

ประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุมต่อการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกของสุกร

Efficiency of *Moringa oleifera* Leaves Extract on Osteogenic Differentiation of Porcine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells using response surface methodology

กุลิสรา มรूपันธุ์^{1*}

Kulisara Marupanthorn^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบมะรุมต่อการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกของสุกร โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากไขกระดูกของสุกรในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด completed medium และชนิด osteogenic differentiation medium (OstDiff medium) ที่มีสารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำ หรือเอทานอลปริมาณ 0 (กลุ่มควบคุม), 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นตรวจสอบการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกจากการแสดงออกของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และ ALP activity จากการศึกษาระสิทธิภาพของสารสกัดจากใบมะรุม พบว่าการเสริมสารสกัดจากใบมะรุมทำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกสุกร มีการแสดงออกของเอนไซม์ ALP และ ALP activity สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จึงคาดว่า สารสกัดจากใบมะรุมสามารถกระตุ้นการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากไขกระดูกสุกร

คำสำคัญ: สารสกัดจากใบมะรุม, เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูก, การเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก

ABSTRACT: The experiment was conducted to study the efficiency of *Moringa oleifera* leaf (MOL) extract on osteogenic differentiation of porcine bone marrow derived mesenchymal stem cells (pBM-MSCs). pBM-MSCs were isolated and cultured in completed medium or osteogenic differentiation medium (OstDiff medium) containing 0 (control group), 100, 200, and 300 $\mu\text{g/ml}$ water or ethanolic extract of MOL to explore the osteogenic differentiation ability. The degree of osteogenic differentiation after MOL extract treatment was assessed by alkaline phosphatase (ALP) expression and ALP activity. The results of MOL extract supplementation in osteogenic differentiation demonstrated that pBM-MSCs were increase in all groups of MOL supplementation when compared to the control group ($P<0.05$). The present study suggested that water and ethanolic extract of MOL promotes osteogenic differentiation of pBM-MSCs.

Keywords: *Moringa oleifera* leaves extract, porcine bone marrow derived mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation

¹ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์หันตรา อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi

* Corresponding author: kulisara.m@rmutsb.ac.th

บทนำ

มะรุมเป็นพืชพื้นบ้านที่พบได้ทุกภาคในประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* เป็นไม้ยืนต้น ขนาดกลางที่โตเร็ว ทนแล้ง พบได้ในเขตร้อน มีการนำไปใช้ประกอบอาหาร และนำไปใช้ประโยชน์ทางยา ทั้ง ใบ ดอก ผล ราก เปลือก เมล็ด รวมทั้งยาง (Anwar et al., 2007) จากการศึกษาวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่า สารสกัดจากมะรุมมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดกระดูกพรุน เช่น รายงานการใช้สารสกัดจากใบมะรุมช่วยชะลอการเกิดภาวะกระดูกพรุนในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน (Chirag et al., 2015) การใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูกในผู้ป่วยชากรโรคส่วนล่าง (Singh et al., 2011) เป็นต้น อีกทั้งมีผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบมะรุม (*Moringa oleifera* leaf; MOL) มีสารชีวพิษศาสตร์ คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenolic compounds) ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูก (Zhang et al., 2008, Alikwe, P.C.N. and Omotosho, 2013) แต่การศึกษาระดับเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบมะรุม ขึ้นน้ำและชั้นเอทานอลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูกยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด มีเพียงรายงานของ Kulisara and Wisit (2016) ที่พบว่า สารสกัดชั้นเอทานอลของ MOL สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกสุกร (porcine bone marrow derived mesenchymal stem cells; pBM-MSCs) เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก แต่จากการศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากดอก ดาวเรืองสดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดย อรรถ และ กาญจน (2558) พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สกัดด้วย 90% H₂O/EtOH เท่ากับ 8% ของน้ำหนักสารสกัดหยาบ ซึ่งมากกว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการสกัดด้วย 10% H₂O/EtOH (3%) สารสกัดชั้นน้ำของ MOL จึงน่าจะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกสุกรได้ดีกว่าสารสกัดชั้นเอทานอล

กระบวนการสร้างกระดูก เริ่มจากการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ไปเป็นเซลล์กระดูก

ชนิดออสทีโอเบลาสต์ (osteoblast) และเซลล์กระดูกชนิดออสทีโอไซต์ (osteocyte) (Nakashima and de Crombrughe, 2003, Kapinas and Delany, 2011) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ (differentiation) ได้ทั้งในกลุ่ม mesodermal, endodermal และ ectodermal lineages (Sanchez-Ramos et al., 2000) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเวชศาสตร์ฟื้นฟูได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม MSCs ที่ใช้ทางสัลยกรรมกระดูกอย่างแพร่หลาย คือ เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells; BM-MSCs) ซึ่งยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ คือ จำเป็นต้องมีการเจาะเก็บไขกระดูก และจำนวนของ MSCs ในไขกระดูกมีปริมาณไม่มากนัก (Stenderup et al., 2003) จากการศึกษาของ Rho et al. (2009) และ Bharti et al. (2016) พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากสุกร มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากมนุษย์ มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะ (CD90 และ CD105) ไม่มีการแสดงออกของ CD45 และสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างได้ เช่น เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ประสาท เป็นต้น เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกสุกรอาจคัดแยกจากกระดูกเชิงกราน หรือกระดูกต้นขาหลังของสุกรสุขภาพดีที่ถูกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ จึงเป็นแหล่งของ MSCs ที่หาได้ง่าย สามารถแยก MSCs จากเนื้อเยื่อได้จำนวนมาก และไม่จำเป็นต้องมีการผ่าตัด ดังนั้นการวิจัยนี้จึงคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกสุกร เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบมะรุมต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์กระดูก

วิธีการศึกษา

การเก็บไขกระดูก

เก็บไขกระดูกปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากกระดูกต้นขาหลังของสุกรขุนเพศผู้สุขภาพดี น้ำหนัก 95–110 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว จากโรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ในเดือนมกราคม–มิถุนายน 2559 นำไขกระดูกที่ได้มาปั่นแยกด้วยสาร Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, USA)

นำไปเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ โดยมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 1×10^5 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด completed medium ที่มี Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low glucose (DMEM) (Invitrogen, USA) ที่ผสม 10% Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA) และ 100 ยูนิต/มิลลิกรัม penicillin/ streptomycin (Invitrogen, USA) จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย 0.25% trypsin-EDTA และนำเซลล์ไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน และศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ จากการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะ ความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก และเซลล์ไขมัน (Friedenstein et al., 1974)

- การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะของ pBM-MSC ด้วยวิธี flow cytometry

ใช้ pBM-MSC (passage ที่ 3-5) จำนวน 1×10^5 เซลล์ มาทำการติดฉลากด้วย anti-CD45-FITC (Biolegend, USA), anti-CD90-FITC (Biolegend, USA) และ anti-CD105-PE (BD Pharmingen, USA) และนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง FACS caliber™ flow cytometer ด้วยโปรแกรม CellQuest™ software (Becton Dickinson, USA) (ดัดแปลงจาก Rho et al., 2009)

- การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ pBM-MSC ไปเป็นเซลล์กระดูก

ใช้ pBM-MSC (passage ที่ 3-5) จำนวน 5×10^3 เซลล์/ตารางเซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium [Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GibcoBRL, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, USA), 100 ยูนิต/มิลลิกรัม penicillin/streptomycin, 100 นาโนโมล dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA), 10 ไมโครโมล β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, USA), 50 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนครบเวลา 14 วัน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาย้อมเพื่อตรวจสอบการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline

phosphatase; ALP) โดยใช้ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (NBT/BCIP; Sigma, USA) เป็น substrate ก่อนนำไปตรวจทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope (Nikon TS100, Japan) กำลังขยาย 10 เท่า (ดัดแปลงจาก Rho et al., 2009)

- การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ pBM-MSC ไปเป็นเซลล์ไขมัน

ใช้ pBM-MSCs (passage ที่ 3-5) จำนวน 7.8×10^3 เซลล์/ตารางเซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด adipogenic differentiation medium [Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GibcoBRL, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, USA), 100 ยูนิต/มิลลิกรัม penicillin/ streptomycin, 0.5 มิลลิโมล isobutyl-methylxanthine (Sigma-Aldrich, USA), 1 ไมโครโมล dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA), 10 ไมโครโมล insulin (Sigma-Aldrich, USA), 100 ไมโครโมล indomethacin (Sigma-Aldrich, USA)] ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนครบเวลา 21 วัน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย 0.5 % (w/v) Oil red O (Sigma Aldrich, USA) ก่อนนำเซลล์ที่เหนียวมาให้เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันไปตรวจทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope (Nikon TS100, Japan) กำลังขยาย 20 เท่า (ดัดแปลงจาก Rho et al., 2009)

การเตรียมสารสกัดไขมันและทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดชั้นน้ำ และเอทานอลจากไขมันต่อ pBM-MSC ด้วยวิธี MTT

เตรียมไขมันเพื่อสกัด โดยเลือกไขมันที่มีลักษณะไม่แก่และอ่อนจนเกินไป (ไขเป็ดสด) เลือกเฉพาะส่วนไขชั้นน้ำหนักสดล้างทำความสะอาดนำไปผึ่งให้หมาดและอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในห้องปฏิบัติการสาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ เมื่อไขแห้งจึงนำไปสกัดชั้นน้ำ โดยการต้มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 20 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 20 และนำไป

ระเหยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Sreelatha and Padma, 2009) และสกัดชั้นเอทานอล โดยการหมัก (maceration) ด้วย 90% H₂O/EtOH และ 10% H₂O/EtOH ตามลำดับ ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองแยกส่วนของเหลวที่ได้จากการหมัก และระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Vongsak et al., 2013) ได้เป็นสารสกัดใบมะรุม (*Moringa oleifera* leaf; MOL) ชื้นน้ำ และชั้นเอทานอล

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดชั้นน้ำและเอทานอลจากใบมะรุมต่อ pBM-MSC ด้วยวิธี MTT colorimetric assay โดยใช้ pBM-MSC จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ขั้ว ใช้สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 200, 300, 400, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ยาปฏิชีวนะ mitomycin C ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเป็น positive control และใช้ DMSO 1% เป็น negative control นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (BioTex, USA)

ศึกษาผลการใช้สารสกัดชั้นน้ำ และเอทานอลจากใบมะรุมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกของ pBM-MSCs

นำ pBM-MSCs (passage ที่ 3 – 5) ที่แยกได้จากสักร 3 ตัว จำนวน 432 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์ 5x10³ เซลล์/ตารางเซนติเมตร เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน เป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน แบ่งเป็นการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ALP จำนวน 216 ตัวอย่าง และทดสอบการทำงานของเอนไซม์ ALP จำนวน 216 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างออกเป็น 8 กลุ่มทดลอง โดยกลุ่มทดลองแรก เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด complete medium ส่วนกลุ่มทดลองที่ 2 (กลุ่มควบคุม) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium สำหรับกลุ่มทดลองที่ 3 – 5 เพาะเลี้ยงใน osteogenic differentiation medium ที่เติมสารสกัด MOL ชื้นน้ำ

เท่ากับ 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และกลุ่มทดลองที่ 6 - 8 เพาะเลี้ยงใน osteogenic differentiation medium ที่เติมสารสกัด MOL ชื้นเอทานอลเท่ากับ 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

- การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ALP

เพาะเลี้ยง pBM-MSC ทั้ง 8 กลุ่มทดลองเป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วย PBS และทำให้คงสภาพด้วย 4% paraformaldehyde นำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ ALP ด้วย BCIP®/NBT® Liquid substrate (Sigma-Aldrich, USA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope (Nikon TS100, Japan) กำลังขยาย 10 เท่า

- การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ ALP

นำ pBM-MSC จำนวน 8 กลุ่ม เช่นเดียวกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ALP ในวันที่ 3, 7 และ 14 ทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ ALP โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SensoLyte® pNPP alkaline phosphatase assay kit (AnaSpec, USA) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (BioTex, USA) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ ALP ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Bradford assay (Bio-Rad, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ 3 – 8 เทียบกับกลุ่มทดลองที่ 2 (กลุ่มควบคุม) โดยใช้วิธีคำนวณทางสถิติแบบ Mann-Whitney U test ที่ P-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SAS ®9.1.3

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ลักษณะและคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกสุกร (pBM-MSCs)

pBM-MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูกสุกรในวันที่ 1 มีรูปร่างกลม (Figure 1A) จากนั้นในวันที่ 7 พบว่าเซลล์มีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle-shaped cells) สามารถยึดเกาะผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Figure 1B) เมื่อนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน passage ที่ 3 มาตรวจสอบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ด้วย flow cytometry พบว่าเซลล์ที่ได้จากไขกระดูกสุกรมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ได้แก่ CD90 และ CD105 คิดเป็น 81.97 และ 89.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือด (CD45) (Figure 2) สอดคล้องกับการศึกษาของ Juhasova et al. (2011) และ Bruckner et al. (2014) ว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue derived mesenchymal stem cell) และไขกระดูกของสุกร มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ได้แก่ CD44, CD29, CD90 และ

CD105 แต่ไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือด เมื่อทำการเหนี่ยวนำ pBM-MSCs ให้พัฒนาเป็นเซลล์กระดูก โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium เป็นเวลา 14 วัน เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ ALP พบว่ามีตะกอนสีม่วงน้ำตาลเกิดขึ้น pBM-MSCs ที่แยกได้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกได้ (Figure 1C) และเหนี่ยวนำ pBM-MSCs ให้พัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด adipogenic differentiation medium เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันโดยการย้อมสี Oil Red O มีการติดสีแดงที่บริเวณ lipid droplet พบว่า pBM-MSCs ที่แยกได้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน (Figure 1D) จากลักษณะ และคุณสมบัติของ pBM-MSCs ที่แยกได้จากไขกระดูกสุกรพบว่า มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ MSC ที่แยกได้จากไขกระดูกมนุษย์ คือ มีรูปร่างคล้ายกระสวย ยึดเกาะผิวภาชนะ มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะ สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก และเซลล์ไขมัน (Deans and Moseley, 2000 และ Le Blanc, and Ringden, 2006)

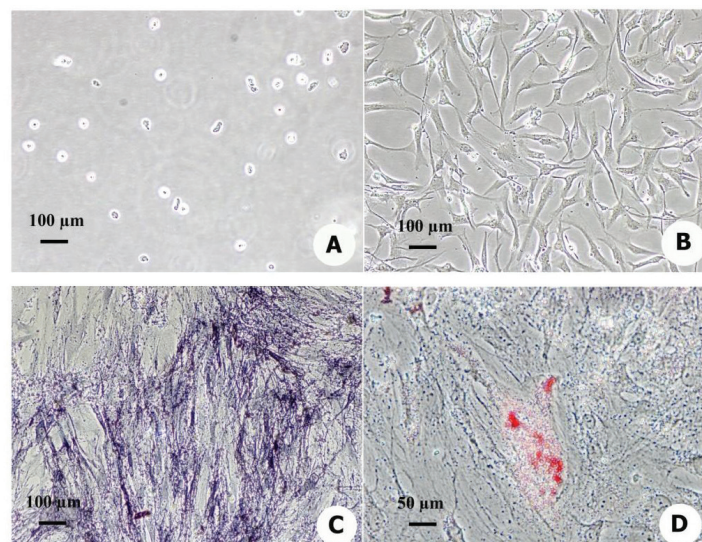


Figure 1 Morphology of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow (pBM-MSCs). A: Round-shaped cells at day 1 after the initial seeding; B: Spindle-shaped cells at day 7. C: Osteogenic differentiation of pBM-MSCs was evidenced by the formation of alkaline phosphatase-positive aggregate in cytoplasm after induction with osteogenic differentiation medium for 14 days. D: The positive for oil red-O staining in pBM-MSCs after adipogenic induction for 21 days.

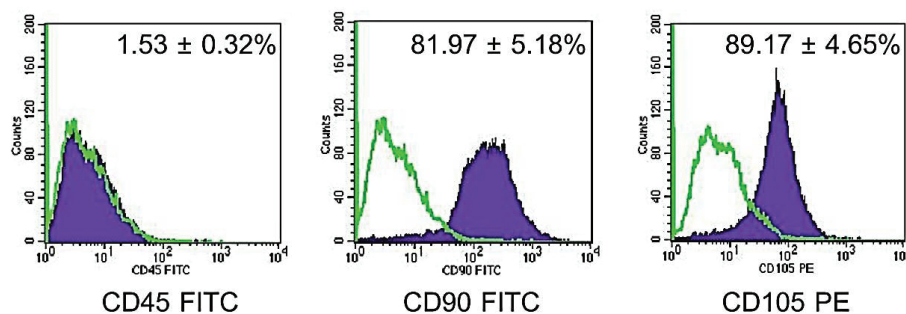


Figure 2 Flow cytometric analysis of surface marker expression on *pBM-MSCs*. The green line showed the profile of negative control. The data shown were representative of those obtained in three different experiments.

ความเป็นพิษของสารสกัดชั้นน้ำ และชั้นเอทานอล จากใบมะรุมต่อ *pBM-MSCs*

ผลการศึกษาพบว่า *pBM-MSCs* ที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใบมะรุม มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่ากับ 100 ± 2.50 , 100 ± 1.40 , 100 ± 2.70 , 93 ± 2.56 , 81 ± 1.97 และ 45 ± 3.57 ตามลำดับ และ *pBM-MSCs* ที่ได้รับสารสกัดชั้นเอทานอล มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่ากับ 100 ± 2.10 , 100 ± 2.01 , 98 ± 2.42 , 92 ± 2.45 , 75 ± 2.64 และ 39 ± 3.97 ตามลำดับ (Figure 3)

pBM-MSCs ที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำ หรือสารสกัดชั้นเอทานอลของ MOL ไม่เกิน 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น *pBM-MSCs* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง ซึ่งสารสกัดชั้นเอทานอลที่มีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *pBM-MSCs* ลดต่ำกว่าสารสกัดชั้นน้ำของ MOL ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดชั้นน้ำ และชั้นเอทานอลจาก MOL จึงเลือกใช้สารสกัดชั้นน้ำ และชั้นเอทานอลของ MOL ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งรายงานก่อนหน้าพบเพียงการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากใบมะรุมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เซลล์มะเร็งปอด (A549 lung adenocarcinoma) (Jung, 2014) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphoblastoid (TK6 cell) (Ratsada et al., 2016) แต่ไม่พบการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยเฉพาะเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์

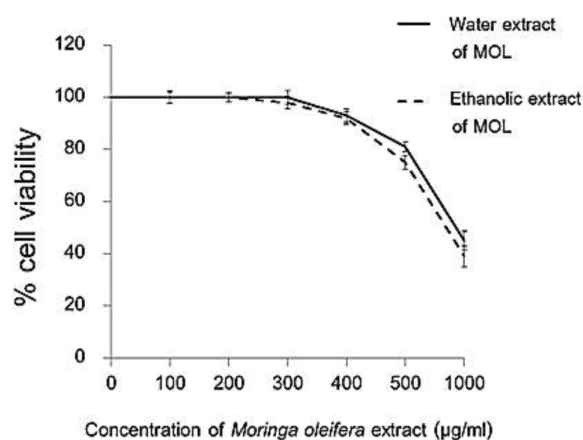


Figure 3 Cell viability percentage of *pBM-MSCs* exposed to different concentration of *Moringa oleifera* leaf extract.

ประสิทธิภาพของสารสกัดชันน้ำ และเอทานอลจากใบมะรุมต่อการเจริญพัฒนาไปเซลล์กระดูกของ *pBM-MSCs*

ประสิทธิภาพของสารสกัดชันน้ำ และชันเอทานอลจาก MOL ต่อการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกของ *pBM-MSCs* พบว่า *pBM-MSCs* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium ที่มีสารสกัด MOL ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการตกตะกอนสีม่วง-น้ำตาลมากที่สุด รองลงมา คือ

200 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยง *pBM-MSCs* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium จนครบ 14 วัน จะพบว่า *pBM-MSCs* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดชันน้ำของ MOL 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีตะกอนสีม่วง-น้ำตาล ชัดเจนที่สุด แสดงให้เห็นว่า สารสกัดชันน้ำของ MOL 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรสามารถกระตุ้นการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกของ *pBM-MSCs* (Figure 4)

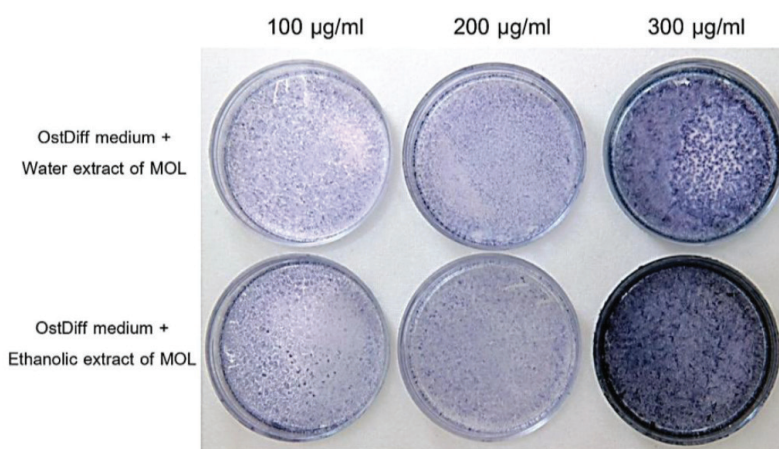


Figure 4 The expression of alkaline phosphatase in *pBM-MSCs* after treated with 100, 200, and 300 µg/ml water extract or ethanolic extract of MOL for 14 days

เมื่อเพาะเลี้ยง *pBM-MSCs* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium ที่มีสารสกัดชันน้ำ และชันเอทานอลของ MOL พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ ALP เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium ที่ไม่มีการเติมสารสกัดของ MOL ซึ่ง *pBM-MSCs* กลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium ที่มีสารสกัดชันน้ำหรือชันเอทานอลของ MOL ความเข้มข้น 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าการทำงานของเอนไซม์ ALP สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดการศึกษาทดลอง เป็นที่น่าสนใจว่าการเติมสารสกัดจาก MOL ความเข้มข้น 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มค่าการทำงานของเอนไซม์ ALP ได้ประมาณ 2 – 3 เท่า ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง เมื่อเทียบกับ

กลุ่มที่เพาะเลี้ยงใน osteogenic differentiation medium ที่ไม่มีการเติมสารสกัดจาก MOL อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างค่าการทำงานของเอนไซม์ ALP จาก *pBM-MSCs* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด osteogenic differentiation medium ที่เติมสารสกัดชันน้ำ และชันเอทานอลของ MOL (Table 1, Figure 5) การสร้างเอนไซม์ ALP และ ค่าการทำงานของเอนไซม์ ALP ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับรายงานของ Wan et al. (2007) ที่ระบุว่าเอนไซม์ ALP มีการสร้างจาก osteoblast เพื่อสลายฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ให้เพียงพอต่อการสร้างกระดูก และค่าการทำงานของเอนไซม์ ALP ยังเป็นตัวบ่งชี้ระดับของกระบวนการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก จึงคาดว่าสารสกัดชันน้ำ และชันเอทานอลของ MOL มีผลทำให้ *pBM-MSCs* เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกได้มากขึ้น

Table 1 Alkaline phosphatase activity (ng/mg protein) of MOL extract induced osteogenic differentiation of pBM-MSCs.

Group	Day (s)		
	3	7	14
Complete medium	1.75 ± 0.13	4.36 ± 0.32	5.42 ± 0.43
OstDiff medium (control)	2.51 ± 0.21	5.32 ± 0.45	7.05 ± 0.38
OstDiff + water extract of MOL (µg/ml)			
+ 100	3.43 ± 0.25	8.25* ± 0.57	14.53* ± 0.58
+ 200	4.58* ± 0.57	11.54* ± 0.76	17.98* ± 0.39
+ 300	5.30* ± 0.36	14.92* ± 0.59	19.24* ± 0.87
OstDiff + ethanolic extract of MOL (µg/ml)			
+ 100	2.90 ± 0.33	7.47* ± 0.31	12.39 ± 0.89
+ 200	3.82* ± 0.34	8.54* ± 0.53	15.32* ± 0.42
+ 300	4.53* ± 0.42	13.64* ± 0.87	17.43* ± 0.73

Values are presented as mean ± SEM. (n = 27)

*P < 0.05 in comparison to osteogenic differentiation medium (OstDiff medium).

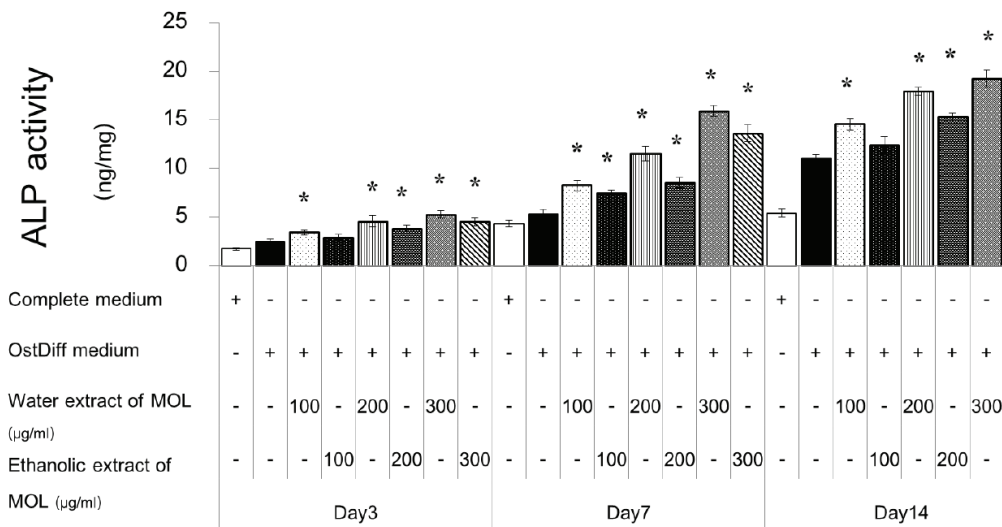


Figure 5 Alkaline phosphatase activity of MOL extract induced osteogenic differentiation of pBM-MSCs. Data are expressed as mean ± SEM. * P < 0.05: significant difference in comparison to MSCs cultured in osteogenic differentiation medium.

สรุป

สารสกัดชันน้ำ และชันเอทานอลจากใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกของสุกรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสารสกัด MOL ชันน้ำ และชันเอทานอลความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และค่าการทำงานของเอนไซม์ ALP สูงกว่ากลุ่มควบคุม 2.6 เท่า เนื่องจากสารสกัด MOL ชันน้ำสามารถผลิตได้ง่าย และประหยัดกว่าสารสกัด MOL ชันเอทานอล ดังนั้นจึงควรศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดชันน้ำจากใบมะรุมเพื่อประโยชน์ในการป้องกัน และรักษาโรคกระดูกอ่อนในสุกรต่อไป

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.วิศิษฐ์ เกตุปัญญาพงศ์ และ
พศิน มรุตพันธ์

เอกสารอ้างอิง

- อรชร ไอสันเพียะ และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง. 2558. การศึกษาระบบตัวทำลายลายของการสกัดสารประกอบ ฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดจากดอกดาวเรืองสด. วารสารวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครสวรรค์. 7(7): 29-40.
- Alikwe, P.C.N., and M.S. Omotosho. 2013. An evaluation of the proximate and phytochemical composition of *Moringa oleifera* leaf meal as potential feedstuff for non-ruminant livestock. *AgroSearch*. 13: 17-27.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, and A.H. 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res*. 21(1): 17-25.
- Bharti, D., S.B. Shivakumar, R.B. Subbarao, and G.J. Rho. 2016. Research advancements in porcine derived mesenchymal stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 11(1): 78-93.
- Bruckner, S., H.M. Tautenhahn, S. Winkler, P. Stock, M. Dollinger, and B. Christ. 2014. A fat option for the pig: hepatocytic differentiated mesenchymal stem cells for translational research. *Exp Cell Res*. 321(2): 267-75.
- Chirag, P., M. A. Rangrez, and P. Pragna. 2015. Studies on the Osteoprotective and Antidiabetic Activities of *Moringa Oleifera* Plant Extract. *IOSR Journal of Pharmacy*. 5(5): 19-22.
- Deans, R.J., and A.B. Moseley. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 28: 875-884.
- Friedenstein, A.J, R.K, Chailakhyan, N.V. Latsinik, A.F. Panasyuk, and I.V. Keiliss-Borok. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 17: 331-340.
- Juhasova, J., S. Juhas, J. Klima, J. Strnadel, M. Holubova, and J. Motlik. 2011. Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment. *Physiol Res*. 60(3): 559-71.
- Jung, I. L. 2014. Soluble Extract from *Moringa oleifera* Leaves with a New Anticancer Activity. *PLoS ONE*. 9(4): e95492.
- Kapinas, K., and A.M. Delany. 2011. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther*. 13(3): 220.
- Kulisara, M., and K. Wisit. 2016. The Effects of *Moringa Oleifera* Lam. Leaves Extract on Osteogenic Differentiation of Porcine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. In: 4th International Conference on Advances in Agricultural, Biological & Ecological Sciences (AABES-16) Dec. 1-2, 2016, London.
- Le Blanc, K., and O. Ringden. 2006. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 18: 586-91.
- Nakashima, K., and B. de Crombrughe. 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet*. 19(8): 458-66.
- Onu, P.N., and A.O. Aniebo. 2011. Influence of *Moringa oleifera* leaf meal on the performance and blood chemistry of starter broilers. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*. 1(1): 38-44.

- Ratsada, P., S. Maitree, C. Suphachai, T. Rungthip, K. Paween, J. Kwanchaya, and V. Pramote. 2016. Cytotoxicity evaluation of leaf-extract from *Moringa oleifera*, *Cratogeomys formosum*, and *Mangifera indica*. *Naresuan Phayao Journal*. 9(2): 5-8.
- Rho, G.J., B.M. Kumar, and S.S. Balasubramanian. 2009. Porcine mesenchymal stem cells-current technological status and future perspective. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 1(14): 3942-61.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, et al. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental neurology*. 164(2): 247-56.
- SAS. 2006. *STAT User's Guide Release 9.1.3*. NC: SAS Inst.,
- Cary.Singh, V., N. Singh, U. S. Pal, S. Dhasmana, S. Mohammad, and N. Singh. 2011. Clinical evaluation of *Cissus quadrangularis* and *Moringa Oleifera* and osteoseal as osteogenic agents in mandibular fracture. *National Journal of Maxillofacial Surgery*. 2(2): 132-136.
- Sreelatha, S., and P. R. Padma. 2009. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Moringa oleifera* Leaves in Two Stages of Maturity. *Plant Foods Hum Nutr*. 64: 303-311.
- Stenderup, K., J. Justesen, C. Clausen, and M. Kassem. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 33(6): 919-26.
- Vongsaka, S., P. Sithisarna, S. Mangmool, S. Thongpraditchote, Y. Wongkrajang, and W. Gritsanapan. 2013. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*. 44: 566-571.
- Wan, D.C., M.T. Siedhoff, M.D. Kwan, R.P. Nacamuli, B.M. Wu, and M.T. Longaker. 2007. Refining retinoic acid stimulation for osteogenic differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Tissue engineering*. 13(7): 1623-31.