

บทความวิจัย (Research Article)

สารสกัดดอกบัวหลวงลดพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนัง
ศุภชัย เจริญสิน^{1*}, พัชรินทร์ ใจข้อ¹ และ สุวัฒน์ศักดิ์ ด้านศักดิ์ดา¹

Protective effects of *Nelumbo nucifera* extract on dermal fibroblast against hydrogen peroxide-induced cell toxicity

Suphachai Charoensin^{1*}, Patcharin Jaical¹ and Suwatsak Dansakda¹

¹ School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao, 56000

* Corresponding author: suphachai.ch@up.ac.th

Naresuan Phayao J. 2023;16(1): 46-55.

Received: 16 February 2022; Revised: 18 May 2022; Accepted: 21 January 2023

บทคัดย่อ

เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะธำรงดุลของผิวหนัง ภาวะเครียดออกซิเดชันอันเกิดจากสารอนุมูลอิสระออกซิเจนพบว่าก่ออันตรายให้กับเซลล์ชนิดนี้ ส่งผลให้เกิดการชราและการตายของเซลล์ก่อนเวลาอันควร งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการป้องกันเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากการทำลายด้วยสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (จำลองการตายของเซลล์อันเนื่องมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน) การศึกษาพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่บ่มร่วมกับสารสกัดดอกบัวหลวง ความเข้มข้น 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีแนวโน้มเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้เมื่อได้รับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดดอกบัวหลวงความเข้มข้น 400-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อัตราการรอดชีวิตจะเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ความสามารถในการป้องกันเซลล์จากพิษของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจเนื่องมาจากการที่สารสกัดดอกบัวหลวงมีองค์ประกอบที่น่าสนใจ กล่าวคือ มีสารฟลาโวนอยด์ 23.69 ± 1.94 มิลลิกรัมสมมูลเคอเซตินต่อกรัม และสารโพลีฟีนอล 39.26 ± 1.56 มิลลิกรัมสมมูลกรดทาลิกต่อกรัม อีกทั้งสารสกัดดอกบัวหลวงยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ซึ่งสัมพันธ์กับองค์ประกอบทางเคมีที่กล่าวข้างต้น และเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ช่วยป้องกันเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไม่ให้เกิดการตายเมื่อสัมผัสกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้น การศึกษาเพื่อประเมินศักยภาพในการป้องกันการทำลายและกระบวนการชราของเซลล์ชนิดนี้ จะช่วยเพิ่มข้อมูลพื้นฐานทางชีวเคมีของสารพฤกษเคมีและเกิดประโยชน์ต่อการส่งเสริมสุขภาพเซลล์ผิว

คำสำคัญ: ดอกบัวหลวง, เซลล์ไฟโบรบลาสต์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, โพลีฟีนอล, สารต้านอนุมูลอิสระ

¹ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

Abstract

Dermal fibroblasts play a key role in maintaining skin homeostasis by synthesizing and degrading extracellular matrix components. Oxidative stress induced by reactive oxygen species is harmful to the cells, resulting in cellular senescence and premature cell death. The present research work was aimed to evaluate whether *Nelumbo nucifera* petal extract prevents oxidative stress-induced cell death. Fibroblast cells were exposed to various concentrations of *N. nucifera* extract (0-1,000 $\mu\text{g/ml}$) prior to hydrogen peroxide (H_2O_2) treatment (400 μM). The extract (400-1,000 $\mu\text{g/ml}$) could increase cell viability significantly after 48-hr H_2O_2 exposure, while the extract itself was not toxic. Furthermore, the extract was rich in flavonoid and polyphenol content, 26.39 ± 1.94 mgQE/g and 39.26 ± 1.56 mgGAE/g, respectively. That confirmed the *in vitro* antiradical activity against DPPH and ferric-reducing power. The antioxidant activity of the extract might be plausible for preventing hydrogen peroxide-induced cell death in dermal fibroblasts. Further study should consider the potential of *N. nucifera* in fibroblast senescence model for anti-aging effect of it.

Keywords: *Nelumbo nucifera*, Fibroblast, Hydrogen peroxide, Polyphenol, Antioxidant

บทนำ

ผิวหนังของมนุษย์ต้องเผชิญกับมลภาวะอันเป็นสาเหตุของการสะสมสารอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสามารถรบกวนการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนัง (dermal fibroblast) นอกเหนือจากการถูกทำลายด้วยรังสียูวี [1] หลักฐานจากงานวิจัยบ่งชี้ถึงผลกระทบต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนัง (dermal fibroblast) โดยจะกระตุ้นให้เกิดการชราของเซลล์ดังกล่าวก่อนเวลาอันควร เมื่อได้สัมผัสกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) สมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระและการทำงานของไมโทคอนเดรียถูกรบกวน จนนำไปสู่การตายของเซลล์ เมื่อเกิดการสะสมภาวะเครียดออกซิเดชันอย่างต่อเนื่อง [2-4] ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จึงได้ถูกใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิจัยเพื่อเหนี่ยวนำกระบวนการชราก่อนเวลาอันควร (premature senescence) เพราะใช้ระยะเวลาไม่นานก็เห็นผล [3] อีกทั้งพบว่าสารดังกล่าวเมื่อใช้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันจะก่อให้เกิดความผิดปกติและทำลายเซลล์ได้แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครโมลาร์ จะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะชราของเซลล์ อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลง ขณะที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นระหว่าง 300-400 ไมโครโมลาร์ จะเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

(apoptosis) อย่างรวดเร็วภายใน 48 ชั่วโมง [4] ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบบจำลองการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะเกิดประโยชน์ในงานวิจัยพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สุขภาพในการศึกษาศักยภาพการต้านการทำลายเซลล์ของสารพฤกษเคมี ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้เผยให้เห็นถึงคุณสมบัติเด่นของสารจำพวก phytonutrients ในการปกป้องเซลล์ดังกล่าวจากสารอนุมูลอิสระ [4-6]

แนวโน้มการบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชธรรมชาติเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในประชากรทั่วโลก ในแถบเอเชียมีดอกไม้หลายชนิดที่มีสาร phytonutrients และคุณค่าทางโภชนาการที่มีคุณประโยชน์ต่อมนุษย์จากการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของดอกบัวหลวงหรือ sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) และพบว่าอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีกลุ่มแอนโทไซยานินและฟลาโวนอยด์ จึงมีการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดเพื่อใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์บำรุงผิวพรรณ งานวิจัยของ Yang และคณะพบว่านอกจากจะมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ตัวสำคัญ ได้แก่ flavonol glycosides, myricetin 3-O-galactoside, quercetin-3-O-rhamnoside และ kaempferol-3-O-galactoside แล้วกลีบบัวหลวงยังมีสารแอนโทไซยานิน โดยตัวที่พบในปริมาณสูง ได้แก่ cyanidin 3-O-glucoside และ delphinidin 3-O-glucoside [7-8] ในประเทศจีน ตำราแพทย์แผนจีนมีการกล่าวอ้างสรรพคุณในการทำให้ง่ายต่อการ

คล้าย ช่วยให้นอนหลับในผู้ป่วยโรคนอนไม่หลับ [9-10] ในประเทศไทย พบการใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของดอกบัวหลวงในการประกอบอาหารและทำเป็นชาดื่ม ส่วนของกลีบดอกสีชมพูจะมีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มโพลีฟีนอลสูง มีแร่ธาตุและใยอาหาร [11- 12] จึงมีการบริโภคกันแพร่หลาย นอกเหนือจากเมล็ดและเกสรที่ช่วยบำรุงหัวใจ และต้านโรคอัลไซเมอร์ [11] อีกทั้งมีการวิจัยศึกษาบทบาทของสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในการส่งเสริมสุขภาพผิว โดย Phimnuan และคณะ [13] รายงานฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ผิว ได้แก่ keratinocyte และ melanocyte ของสารสกัดเกสรบัวหลวง (lotus stamen) เมื่อเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีและสารก่ออักเสบ (TNF- α , IL-6) อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของสารสกัดกลีบดอกบัวหลวงด้วยแบบจำลองที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ของสารสกัดกลีบดอกบัวหลวงในการป้องกันเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมถึงศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย

วัสดุ และวิธีการ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาปริมาณสาร ประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมถึงสารมาตรฐานเป็น analytical grade จากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical และ Merck Co. (St. Louis, MO, USA) ส่วนสารเคมีและอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's minimum essential medium (EMEM) fetal bovine serum (FBS) และ antibiotic-antimycotic reagent จากบริษัท Fisher Scientific Co. (California, USA)

ตัวอย่างดอกบัวหลวงและการเตรียมสารสกัด

ดอกบัวหลวงที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จากกว้านพะเยา พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา โดยเก็บในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564 ตัวอย่างดอกบัวหลวงอ้างอิงงานวิจัย (voucher specimen) คือ QBG No. 130723 เก็บ ณ หอพรรณไม้ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ทำการสกัดด้วยน้ำร้อน โดยนำกลีบดอกบัวหลวงแห้ง 50 กรัม แช่และคนในน้ำปราศจากออกซิเจน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทิ้งไว้ให้เย็น ณ อุณหภูมิห้อง กรองเอากากออกจากส่วนน้ำโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งภายใต้ความเย็นด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Christ, Alpha 1-4 LSCbasic, Germany) เก็บสารสกัดไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ทดสอบ โดยร้อยละการได้กลับคืน (% yield) เฉลี่ยเท่ากับ 5.33

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ประยุกต์ใช้วิธีของ Ainsworth และ Gillespie [14] ในการหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้ Folin-Ciocalteu method ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในสารละลายจะทำปฏิกิริยากับสารละลาย 50% Folin Ciocalteu's phenol ได้สารละลายสีฟ้าน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Agilent Biotek, Cytation 5, USA) และคำนวณปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดกัลลิก (mg GAE/g)

การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยใช้ aluminum chloride colorimetric method [15] โดยบ่มสารสกัดร่วมกับ 95% ethanol, 10% AlCl_3 , 1 M potassium acetate และน้ำปราศจากอ็อกซิเจน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Agilent Biotek, Cytation 5, USA) คำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยเทียบในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ quercetin (mg QE/g)

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical scavenging assay และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

การเข้าจับสารอนุมูลอิสระเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชในการศึกษานี้ประยุกต์ใช้ DPPH radical scavenging assay [16] เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกบัวหลวง โดยบ่มสารสกัดร่วมกับสารละลาย 80 mM DPPH เป็นเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานสำหรับกลุ่มควบคุมบวก เมื่อครบเวลา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Agilent Biotek, Cytation 5, USA) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะแสดงในรูปของความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถจับกับอนุมูล DPPH ได้กึ่งหนึ่ง หรือ 50% inhibitory concentration (IC_{50})

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe(III) หรือ FRAP assay ได้ประยุกต์วิธีของ Benzie & Strain [17] ซึ่งเป็นการทดสอบที่นิยมใช้ในการประเมินความสามารถของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดจากพืชในการต้านออกซิเดชัน โดยวัดการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2^{3+}$ เมื่อทำการบ่มสารสกัดร่วมกับสาร 2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 mM ร่วมกับ 20 mM FeCl_3 ใน 300 mM acetate buffer (pH 3.6) ทิ้งไว้ 4 นาที

แล้ววัดผลการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่นด้วย microplate reader 593 นาโนเมตร (Agilent Biotek, Cytation 5, USA) คำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือ FRAP value โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน แสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของ trolox (mg trolox equivalent/g extract)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (CRL-2522™, ATCC) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ EMEM ที่ผสม 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate และ 1,500 mg/L sodium bicarbonate สภาวะบ่มเซลล์ คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% carbon dioxide เมื่อเซลล์เจริญได้ 80% confluency ทำการแบ่งเลี้ยงในจานเลี้ยง 96 หลุม หลุมละ 1,000 cells/well เพื่อใช้ทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ [2], [18]

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดดอกบัวหลวง

ประยุกต์ใช้วิธีของ Charoensin [19] โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยง 96 หลุมครบ 24 ชั่วโมงแล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงออก และบ่มเซลล์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ช่วงความเข้มข้น 0-400 μM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง อีกการทดลองเพื่อทดสอบความปลอดภัยของสารสกัดดอกบัวหลวง จะบ่มสารสกัดความเข้มข้น 0-1,000 $\mu\text{g/ml}$ ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา .ดูดเอาสารทดสอบออก และล้างด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) เพื่อล้างเอาสารทดสอบที่หลงเหลือออกจากนั้นเติมสารละลาย MTT (5 mg/ml) ปริมาตร 20 $\mu\text{l/well}$ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดเอาสารละลาย MTT ออก และเติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 $\mu\text{l/well}$ เพื่อละลายผลึก formazan สุดท้ายนำสารละลายในจานเลี้ยงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540/630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Agilent Biotek, Cytation 5, USA) รายงานเป็นค่าร้อยละของ cell viability

การวิเคราะห์ข้อมูลและการใช้สถิติ

ผลการศึกษานี้แสดงด้วยค่า $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ในส่วนของการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเลือกใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ One-way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วย Turkey's post-hoc test

ผลการศึกษา

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดดอกบัวหลวง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารสกัดดอกบัวหลวงมาวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญพื้นฐาน ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่มีรายงาน

ว่าพบในปริมาณสูงในกลีบบัวหลวง ผลการวิเคราะห์ปริมาณ พบว่า กลีบบัวหลวงที่เก็บจากก้านพะเยาเมื่อนำมาสกัดจะได้ $\% \text{yield} = 5.33\%$ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ $39.26 \pm 1.56 \text{ mgGAE/g}$ และ $26.39 \pm 1.94 \text{ mgQE/g}$ ตามลำดับ ซึ่งองค์ประกอบนี้สัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย DPPH assay และ FRAP assay (ตารางที่ 1) กล่าวคือ สารสกัดจับกับอนุมูล DPPH ($\text{IC}_{50} = 0.15 \pm 0.02 \text{ mg/ml}$) มีความสามารถรีดิวซ์เหล็กจากรูป Ferric (Fe^{3+}) เป็น Ferrous (Fe^{2+}) นอกจากนี้ ปริมาณของแอนโทไซยานิน (เทียบกับ cyanidin-3-glucoside) ในสารสกัดที่หาด้วยวิธี pH differential จะพบอยู่ที่ $0.094 \pm 0.001 \text{ mg/g}$

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดดอกบัวหลวง

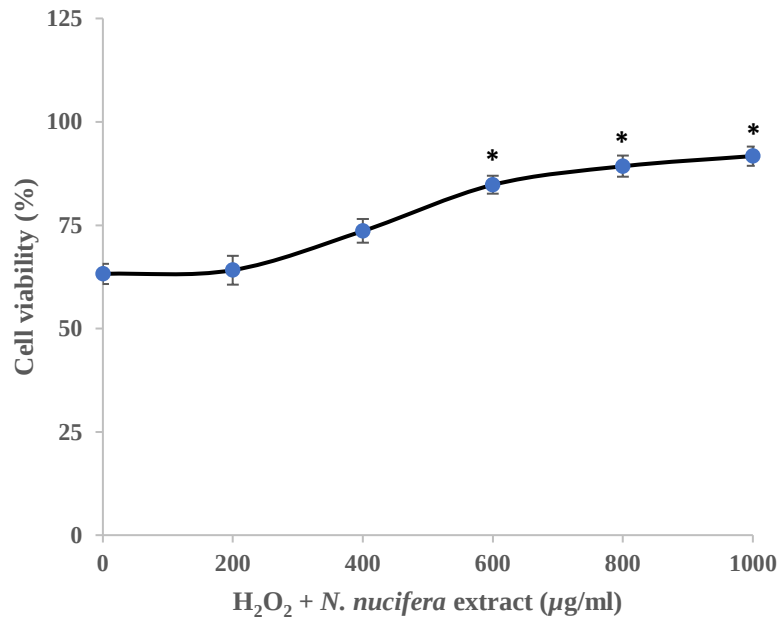
Parameters	Value	
DPPH free radical scavenging activity	0.15 ± 0.02	mg/ml (IC_{50})
Ferric reducing antioxidant power	62.40 ± 0.14	mg TE/g
Content		
Total phenolic content	39.26 ± 1.56	mgGAE/g
Total flavonoid content	26.39 ± 1.94	mgQE/g

การทดลองแต่ละความเข้มข้นแบบ triplicate แสดงในรูป $\text{mean} \pm \text{SEM}$

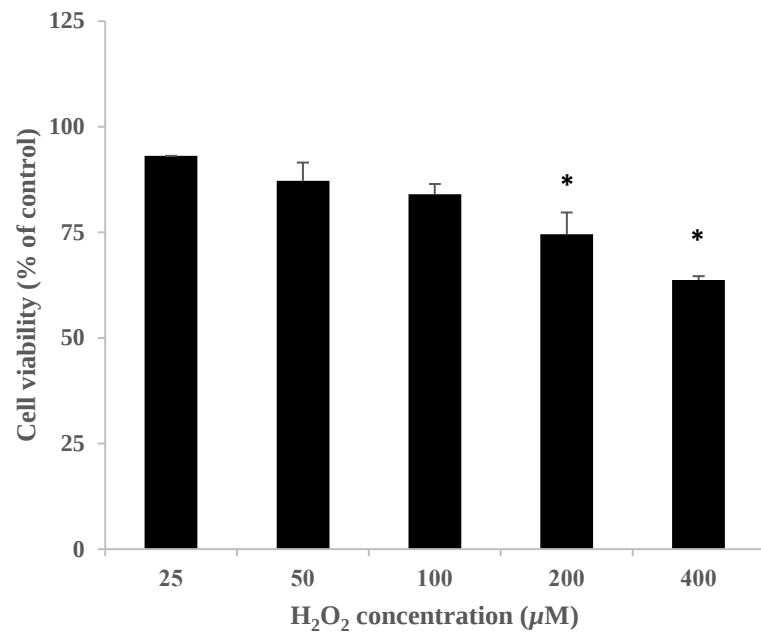
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารสกัดดอกบัวหลวง

การบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับสารสกัดดอกบัวหลวง ช่วงความเข้มข้น 0-1,000 $\mu\text{g/ml}$ ช่วยป้องกันการการทำลายเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รูปที่ 1A แสดงแนวโน้มการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยพบว่าเซลล์กลุ่มควบคุมบวกที่ได้สัมผัสเฉพาะสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 400 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จะมีชีวิตรอดลดลง เหลือโดยเฉลี่ยร้อยละ 60 ขณะที่เซลล์กลุ่มทดสอบที่ pre-treat ด้วยสารสกัด 200-1,000 $\mu\text{g/ml}$ ก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มทดสอบแบบแปรผันกับความเข้มข้นของสารสกัด การได้รับสารสกัดความเข้มข้น 600-1,000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ถึงร้อยละ 90 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ไกล่เคียงกับการเจริญของเซลล์กลุ่มควบคุมลบ ความเข้มข้นของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เลือกใช้ในการทดลองได้จากการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0-400 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 1B)



(A)



(B)

รูปที่ 1 ผลเชิงป้องกันของสารสกัดดอกบัวหลวงในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่สัมผัสกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

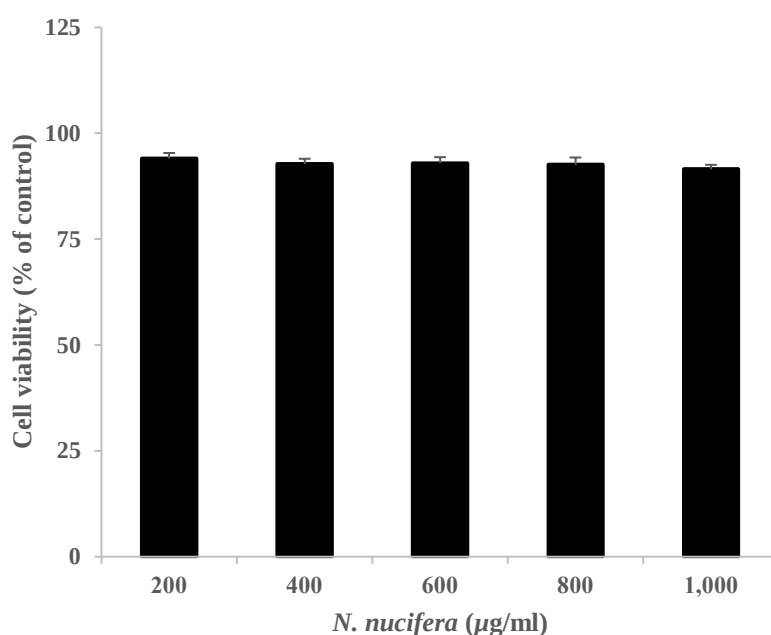
(A) เซลล์ได้รับการ pre-treat ด้วยสารสกัดดอกบัวหลวง ความเข้มข้น 0-1,000 µg/ml 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น บ่มร่วมกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 400 µM

(B) แสดงแนวโน้มการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ได้รับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ช่วงความเข้มข้น 0-400 µg/ml สัญลักษณ์ * แสดงค่าเฉลี่ยการมีชีวิตของเซลล์กลุ่มทดสอบที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์กลุ่มควบคุมบวก ($p < 0.05$, triplicate) แสดงด้วยค่า mean ± SEM

สารสกัดดอกบัวหลวงป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ไฟโบร بلاสต์และเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ประเมินความปลอดภัย อัตราการรอดชีวิต และ ผลต่อการเจริญของสารสกัดดอกบัวหลวงในเซลล์ไฟโบรพลาสต์ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยง 96 หลุม (1,000 cells/well) 24 ชั่วโมงให้หลัง บ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดความเข้มข้น 0-1,000 $\mu\text{g/ml}$ อีก 48 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาทำการวัด mitochondrial activity โดยวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ mitochondrial reductase ในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน MTT (สีเหลือง) ให้เป็นสารผลิตภัณฑ์สีม่วง (ผลิตภัณฑ์ formazan) ผลการทดลองทำให้ทราบว่าสารสกัดดอกบัวหลวงในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่ได้ทำให้เซลล์บาดเจ็บ หรือตายอย่างมีนัยสำคัญ เซลล์สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนเทียบเคียงกับเซลล์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 2 cell viability แสดงในรูปร้อยละของกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดดอกบัวหลวงต่อการมีชีวิตรอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โดยบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดความเข้มข้น 0-1,000 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (triplicate) แสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM

วิจารณ์

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากการสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดกลีบดอกบัวหลวง การทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ ในระดับที่งานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่ามีความเป็นพิษทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง รวมถึงกระทบต่อ proliferation activity [20] ผลการทดลองที่ได้ให้ผลในทำนองเดียวกันคือ เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 60 การประเมินความปลอดภัยของสารสกัด โดยใช้ช่วงความเข้มข้น 0-1,000 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า ไม่กระทบต่ออัตราการรอดชีวิต และการเจริญของเซลล์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การใช้สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของดอกบัวหลวงไม่ว่าจะเป็นกลีบ เกสร ใบ หรือเมล็ดนั้น มีความปลอดภัยหากใช้ในปริมาณที่เหมาะสม [12], [21] อีกทั้งยังพบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งกลไกแบบ single electron transfer (SET) และ hydrogen atom transfer (HAT) [11]

นอกจากนี้ งานวิจัยของ Yang และคณะ[7] ยังพบว่า นอกจากจะมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ มากถึง 15 ชนิดแล้ว กลีบบัวหลวงยังมีสารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ตัวหลักที่พบปริมาณสูง ได้แก่ cyanidin 3-O-glucoside และ delphinidin 3-O-glucoside [8] การมีองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มี

คุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระเช่นนี้ ทำให้ดอกบัวหลวงได้รับความสนใจในแง่ของการนำไปศึกษาฤทธิ์ในการต้านความเสื่อมหรือโรคเรื้อรัง อันมีสาเหตุจากภาวะความไม่สมดุลของสารอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการเสริมสุขภาพและการชะลอความเสื่อมของเซลล์ผิว เพราะพบว่าสารสกัดจากดอกและเมล็ดช่วยให้ผิวขาวและต้านริ้วรอย

เมื่อทดสอบด้วยวิธี adenosine inhibition และ elastase inhibition [8] งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดส่วนน้ำของกลีบดอกบัวหลวงในการลดพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีคุณสมบัติก่อภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress-induced premature senescence เมื่อเซลล์ได้รับสารดังกล่าวในความเข้มข้นต่ำ [3], [18] อีกทั้งสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ เมื่อสัมผัสในความเข้มข้นสูง 400 $\mu\text{g/ml}$ หรือมากกว่า [22] สารสกัดสามารถลดความเป็นพิษ และลดการตายของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ก่อนที่จะสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารสกัดเองไม่ได้กระทบต่อการตายของเซลล์แต่อย่างใด เมื่อใช้ความเข้มข้นระหว่าง 0-1,000 $\mu\text{g/ml}$ คุณสมบัติในการปกป้องเซลล์ของสารสกัดอาจเนื่องมาจากการจับกับ hydroxyl radical ($\text{OH}^\bullet$) ที่เกิดขึ้นภายหลังที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือไปปรับเปลี่ยน (modulate) การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ glutathione peroxidase และ catalase [20] รวมถึง peroxiredoxin ในไมโทคอนเดรีย [23], [24] อีกทั้งพบว่าสารฟลาโวนอยด์ยังช่วยลดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) จากการยับยั้ง complex I และ cytochrome c [25] ซึ่งกลไกที่ได้กล่าวถึงนั้น พบว่าสัมพันธ์กับความสามารถของสารฟลาโวนอยด์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการมีปฏิสัมพันธ์กับสารชีวโมเลกุลในระดับ subcellular ซึ่งเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อยอต่อองค์ความรู้ และการประยุกต์ใช้ดอกบัวหลวงในแบบจำลองการต้านภาวะชราของเซลล์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณรายได้คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2564 (MS202002) ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.อัจนราภรณ์ อ่อนตะวงศ์ สำหรับความอนุเคราะห์ hydrogen peroxide คุณพัชรินทร์ ใจข้อ และคุณสุวัฒน์ศักดิ์ ด้านศักดิ์ดา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับการใช้เครื่องมือในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] Herb M, Gluscho A, Schramm M. Reactive Oxygen Species: Not Omnipresent but Important in Many Locations. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:716406.
- [2] Brun C, Jean-Louis F, Oddos T, Bagot M, Bensussan A, Michel L. Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):113-9.
- [3] Chen JH, Ozanne SE, Hales CN. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. *Methods Mol Biol.* 2007;371:179-89.
- [4] Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB, Kola I. Response of a primary human fibroblast cell line to H_2O_2 : senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ.* 1997;8(5):589-98.
- [5] Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 2012;196:67-76.
- [6] Domaszewska-Szostek A, Puzianowska-Kuznicka M, Kurylowicz A. Flavonoids in Skin Senescence Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13).

- [7] Yang RZ, Wei XL, Gao FF, Wang LS, Zhang HJ, Xu YJ, et al. Simultaneous analysis of anthocyanins and flavonols in petals of lotus (*Nelumbo*) cultivars by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009;1216(1): 106-12.
- [8] Kim T, Kim HJ, Cho SK, Baek H, Jeon HY, Kim B, et al. *Nelumbo nucifera* extracts as whitening and anti-wrinkle cosmetic agent. *Korean J Chem Engineer*. 2011;28:424-27.
- [9] Chen G, Zhu M, Guo M. Research advances in traditional and modern use of *Nelumbo nucifera*: phytochemicals, health promoting activities and beyond. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(sup1):S189-S209.
- [10] Limwachiranon J, Huang H, Shi Z, Li L, Luo Z. Lotus Flavonoids and Phenolic Acids: Health Promotion and Safe Consumption Dosages. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2018;17(2):458-71.
- [11] Temviriyankul P, Sritalahareuthai V, Promyos N, Thangsiri S, Pruesapan K, Srinuanchai W, et al. The Effect of Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera*) and Its Mixtures on Phenolic Profiles, Antioxidant Activities, and Inhibitions of the Key Enzymes Relevant to Alzheimer's Disease. *Molecules*. 2020;25(16).
- [12] La-Ongsri W, Trisonthi C, Balslev H. Management and use of *Nelumbo nucifera* Gaertn. in Thai wetlands. *Wetl Ecol Manag*. 2008;17:279-89.
- [13] Phimnuan P, Rukchay R, Tiraravesit NW, S.Chaturratsamee, S., Pittayanurak P, Reutrakul V, Viyoch J. Protective effects of lotus stamen extract on UV-B-irradiated skin cells activities. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2020;42(2):383-90.
- [14] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*. 2007;2(4):875-7.
- [15] da Silva LA, Pezzini BR, Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacogn Mag*. 2015;11(41):96-101.
- [16] Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412-22.
- [17] Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.
- [18] Wang Z, Wei D, Xiao H. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. *Methods Mol Biol*. 2013;1048:135-44.
- [19] Charoensin S. Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *J Med Plant Res*. 2014;527:3-19.
- [20] Marinho HS, Cyrne L, Cadenas E, Antunes F. The cellular steady-state of H₂O₂: latency concepts and gradients. *Methods Enzymol*. 2013;527:3-19.

- [21] Kunanusorn P, Panthong A, Pittayanurak P, Wanauppathamkul S, Nathasaen N, Reutrakul V. Acute and subchronic oral toxicity studies of *Nelumbo nucifera* stamens extract in rats. J Ethnopharmacol. 2011;134(3):789-95.
- [22] Park WH. H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest. Mol Med Rep. 2013;7(4):1235-40.
- [23] Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. Biochem J. 2009;425(2):313-25.
- [24] Rhee SG, Kil IS. Mitochondrial H₂O₂ signaling is controlled by the concerted action of peroxiredoxin III and sulfiredoxin: Linking mitochondrial function to circadian rhythm. Free Radic Biol Med. 2016;100:73-80.
- [25] Lagoa R, Graziani I, Lopez-Sanchez C, Garcia-Martinez V, Gutierrez-Merino C. Complex I and cytochrome *c* are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2011;1807(12):1562-72.