.25, 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0, 0.25, 0.5, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงใน 96-well plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Griess reagent (2% sulfanilamide in 4% phosphoric acid และ 0.2% naphthylethylenediamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100$$

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยอาศัยหลักการเมทาบอลิซึมของเอนไซม์ oxidoreductase ในไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์ tetrazolium dye MTT ให้กลายเป็น insoluble formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เพาะเซลล์เยื่อบุไตลิง (Vero) ปริมาณ 100,000 เซลล์/มิลลิลิตร โดยใช้ 100 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 44 หลุม ใน 96 well plate ทั้งหมด 2 เพลต บ่มในตู้อบควบคุมความชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะควบคุม 5% CO₂ เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารที่ผสมสารสกัดพืชทดสอบ 100 ไมโครลิตร/หลุม ซึ่งเตรียมได้จากการเจือจางสารสกัดพืชเข้มข้นที่ผสมด้วย DMEM จากนั้นกรองด้วย syringe filter 0.45 ไมโครเมตร และเซลล์ในกลุ่มควบคุมจะได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผสมสารสกัดพืชทดสอบ จากนั้นนำไปบ่ม เมื่อผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดพืช เติมน้ำละลาย MTT 10 ไมโครลิตร (เข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS) ลงในเซลล์ของกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม จากนั้นบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาเติม 0.04N HCl in isopropanol 100 ไมโครลิตร ลงในกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมเพื่อละลายคริสตัลของ formazan ที่เกิดขึ้นในระหว่างการบ่ม ทำการละลายให้สมบูรณ์ด้วยมัลติแชนแนลปิเปต เมื่อละลายเสร็จนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 และ 630 นาโนเมตร คำนวณปริมาณเซลล์ที่รอด จากสูตร

$$\% \text{ Cell viability} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{Blank}})/(A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank}}) \times 100$$

3.5 การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล

เพาะเซลล์เยื่อบุไตลิง (Vero) ปริมาณ 90,000 เซลล์/มิลลิลิตร ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร/หลุม ลงหลุมเพาะเชื้อจำนวน 24 หลุม นำไปบ่มตู้ควบคุมความชื้นที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะควบคุม 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตการสร้างชั้นของ monolayer ในแต่ละหลุม เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดพืชเจือจางที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ชูดเซลล์ ด้วยปลายปิเปต 200 ไมโครลิตร ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย phosphate-buffered saline (PBS) 2 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดพืชแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลุม ถ่ายภาพแต่ละหลุมทันทีที่ทำการชูดเซลล์ และบ่มอีกครั้งเมื่อเวลาผ่านไป 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง วัดระยะห่างบาดแผลด้วย Image J software (NIH, Japan)

3.6 สถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ Independent samples t-test และ one way ANOVA โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 21 (IBM, Armonk, NY) โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.05$, $p < 0.01$ และ $p < 0.001$

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 การสกัดพืช

ในการสกัดเปลือกต้นมะกอกเกลื้อน และเปลือกต้นสำโรงด้วยตัวทำละลายเมทานอล 95% และระเหยแห้ง เปลือกต้นมะกอกเกลื้อนน้ำหนัก 4 กิโลกรัม สกัดได้สารสกัดหยาบ 5.73 กรัม คำนวณร้อยละผลผลิตได้ร้อยละ 2.86 และเปลือกต้นสำโรงน้ำหนัก 1 กิโลกรัม สกัดได้สารสกัดหยาบ 2.3 กรัม คำนวณร้อยละผลผลิตได้ร้อยละ 1.15

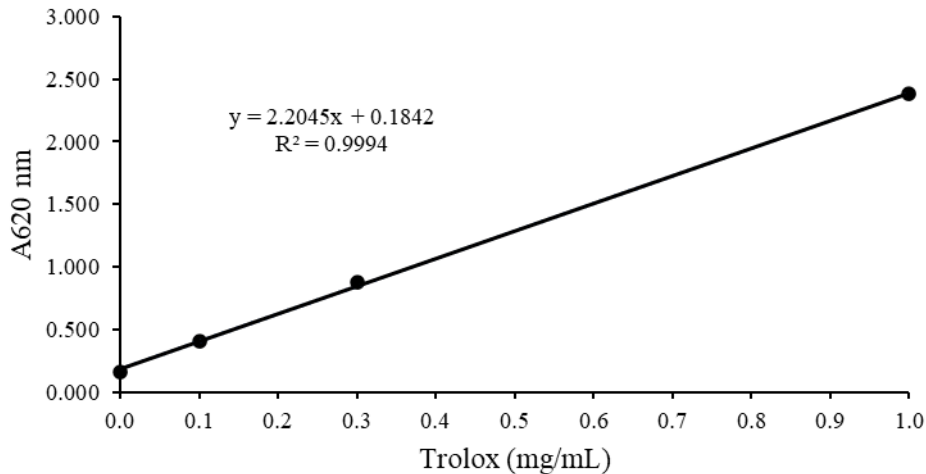
ตารางที่ 2 น้ำหนักตัวอย่างพืชและผลการสกัด

	มะกอกเกลื้อน	สำโรง
wet weight (kg)	4	1
dry weight (kg)	1.97	0.68
%yield dry weight/wet weight (%)	49.23	68.45
crude extract weight (g)	5.73	2.30
%yield crude extract/dry weight (%)	2.86	1.15

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 FRAP assay

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบโดยใช้ FRAP reagent จากนั้นปิเปตสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสำโรงลงไปใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (FLUOstar Omega) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถคำนวณเป็นค่า TEAC มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของ Trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม

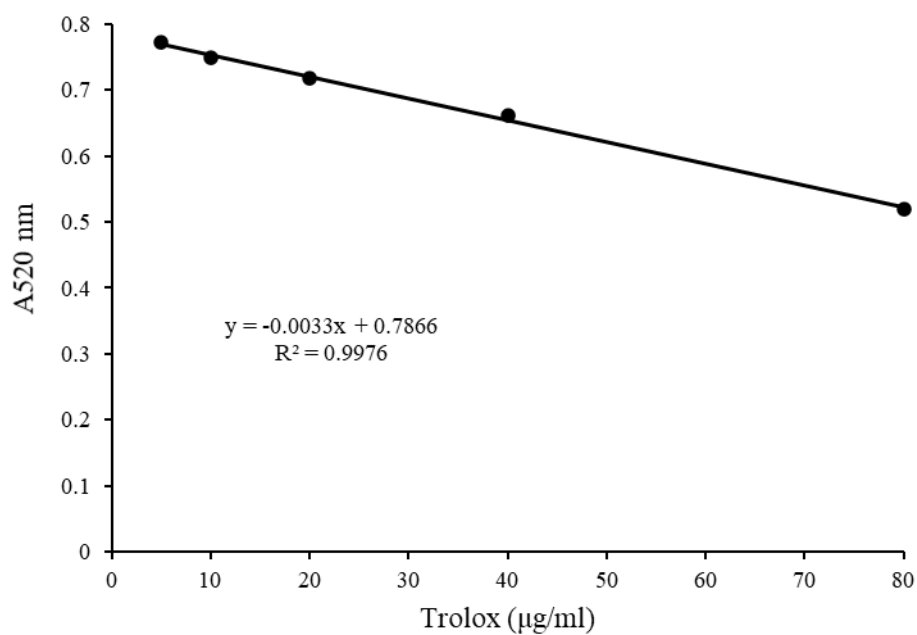


รูปภาพที่ 6 กราฟมาตรฐาน Trolox วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

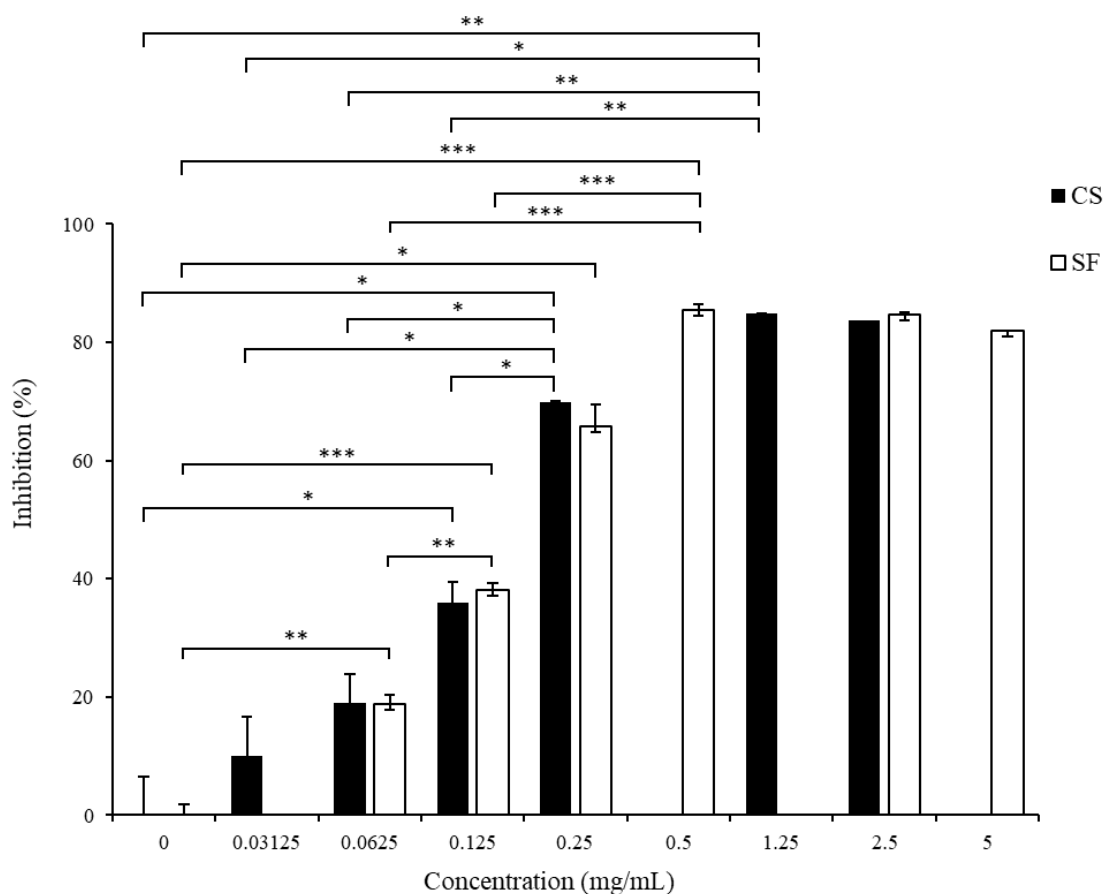
จากกราฟมาตรฐานของ Trolox พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบ FRAP ที่สมการ $y = 2.2045x + 0.1842$ เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของ Trolox และ y คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ซึ่งจะนำสมการไปใช้ในการคำนวณค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ที่วัดได้จากผลของสารละลายตัวอย่าง จะได้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะกอกเกลือและสำโรงเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox ดังตารางที่ 3 คือ สารสกัดมะกอกเกลือ มีค่า TEAC เท่ากับ 353.181 ± 6.974 และสารสกัดสำโรง มีค่า TEAC เท่ากับ 344.622 ± 11.676

4.2.2 DPPH assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ ทดสอบโดยใช้ DPPH reagent จากนั้นปิเปตสารสกัดมะกอกเกลือและสำโรงลงไปใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (FLUOstar Omega) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน รายงานฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า TEAC มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของ Trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม จากนั้นคำนวณ %inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดมะกอกเกลือและสำโรง



รูปภาพที่ 7 กราฟมาตรฐาน Trolox วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

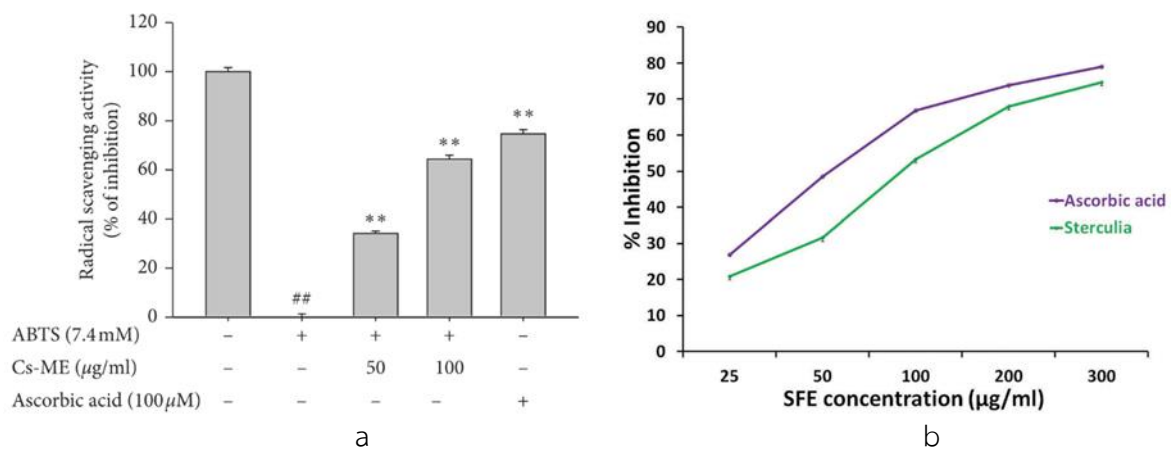


รูปภาพที่ 8ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื่อน (CS) และสำโรง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay โดยวิเคราะห์สารสกัดมะกอกเกลื้อนที่ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดสำโรงที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของทั้งสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสารสกัดสำโรงมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปภาพที่ 8

จากรูปภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของ Trolox พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Trolox กับค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบ DPPH ที่สมการ $y = -0.0033x + 0.7866$ เมื่อ x คือความเข้มข้นของ Trolox และ y คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ซึ่งจะนำสมการไปใช้ในการคำนวณค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ที่วัดได้จากผลของสารละลายตัวอย่าง จะได้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสำโรงเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox ดังตารางที่ 3 คือ สารสกัดมะกอกเกลื้อน มีค่า TEAC เท่ากับ 80.558 ± 0.121 และสารสกัดสำโรง มีค่า TEAC เท่ากับ 81.244 ± 0.252 และเมื่อคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสำโรง พบว่ามีค่า 176.377 และ 196.107 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

4.2.3 ผลจากการศึกษา DPPH assay ในงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

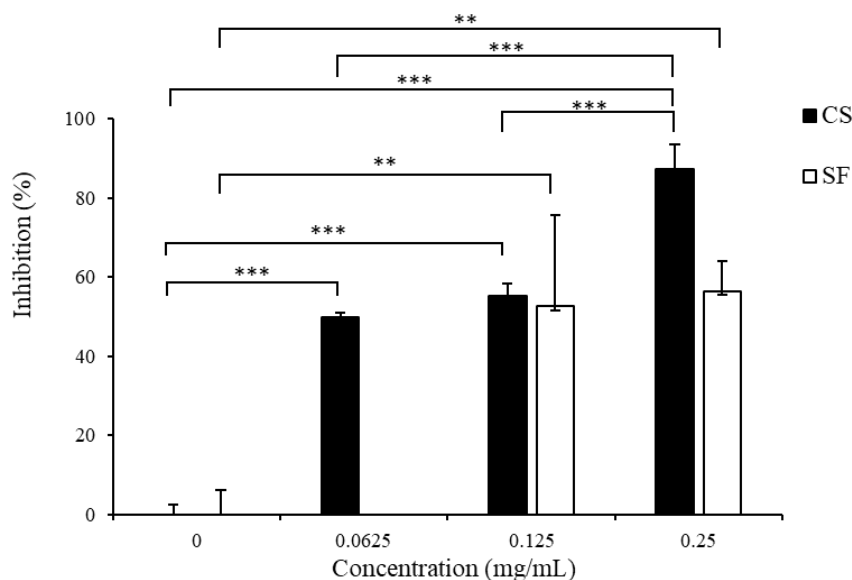


รูปภาพที่ 9 (a)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื้อนด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์⁽⁹⁾ (b) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสำโรงด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์⁽³⁰⁾

จากรูปภาพที่ 9a แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลือ โดยมียาค่า 14.8% และ 28.7% ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามะกอกเกลือมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดสอบฤทธิ์ที่มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเป็น $10.07 \pm 6.64\%$, $19.07 \pm 4.78\%$, $35.90 \pm 3.50\%$, $69.83\% \pm 0.16\%$, $84.83 \pm 0.81\%$, $83.62 \pm 0.13\%$ ที่ความเข้มข้น 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแนวโน้มเช่นเดียวกัน และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลำโพงมีค่า $18.79 \pm 1.46\%$, $38.06 \pm 1.19\%$, $65.83 \pm 3.72\%$, $85.41 \pm 0.93\%$, $84.71 \pm 0.27\%$, $82.00 \pm 1.08\%$ ที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 1.25, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วดังรูปภาพที่ 9b

4.2.4 Nitric oxide radical scavenging

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ทดสอบโดยเติม 10 mM sodium nitroprusside ใน 96 well plate จากนั้นเติมสารสกัดมะกอกเกลือและลำโพง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติม Griess reagent และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหา % inhibition

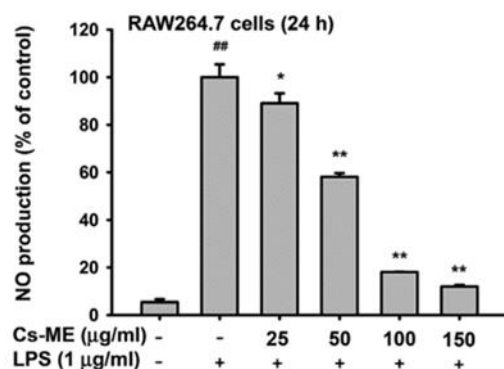


รูปภาพที่ 10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลือ (CS) และลำโพง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี nitric oxide radical scavenging ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

ผลจากการศึกษา nitric oxide radical scavenging โดยใช้ไนโตรเจนปฏิกิริยา (reactive nitrogen species; RNS) เป็นอนุมูลอิสระ เมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าออกมาเป็น %inhibition จะได้ว่าค่าของสารสกัดทั้งสองมีแนวโน้มสูงขึ้นสัมพันธ์กันกับความเข้มข้นของสารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของสารสกัดมะกอกเกลื่อนระหว่างความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยสถิติ one way ANOVA พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.0625 และ 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ และที่ความเข้มข้น 0.0625 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ ส่วนสารสกัดสำโรงที่ความเข้มข้น 0 และ 0.125, 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ และเมื่อคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดมะกอกเกลื่อนและสำโรง พบว่ามีค่า 76.469 ± 4.262 และ 196.405 ± 22.261 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าสารสกัดมะกอกเกลื่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดสำโรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

4.2.5 ผลจากการศึกษา nitric oxide radical scavenging ในงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

(a)



(b)

Extract	% Inhibition at various concentrations				
	10 μg/ml	20 μg/ml	40 μg/ml	80 μg/ml	100 μg/ml
Ascorbic acid	64.85	69.08	76.10	82.99	89.01
n-Hexane	33.41	38.81	44.22	51.27	56.62
Chloroform	38.06	46.35	56.16	62.08	67.41
Ethyl acetate	43.06	54.63	60.54	69.40	74.58
Ethanol	55.04	69.14	69.29	76.29	81.19

รูปภาพที่ 11 (a) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื่อนด้วยวิธี nitric oxide radical scavenging ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์⁽¹⁰⁾
 (b) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสำโรงด้วยวิธี nitric oxide radical scavenging ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์⁽³⁵⁾

จากรูปภาพที่ 11a แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของมะกอกเกลื้อน โดยมีการศึกษาที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบจะเห็นได้ว่ามะกอกเกลื้อนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น สัมพันธ์กับผลการทดสอบที่ทำการศึกษาที่พบการต้านอนุมูลอิสระที่ค่า $49.87 \pm 1.07\%$, $55.27 \pm 3.15\%$ และ $87.26 \pm 6.26\%$ ที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสำโรงมีค่า $52.58 \pm 23.14\%$, $56.42 \pm 7.46\%$ ที่ความเข้มข้น 0.125 และ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว โดยมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 55.04%, 69.14%, 69.29%, 76.29% และ 81.19% ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรูปภาพที่ 11b โดยพิจารณาผลจากวิธีทดสอบด้วยตัวทำละลายเอทานอล เนื่องจากมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ 95% เมทานอลที่ใช้ในวิธีการศึกษามากที่สุด

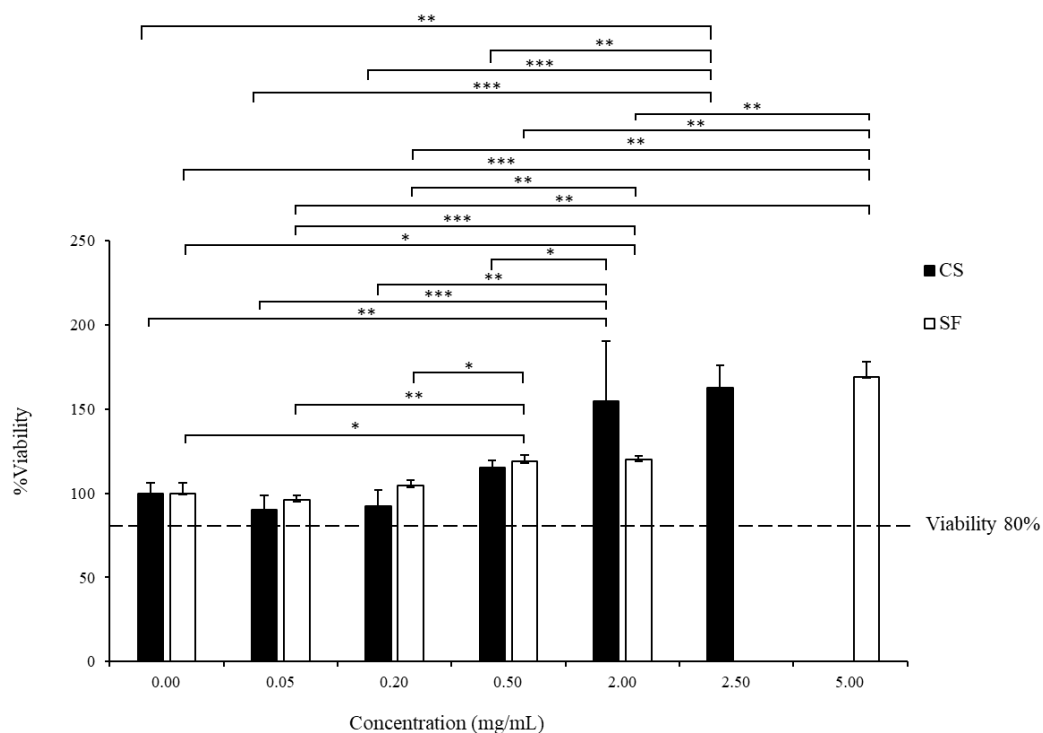
ตารางที่ 3 แสดงค่า TEAC ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ DPPH assay พร้อมทั้งแสดงค่า %inhibition และ IC₅₀ ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay และ nitric oxide radical scavenging (NO) ของสารสกัดมะกอกเกลือและสำโรง

พืช	ความเข้มข้น สารสกัด (mg/mL)	TEAC (mg Trolox /g extract) (mean ± SD)		%inhibition (mean ± SD)		IC ₅₀ (µg/mL)	
		FRAP	DPPH	DPPH	NO	DPPH	NO
มะกอกเกลือ	0			0.00 ± 6.48	0.00 ± 2.50		
	0.03125			10.07 ± 6.64	-		
	0.0625			19.07 ± 4.78	49.87 ± 1.07		
	0.125	353.18 ± 6.97	80.56 ± 0.12	35.90 ± 3.50	55.27 ± 3.15	176.38 ± 7.70	76.47 ± 4.26*
	0.25			69.83 ± 0.16	87.26 ± 6.26		
	1.25			84.83 ± 0.81	-		
	2.5			83.62 ± 0.13	-		
สำโรง	0			0.00 ± 1.86	0.00 ± 6.09		
	0.0625			18.79 ± 1.46	-		
	0.125			38.06 ± 1.19	52.58 ± 23.14		
	0.25	344.62 ± 11.68	81.24 ± 0.25	65.83 ± 3.72	56.42 ± 7.46	196.11 ± 21.03	196.41 ± 22.26
	0.5			85.41 ± 0.93	-		
	2.5			84.71 ± 0.27	-		
	5			82.00 ± 1.08	-		

*แสดงความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่า IC₅₀ ของมะกอกเกลือและสำโรงด้วยวิธี nitric oxide radical scavenging (NO) ที่ p<0.05

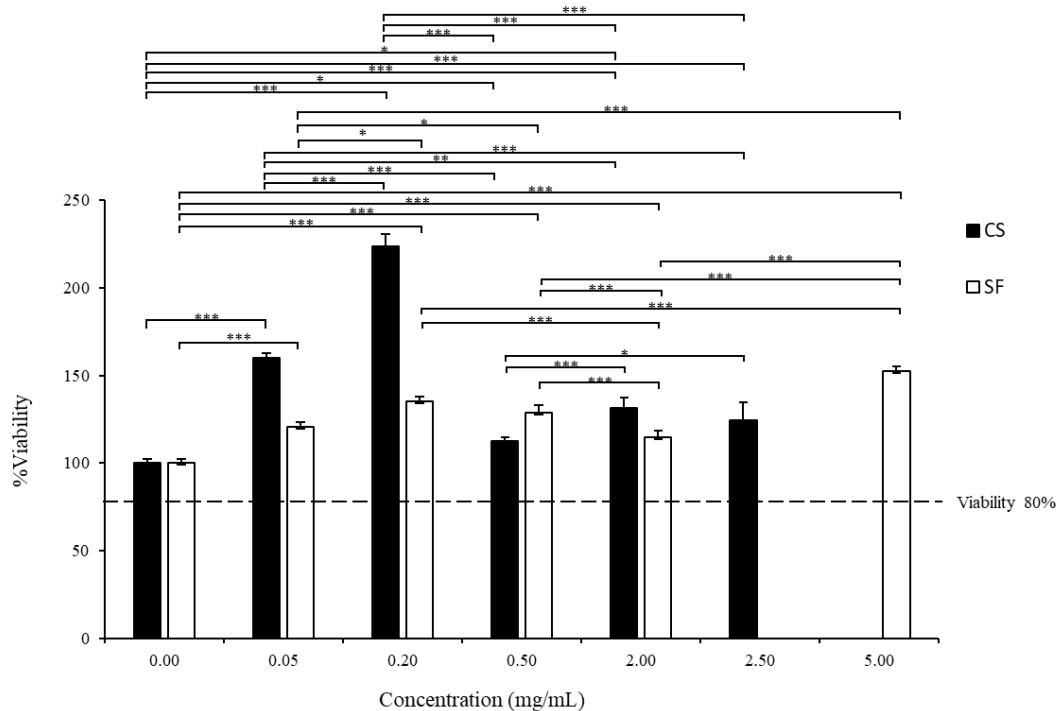
4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (MTT assay)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยเพาะเซลล์เยื่อปูไตลิง (Vero) ใน 96 well plate บ่มเซลล์เป็นเวลา 1 คืน แล้วเติมสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสำโรงที่ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงเติมสารละลาย MTT เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ บ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายผลึก formazan ด้วย 0.04 N HCl in isopropanol จนกระทั่งผลึกละลายอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 และ 630 นาโนเมตร คำนวณปริมาณเซลล์ที่รอด



รูปภาพที่ 12 แสดงกราฟ %viability ที่ 24 ชั่วโมง ของมะกอกเกลื้อน (CS) และสำโรง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปูไตลิง (Vero) ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสารสกัดสำโรงที่ความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.05, 0.2, 0.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0, 0.05, 0.2, 0.5, 2 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรูปภาพที่ 12 พบว่าความอยู่รอดของเซลล์ (%viability) ของเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสำโรงในทุกความเข้มข้น มีค่ามากกว่า 80% โดย %viability ในสารสกัดมะกอกเกลื้อน 2 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และในสารสกัดสำโรง 0.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และในสารสกัดสำโรง 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$)



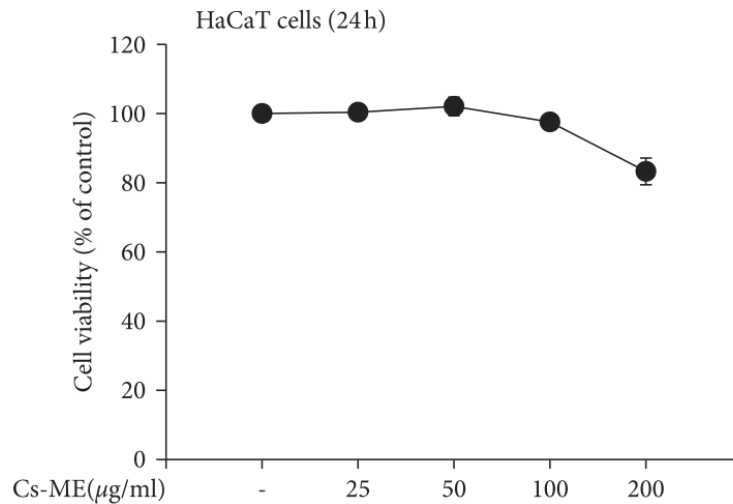
รูปภาพที่ 13 แสดงกราฟ %viability ที่ 48 ชั่วโมง ของมะกอกเกลื้อน (CS) และสำโรง (SF) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 4 ซ้ำ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อปูไต่ลิง (Vero) ที่ 48 ชั่วโมงของสารสกัดมะกอกเกลื้อน และสารสกัดสำโรงที่ความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.05, 0.2, 0.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0, 0.05, 0.2, 0.5, 2 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรูปภาพที่ 13 พบว่าความอยู่รอดของเซลล์ (%viability) ของเซลล์ที่เลี้ยงในสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสำโรงในทุกความเข้มข้น มีค่ามากกว่า 80% โดย %viability ในสารสกัดมะกอกเกลื้อน 0.05, 0.2, 0.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ในสารสกัดสำโรง 0.05, 0.2, 0.5 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และในสารสกัดสำโรงที่ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

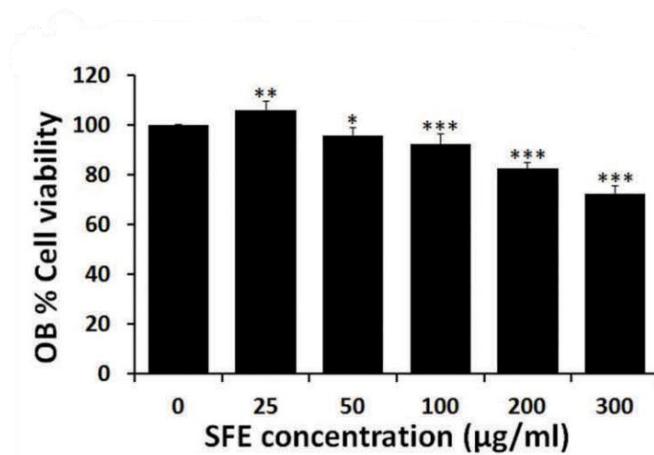
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของการศึกษาจากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

โดยผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในงานวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับสารสกัดมะกอกเกลื้อน และสำโรง โดยจากการศึกษาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์เคอราติโนไซต์หลังจากใส่สารสกัดเมทานอลของมะกอกเกลื้อน พบว่าสารสกัดมะกอกเกลื้อนสามารถป้องกันการตายของเซลล์จากรังสี UV ได้ และเริ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร⁽⁹⁾ และอีก

การศึกษาเป็นการศึกษาจำนวนการรอดชีวิตในเซลล์ normal osteoblast เมื่อได้รับสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดสำโรง พบว่าที่ความเข้มข้นสูงของสารสกัดสำโรง คือ 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยังให้จำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ที่มากกว่า 80% อยู่ดังแสดงในรูปภาพที่ 14⁽³⁰⁾



รูปภาพที่ 11 แสดงจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์เคอราติโนไซต์เมื่อได้รับสารสกัดเมทานอลมะกอกเกลือ⁽⁹⁾

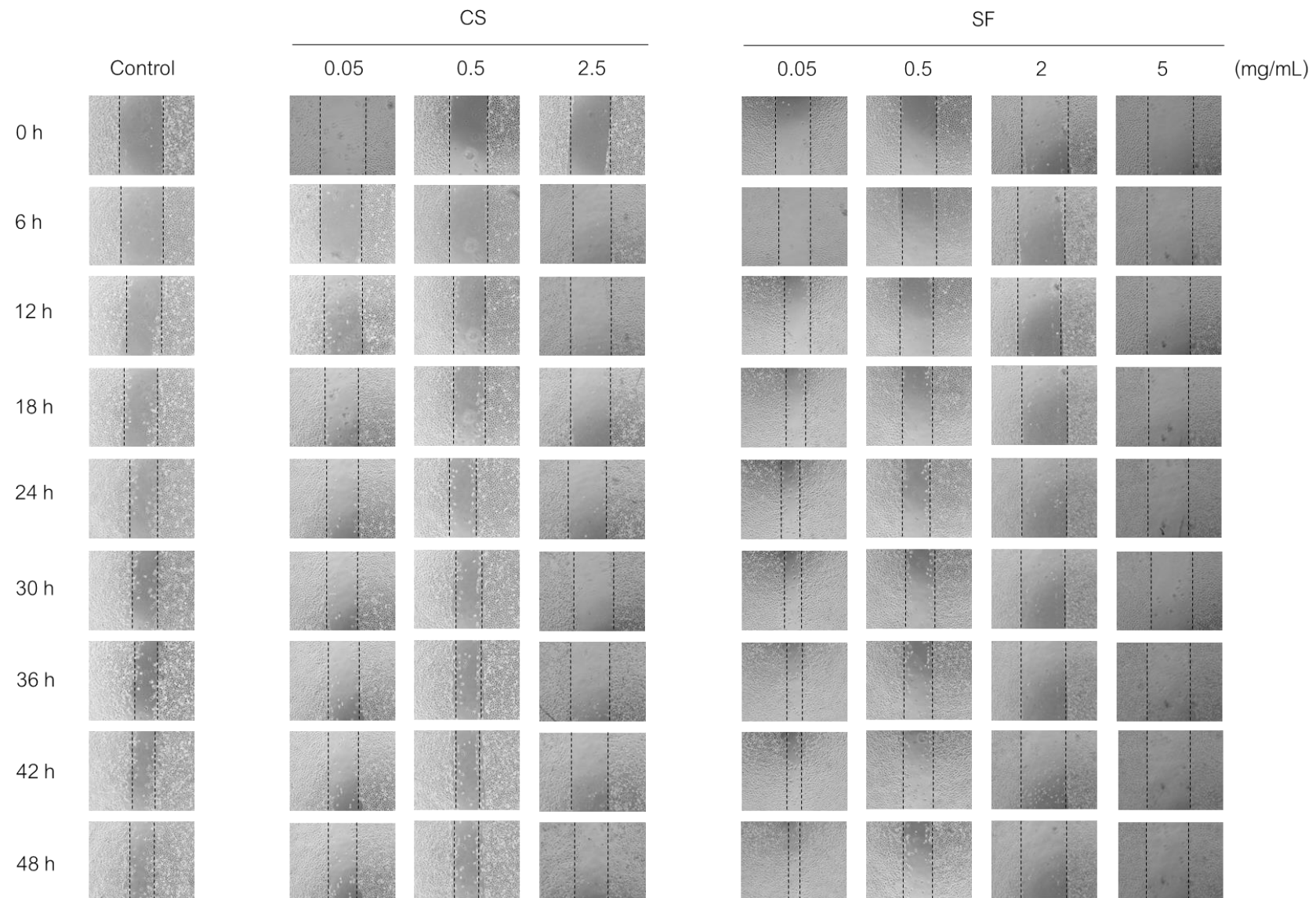


รูปภาพที่ 12 แสดงจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ normal osteoblast เมื่อได้รับสารสกัดเมล็ดสำโรงเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง โดยวัดระยะห่างด้วยโปรแกรม image J

4.5 การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล (scratching assay)

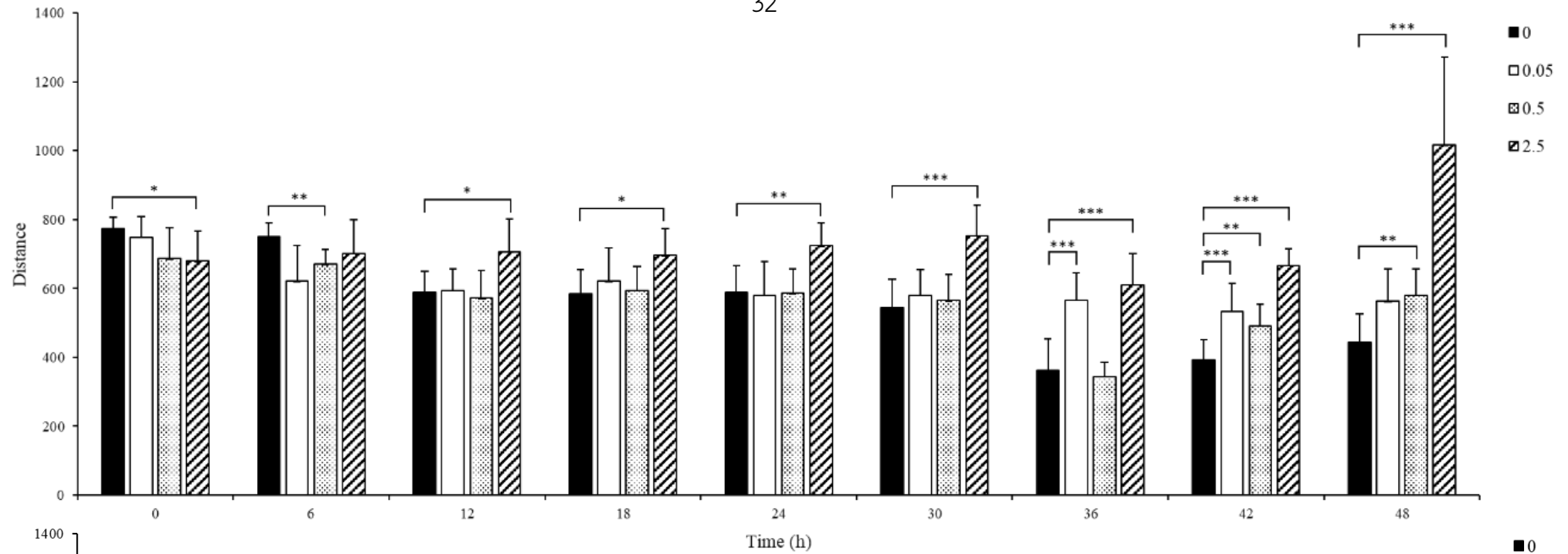
ในการศึกษาฤทธิ์การสมานแผลของสารสกัดมะกอกเกลือและสำโรง ทำการทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของมะกอกเกลือ 0, 0.05, 0.5 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดสำโรง 0.05, 0.5, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยสารทดสอบใดภายหลังทำการสร้างบาดแผลด้วยปลายปิเปต ภาพถ่ายผลการติดตามภายหลังสร้างบาดแผลทุก 6 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปภาพที่ 16 และผลการวัดระยะห่างของเซลล์เยื่อไ้ตลิง (Vero) ภายหลังการสร้างบาดแผล และเติมสารสกัด

มะกอกเกลือและสำโรง ดังแสดงในรูปภาพที่ 17 โดยจะเห็นความแตกต่างของระยะห่างรอยขีดที่เวลาต่างๆ จะเห็นว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีการปิดแผลได้เร็วกว่า ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะกอกเกลือและสำโรงนั้นยังคงปิดอย่างช้าๆ

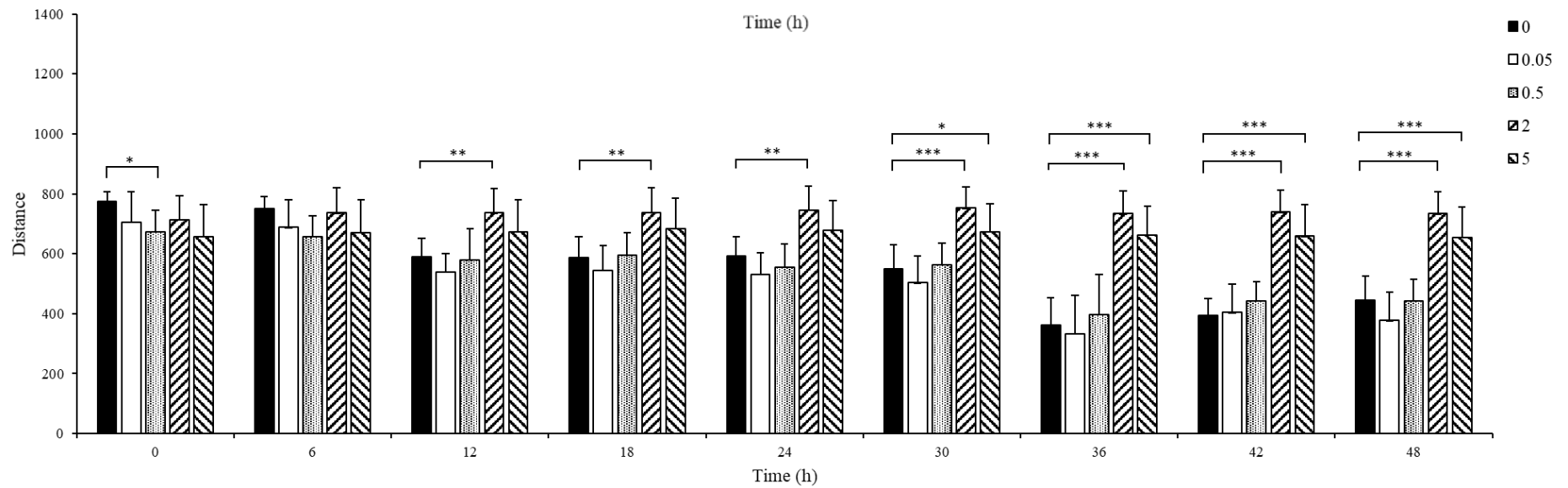


รูปภาพที่ 16 แสดงระยะห่างของเซลล์เยื่อปูไตลิง (Vero) ภายหลังการทำ scratching และเติมสารสกัดมะกอกเกลื้อน (CS) และสารสกัดสำโรง (SF) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยถ่ายภาพ ณ เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง

a



b



รูปภาพที่ 17 แสดงระยะห่างของเซลล์เยื่อปูไตลิง (Vero) ภายหลังการทำ scratching และเติมสารสกัดมะกอกเกลื้อน (a) และสารสกัดสำโรง (b) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การทดสอบเพื่อหาฤทธิ์การสมานแผลของสารสกัดจากเปลือกต้นของมะกอกเกลื้อนและสารสกัดจากเปลือกต้นของลำโรงในงานวิจัยนี้ ประกอบไปด้วยการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์สมานแผล โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มีการทดสอบผ่านการทดลอง 3 วิธี ได้แก่ FRAP assay, DPPH assay และ Nitric oxide radical scavenging ผลการทดสอบของสารสกัดมะกอกเกลื้อนและสารสกัดลำโรง พบว่าพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดทั้งสองด้วยวิธีทดสอบ MTT assay ผลพบว่าสารสกัดมะกอกเกลื้อนที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2, 0.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดลำโรงที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2, 0.5, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ สูงเกินร้อยละ 80 ทุกความเข้มข้นทั้งในการทดสอบที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบฤทธิ์สมานแผล พบว่าสารสกัดทั้งสองไม่ทำให้ฤทธิ์ในการสมานแผล แต่ให้ฤทธิ์ยับยั้งการสมานแผลแทนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ การที่สารสกัดพืชทั้งสองไม่มีฤทธิ์สมานแผลนั้น อาจเกิดจากกลไกอื่นๆ ที่มีผลต่อวิถี adhesion signaling ดังตัวอย่างการศึกษาต่อไปนี้ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องผิวหนังของสารสกัดมะกอกเกลื้อนพบว่าสารสกัดมะกอกเกลื้อนมีฤทธิ์กดการแสดงออกของยีน Hyaluronidase-1 (HYAL1) และ Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)⁽⁹⁾ นอกจากนี้ การศึกษาในเซลล์มะเร็งพบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำโรง มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน TIMP3 ซึ่งเป็น MMP inhibitor ทำให้ยับยั้งการสร้างคอลลาเจน ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการสมานแผล⁽¹³⁾ และจากการศึกษาทางพิษวิทยาพบว่าสารสกัดเมล็ดลำโรงยับยั้งการเกิด proliferation ใน epithelial cell จากเนื้อเยื่อปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa cell)⁽³⁰⁾

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากสารสกัดทั้งสองมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านหลายกลไก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาโดยการนำสารไปทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องอื่นๆ ต่อไป รวมทั้งการทดสอบในเซลล์ชนิดที่เป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

บรรณานุกรม

1. Ambrozova N, Ulrichova J, Galandakova A. Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF-**KB**. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2017;161(1):1-13.
2. Hu X, Qin N, Xue J, Li S, Huang X, Sun J, et al. Dehydrodiconiferyl alcohol from *Silybum marianum* (L.) Gaertn accelerates wound healing via inactivating NF-**KB** pathways in macrophages. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2020;72(2):305-17.
3. Yang H-L, Tsai Y-C, Korivi M, Chang C-T, Hseu Y-C. Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin and NF-**KB** Signaling Pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2017;1864(1):151-68.
4. Sikandan A, Shinomiya T, Nagahara Y. Ashwagandha root extract exerts anti-inflammatory effects in HaCaT cells by inhibiting the MAPK/NF-**KB** pathways and by regulating cytokines. Int J Mol Med. 2018;42(1):425-34.
5. Pereira Beserra F, Sérgio Gushiken LF, Vieira AJ, Augusto Bérqamo D, Luísa Bérqamo P, Oliveira de Souza M, et al. From Inflammation to Cutaneous Repair: Topical Application of Lupeol Improves Skin Wound Healing in Rats by Modulating the Cytokine Levels, NF-**KB**, Ki-67, Growth Factor Expression, and Distribution of Collagen Fibers. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(14).
6. ทรงศักดิ์ ธ. Wound Healing Activity of *Centella asiatica* (L.) Urb. 2019.
7. Tangjitjareonkun J, Supabphol R. Application of Aloe Vera on Wound Healing. Journal of Medicine and Health Sciences. 2015;Vol.22 No.3:53-67.
8. Sirinthipaporn A, Jiraungkoorskul W. Wound Healing Property Review of Siam Weed, *Chromolaena odorata*. Pharmacogn Rev. 2017;11(21):35-8.
9. Hwang SH, Kim JH, Choi E, Park SH, Cho JY. Antioxidative and Skin Protective Effects of *Canarium subulatum* Methanol Extract on Keratinocytes. Evid Based Complement Alternat Med. 2021;2021:6692838.
10. Choi E, Kim MY, Cho JY. Anti-inflammatory activities of *Canarium subulatum* Guillaumin methanol extract operate by targeting Src and Syk in the NF-**KB** pathway. J Ethnopharmacol. 2019;238:111848.
11. Alam N, Banu N, Aziz MAI, Barua N, Ruman U, Jahan I, et al. Chemical Profiling, Pharmacological Insights and In Silico Studies of Methanol Seed Extract of *Sterculia foetida*. Plants. 2021;10(6):1135.

12. Laksmiawati D, Prasanti A, Larasinta N, Syauta G, Hilda R, Ramadaniati H, et al. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoap (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *Journal of Natural Remedies*. 2016;16:73-81.
13. Peláez R, Ochoa R, Pariente A, Villanueva-Martínez Á, Pérez-Sala Á, Larráyo IM. Sterculic Acid Alters Adhesion Molecules Expression and Extracellular Matrix Compounds to Regulate Migration of Lung Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17):4370.
14. บุญเพียร อ, แจ่มปรีชา ธ, แสนสุรินทร์ น. ผลของการนวดด้วยน้ำมันกระดุกไก่ดำและน้ำมันไพลต่ออาการปวดกล้ามเนื้อคอ บ่า ไหล่ จากออฟฟิศซินโดรม. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine*. 2019;17:95-105.
15. Sritularak B, Boonplod N, Lipipun V, Likhitwitayawuid K. Chemical Constituents of *Canarium subulatum* and Their Anti-herpetic and DPPH Free Radical Scavenging Properties. *Records of Natural Products*. 2013;7:129-32.
16. Tamai M, Watanabe N, Someya M, Kondoh H, Omura S, Ling ZP, et al. New Hepatoprotective Triterpenes from *Canarium album*. *Planta Med*. 1989;55(01):44-7.
17. Anand KK, Gupta VN, Rangari V, Singh B, Chandan BK. Structure and Hepatoprotective Activity of a Biflavonoid from *Canarium manii*. *Planta Med*. 1992;58(06):493-5.
18. Guerra A, Belinha J, Jorge RN. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *J Theor Biol*. 2018;459:1-17.
19. Johansen C. Generation and Culturing of Primary Human Keratinocytes from Adult Skin. *J Vis Exp*. 2017(130).
20. Demilew W, Adinew GM, Asrade S. Evaluation of the Wound Healing Activity of the Crude Extract of Leaves of *Acanthus polystachyus* Delile (Acanthaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018:2047896.
21. Compaoré M, Meda RN-T, Bakasso S, Vlase L, Kiendrebeogo M. Antioxidative, anti-inflammatory potentials and phytochemical profile of *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl. (Burseraceae) and *Loeseneriella africana* (Willd.) (Celastraceae) stem leaves extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6(8):665-70.
22. Subramanian R, Alaguchamy N, Maruthappan V, Sivaperumal R, Sivalingam MK, Krishnan A, et al. Wound Healing Ethnomedicinal Plants Popular among the Malayali Tribes in Vattal Hills, Dharmapuri, TN, India. *Ethnobotanical Leaflets*. 2009.
23. File:Justicia gendarussa Blanco1.80-cropped.jpg --- Wikimedia Commons{,} the free media repository [Internet]. 2015 [cited 13 October 2021]. Available from:

https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Justicia_gendarussa_Blanco1.80-cropped.jpg&oldid=179396066.

24. Sangeetha S, Kavitha K, Sujatha K, Umamaheswari S. Phytochemical and Pharmacological Profile of *Justicia gendarussa* Burm f. – Review. *Journal of Pharmacy Research*. 2014;8:990-7.

25. Kumar KS, Vijayan V, Bhaskar S, Krishnan K, Shalini V, Helen A. Anti-inflammatory potential of an ethyl acetate fraction isolated from *Justicia gendarussa* roots through inhibition of iNOS and COX-2 expression via NF- κ B pathway. *Cell Immunol*. 2012;272(2):283-9.

26. มะกอกเกลื้อน [Internet]. องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2015 [cited 20 september 2021]. Available from:

http://www.qsbg.org/Database/Botanic_Book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2729.

27. กลุ่มงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้. มะกอกเกลื้อน กินได้จริงหรือ ชั้น 6 ตึกสุรัสวดี 61 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900: กลุ่มงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้; 2015 [updated 24 สิงหาคม 2015. 23:[Available from: <http://fbd.forest.go.th/th/?p=6753>.

28. ลำไ้ [Internet]. [cited 20 September 2021]. Available from: http://www.rspg.or.th/plants_data/palace/chitralada/cld6-2_098.htm.

29. Uddin I, S A, Ns R, Ma M, N K, P V. Phytochemical Screening and in-vitro Anti-Inflammatory Activity of Methanolic Extract of *Sterculia foetida* L. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2016;11:28-34.

30. Jafri A, Bano S, Rais J, Khan F, Shivnath N, Sharma AK, et al. Phytochemical screening of *Sterculia foetida* seed extract for anti-oxidant, anti-microbial activity, and detection of apoptosis through reactive oxygen species (ROS) generation, mitochondrial membrane potential (MMP) decrease, and nuclear fragmentation in human osteosarcoma cells. *Journal of Histotechnology*. 2019;42(2):68-79.

31. Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, Hideg É. Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules*. 2016;21(2).

32. Sameenoi Y. Development of paper-based DPPH assay for high throughput analysis of antioxidant activity in foods and natural products. 2017.

33. Chitsomboon B. Inhibitory mechanism of nitric oxide production and biological activities of extract from seed coat of *Ma Khaam*. 2016.

34. Jing L, Ma H, Fan P, Gao R, Jia Z. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:287.
35. Kavitha MS, editor *Pharmacognostical, Phytochemical and Anti-Arthritic Activity on the Bark of Sterculia Foetida Linn., and Isolation of Biological Marker* 2016.