

ฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของสารสกัดลูกใต้ใบและสารสกัดรางจืดต่อเคราตินocytes

Wound Healing Promoting Activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. Extract and *Thunbergia laurifolia* Linn. Extract on Human Keratinocyte

อติตยา โรจนสโรจ^{1*} พรพรรณ โพธิ์ไกร¹ ปิรันธนา เลิศสถิตธนกร² และ ปิยะ วงษ์ญาณิน¹

Atittaya Rocejanasaroj^{1*} Phornpun Phokrai¹ Pirunthana Lertsatitthanakorn² and Piya Wongyanin¹

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

²ภาควิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

¹Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University

²Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University

*E-mail: Atittaya.ro@bsru.ac.th

Received: Sep 07, 2022

Revised: Oct 25, 2022

Accepted: Oct 30, 2022

บทคัดย่อ

ความผิดปกติทางผิวหนังเกิดขึ้นได้บ่อยในคนสูงอายุ และมักถูกมองข้าม จนบางครั้งอาจกลายเป็นภาวะเรื้อรังที่ยากต่อการรักษา อีกทั้งยาแผนปัจจุบันที่ใช้ในการรักษาโรคผิวหนังก็มีส่วนผสมของสเตียรอยด์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของสารสกัดลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.) และสารสกัดรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) ต่อเคราตินocytes สารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดเตรียมโดยใช้เอทานอล (80%) เป็นตัวทำละลายในการสกัด การตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีแสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดมีสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฟลาโวนอล การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้งสองชนิดต่อเคราตินocytes (เซลล์ HaCaT) โดยวิธี neutral red accumulation assay พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลด้วยวิธี scratch wound healing assay โดยติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าปิดรอยขีดบาดแผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าการใช้สารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสารสกัดสมุนไพรรางจืดที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลส่งเสริมการสมานแผลอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การให้สารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก็ให้ผลส่งเสริมการสมานแผลอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ผลการศึกษานี้ชี้ว่าสารสกัดลูกใต้ใบและสารสกัดรางจืดมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาสมานแผลบริเวณผิวหนังได้

คำสำคัญ: สารสกัดลูกใต้ใบ สารสกัดรางจืด เคราตินocytes ฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผล

Abstract

Dermatological disorders are common in elderly and often overlooked. Sometimes it can become a chronic condition that is difficult to treat. In addition, modern medicines used to treat skin diseases often contain steroids. Therefore, this research aimed to study the wound healing promoting activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. extract (PAE) and *Thunbergia laurifolia* Linn. extract (TLE) on human keratinocyte. PAE and TLE were prepared using 80% ethanol as an extraction solvent. Phytochemical screening revealed that PAE and TLE contained phenolic compounds, flavonoids, tannins and flavanols. Cytotoxic effect of PAE and TLE on human keratinocyte cell line (HaCaT cell) was determined by neutral red accumulation assay. It was found that both

extracts showed no cytotoxic effect when applied at the concentrations less than 1,000 µg/mL for 24 and 48 h. Therefore, PAE and TLE at the concentrations of 200, 400, 600 and 800 µg/mL were used to investigate their wound healing promoting activity using scratch wound healing assay by examining cell migration to fill the scratch gap at 24 and 48 h. It was found that treatment with PAE at the concentrations of 600 and 800 µg/mL for 48 h and with TLE at the concentration of 600 µg/mL for 48 h showed significant wound healing activity. Furthermore, treatment with PAE at the concentration of 800 µg/mL for 24 h also showed significant wound healing activity. The results of this study indicated that PAE and TLE had potential to be developed as skin wound healing agents.

Keywords: *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. extract, *Thunbergia laurifolia* Linn. extract, Human keratinocyte, Wound healing promoting activity

1. บทนำ

ปัจจุบันการพัฒนาด้านสาธารณสุขและเทคโนโลยีทางการแพทย์ ส่งผลให้ประชากรมีอายุเฉลี่ยที่มากขึ้น หลายประเทศรวมถึงประเทศไทยมีสัดส่วนผู้สูงอายุต่อผู้ที่อยู่ในวัยทำงานเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มจะกลายเป็นสังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ในอีกไม่ช้า เมื่อสูงอายุขึ้น ร่างกายย่อมมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นหลายอย่างทั้งการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตเห็นได้และการเปลี่ยนแปลงเสื่อมชราของอวัยวะภายในที่สังเกตเห็นได้ยาก ความเสื่อมทางผิวหนังเป็นการเปลี่ยนแปลงทางร่างกายที่สามารถสังเกตเห็นได้เป็นอันดับแรก ๆ เนื่องจากผิวหนังได้รับผลกระทบจากปัจจัยภายนอก (Extrinsic aging) ทั้งสารพิษและมลภาวะ เช่น ฝุ่น ควัน รังสี ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet radiation) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลให้ผิวหนังเสื่อมสภาพ ความชราที่เกิดจากการได้รับรังสีนี้เรียกว่า Photoaging [1] ปัจจัยความเสื่อมทั้งจากภายนอกและภายในจะค่อย ๆ ส่งผลให้ผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลงไปทีละน้อย โครงสร้างของเซลล์ผิวหนังสูญเสียรูปร่างเดิม ชั้นผิวหนังบางลง โครงสร้างของโปรตีนคอลลาเจน (Collagen) และอีลาสติน (Elastin) ในผิวหนังชั้น Dermis มีปริมาณลดลงและมีการจับตัวเรียงต่อกันที่เปลี่ยนไป ส่งผลให้ผิวหนังมีริ้วรอยหย่อนคล้อย ต่อมาไขมันในชั้น Stratum corneum ของ Epidermis มีการผลิตและหลังไขมันเคลือบผิวลดลง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจาก Stratum corneum และกระทบการทำงานของเอนไซม์ในชั้นผิวหนัง ผิวหนังผู้สูงอายุจึงมักมีลักษณะแห้งเป็นขุย แดงเป็นสะเก็ด (Xerosis cutis) คัน (Pruritus) ความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมน้อยลง นอกจากนี้เซลล์ผิวหนังที่เสื่อมสภาพจะสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ลดลง เซลล์ต้นกำเนิดซึ่งทำหน้าที่แบ่งตัวเพิ่มเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์เดิมที่เสื่อมสภาพมีปริมาณลดลง รวมถึงเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันซึ่งทำหน้าที่ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์และขจัดเซลล์ที่ผิดปกติที่เกิดขึ้นในชั้น

ผิวหนังมีการทำงานเปลี่ยนแปลงไป ผู้สูงอายุจึงมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งผิวหนังและติดเชื้อที่ผิวหนังได้ง่ายกว่าผู้ที่มีอายุน้อย เซลล์ผิวหนังที่มีอายุนั้นจะหลั่งสารก่ออักเสบมากขึ้น ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้ผิวหนังเสื่อมสภาพเร็วขึ้นและไม่สามารถฟื้นตัวเข้าสู่กระบวนการฟื้นฟูซ่อมแซมได้ การที่ผิวหนังชั้น Epidermis และ Dermis บางลงประกอบกับลักษณะ Xerosis cutis นี้จะเพิ่มความเสี่ยงให้ผู้สูงอายุเกิดการบาดเจ็บจากผิวหนังฉีกขาดหรือเป็นแผลจากแรงกดทับได้ง่าย

ปัญหาผิวหนังในผู้สูงอายุมักเป็นภาวะเรื้อรัง รักษาได้ยาก ส่งผลกระทบต่อทั้งทางด้านร่างกาย จิตใจ อารมณ์ สังคม และเศรษฐกิจ มีคุณภาพชีวิตลดลง อีกทั้งเภสัชภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาภาวะความผิดปกติของผิวหนังในปัจจุบันล้วนเป็นตัวยาแผนปัจจุบัน นอกจากนี้ยารักษาอาการแห้งอักเสบและผื่นแพ้ที่ผิวหนังมักเป็นยาที่มีส่วนผสมของสเตียรอยด์ เช่น Betamethasone, Amcinonide หรือ Desoximetasone ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์แบบไม่จำเพาะ อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงเมื่อใช้ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลาอันยาวนาน เช่น Epidermal thinning, Stellate scar, Blot hemorrhage, Dermal atrophy, Purpura, Rosacea, Miliaria hypertrichosis, Tachyphylaxis และ Masking microbial infections ผลที่เกิดขึ้นบางกรณีจะไม่สามารถแก้ไขได้ และรอยโรคอาจคงอยู่ถาวรตลอดไป หากปรับมาใช้ในการบริบาลสุขภาพเชิงป้องกันโดยเน้นไปที่การส่งเสริมกระบวนการชะลอการเสื่อมของสุขภาพผิวหนัง ป้องกันมิให้เกิดปัญหาของผิวหนังในวงกว้างตั้งแต่เริ่มแรก จึงน่าจะเป็นกลยุทธ์ในการจัดการปัญหาสุขภาพผิวหนังที่ดีกว่า ดังนั้นจึงมีความพยายามในการค้นหาและพัฒนาเภสัชภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมรักษาโรคผิวหนังที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ (Cell specificity) มากขึ้น เพื่อลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาแบบเดิม การศึกษาฤทธิ์ต่อผิวหนังในปัจจุบันจึงมุ่งเป้าไปที่สาร Non-nutrients หรือ

Bioactive compounds ที่เป็นส่วนประกอบของพืชผักสมุนไพรในธรรมชาติที่มีการนำมาใช้บำรุงผิวหนังตั้งแต่อดีต เช่น สารในกลุ่ม phenolic acids จากต้นมะกอก [2] สาร Naringenin หรือ Catechins ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids พบมากในผลไม้รสเปรี้ยว ชาเขียว [3], [4], Stilbenes จากองุ่น [5], Lignans จากเมล็ด Flaxseed [6] หรือ Astaxanthin [7] ที่พบมากในสาหร่ายสีแดง ตัวอย่างสารสกัดหยาบที่มีการศึกษาผลของการสมานแผลแล้ว เช่น สารสกัดจากต้น *Ficus exasperata* [8] ต้น *Vernonia auriculifera* Hiem [9] หรือต้น *Maytenus ilicifolia* [10] จะเห็นได้ว่าสารพฤกษเคมีหรือพืชที่มีการศึกษาวิจัยเหล่านี้เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในต่างประเทศ มิได้เป็นพืชประจำถิ่นที่พบได้ในประเทศไทย หากสามารถค้นพบพืชสมุนไพรในประเทศไทยที่มีคุณสมบัติช่วยป้องกันส่งเสริมผิวหนังได้จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อประชาชนไทยมากกว่า ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.) และ รวงจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) จัดเป็นสมุนไพรที่เริ่มมีการนำมาใช้และศึกษาประโยชน์มากขึ้น โดยสมุนไพรทั้งสองชนิดมีสรรพคุณในการต้านอนุมูลอิสระ [11] สามารถยับยั้งการอักเสบได้ดี [12] สารสกัดลูกใต้ใบมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบนผิวหนัง [13] สารสกัด รวงจืดสามารถยับยั้งเอนไซม์ Matrix metalloproteinases และ Hyaluronidase [14] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัด รวงจืดต่อเคราตินไฮโดรเมทริกซ์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมและหลังการป้องกันผิวหนังชั้นนอกจากอันตรายต่าง ๆ ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ทราบสรรพคุณของลูกใต้ใบและรวงจืดในการต่อต้านพยาธิสภาพแผลของผิวหนังเพื่อนำไปพัฒนาใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการเสื่อมชราของผิวหนังต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

ตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.) และ รวงจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เก็บจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อำเภอมะนัง จังหวัดยะลา และส่งระบุลักษณะทางพฤกษ-อนุกรมวิธาน เพื่อจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิงในงานวิจัย ณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยตัวอย่างลูกใต้ใบได้รับหมายเลข herbarium number 013516 (BCU) ตัวอย่างต้น

รวงจืดได้รับหมายเลข herbarium number 013424 (BCU) หลังการทำความสะอาดและตากตัวอย่างต้นลูกใต้ใบและ รวงจืดจนแห้งแล้ว จะบดตัวอย่างลูกใต้ใบ (ทั้งต้น) และตัวอย่าง รวงจืด (ใบ) จำนวน 10 กรัมจนละเอียดและสกัดด้วยเอทานอล 80% (80% Ethanol) (Merck, Germany) ด้วยเทคนิค Cold refluxing ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการสกัดสารออกฤทธิ์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นรวบรวบสารสกัดทั้งหมดนำมากรองเพื่อขจัดสิ่งสกปรกออกก่อนด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 (Maidstone, Kent, UK) และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเทคนิค Rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความดัน 200 mbar (Heidolph Instrument, Germany) และทำเป็นผงด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ณ อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส ความดัน 400 mbar ด้วยเครื่อง Lyophilizer (Thermo Electron Corporation, USA) เก็บตัวอย่างสมุนไพรเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไปที่ -80 องศาเซลเซียส [11], [12]

2.2. การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin Ciocalteu Phenol assay ดำเนินการทดสอบตามแนวทางของ Singleton et al. [15] โดยผสมสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัด รวงจืดความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10 mM Na_2CO_3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ตั้งปฏิกิริยาต่ออีก 20 นาที จนปรากฏสีน้ำเงินขึ้น นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finland) นำผลการทดสอบที่ได้ไปเทียบกับกรดแกลลิก (Gallic acid) มาตรฐาน และรายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิโมลสมมูลของกรดแกลลิกต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (mmol Gallic acid equivalent (GAE)/kg DW)

2.3. การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) ด้วยวิธี Aluminum chloride assay ดำเนินการทดสอบตามแนวทางขั้นตอนของ

Zhishen et al. [16] โดยผสมสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กับสารละลาย 5% (w/v) NaNO_2 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย 10%(w/v) AlCl_3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ตั้งปฏิกิริยาต่ออีก 6 นาที สุดท้ายเติมสารละลาย 1.0 M NaOH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งปฏิกิริยาต่ออีก 15 นาทีจนเกิดสีชมพู นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำผลการทดสอบที่ได้ไปเทียบกับเคอร์ซีติน (Quercetin) มาตรฐาน และรายงานปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วยมิลลิโมลสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (mmol Quercetin equivalent (QE)/kg DW)

2.4. การตรวจวัดปริมาณสารประกอบแทนนิน

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนิน (Condensed tannin content) ในการทดสอบนี้ดัดแปลงจากเทคนิคของ Sun et al. [17] เมื่ออยู่ในสถานะที่เป็นกรดสายพอลิเมอร์ (Polymer) ของแทนนินจะเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวได้เป็นโมโนเมอร์ (Monomer) ที่สามารถทำปฏิกิริยาต่อกับสารประกอบวานิลลิน (Vanillin) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สารประกอบเชิงซ้อน Vanillin adduct ที่มีสีชมพูแดง ความเข้มของสีสารละลายที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณแทนนินที่มีในตัวอย่างสารสกัด การวิเคราะห์นี้ดำเนินการโดยผสมสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับน้ำยา Vanillin ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในสถานะที่เป็นกรด (Vanillin 1 กรัมใน 70% H_2SO_4 100 มิลลิลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้คาเทชิน (Catechin) เป็นสารมาตรฐาน รายงานปริมาณแทนนินในหน่วยมิลลิโมลสมมูลของคาเทชินต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (mmol Catechin equivalent (CAE)/kg DW)

2.5. การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอล

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอล (Total flavanol content) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ขั้นตอนตามแนวทางของด้วยวิธีของ Jackson et al. [18] การทดสอบเริ่มโดยผสมสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กับน้ำยา

0.1% (w/v) p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) ในสารละลาย 1.0 M HCl ในเมทานอล (Methanol) ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐาน รายงานปริมาณฟลาโวนอลในหน่วยมิลลิโมลสมมูลของคาเทชินต่อกิโลกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (mmol Catechin equivalent (CAE)/kg DW)

2.6. เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาคือเซลล์ HaCaT ซึ่งเป็น Human keratinocyte cell line (NCCS, India) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) ที่เติม 10% Heat inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA), 1% (v/v) Penicillin (100 ยูนิต (U) ต่อมิลลิลิตร) (Sigma-Aldrich, USA) และ Streptomycin (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Sigma-Aldrich, USA) เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มี CO_2 5% และความชื้นระหว่าง 80-90% เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 70-80% ของขวดเลี้ยงเซลล์ ทำการเปลี่ยนถ่ายไปขวดเพาะเลี้ยงใหม่ และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน ในการเก็บเซลล์เพื่อนำไปทดสอบต่อ จะล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution; PBS) pH 7.4 ก่อน 2 ครั้งแล้วปล่อยให้เซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยงแยกเป็นเซลล์เดี่ยวก่อนด้วยเอนไซม์ 0.25% trypsin-EDTA นาน 15 นาทีก่อนปั่นเก็บเซลล์ใน DMEM จากนั้นแบ่งตัวอย่างเซลล์มาย้อมด้วย Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA) และตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย Hemocytometer เพื่อคำนวณจำนวนเซลล์สำหรับการทดสอบขั้นต่อไป

2.7. การตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อเซลล์ HaCaT ใช้เทคนิค Neutral red accumulation assay ตามแนวทางการทดสอบของ Zhang et al. [19] การทดสอบเริ่มโดยการเตรียมเซลล์ HaCaT ไว้ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม และกำหนดให้มีจำนวนเซลล์ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 85% จากนั้นทดสอบเซลล์กับสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืด ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 2,000 และ 3,000

ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เจือจางด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ กำหนดให้กลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ เป็นเซลล์ชุดควบคุมลบ (Negative control)

เมื่อครบเวลาการทดสอบเซลล์กับสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดที่กำหนดไว้แล้ว ดูดปริมาณน้ำด้านบนออก 100 ไมโครลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสี Neutral red (3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride) (0.4% w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมการทดสอบ แล้วตั้งให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะพบตะกอนสีแดงภายในเซลล์ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนออก แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.5% ฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde), 1% แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งสารละลายนี้จะช่วยส่งเสริมเซลล์ให้เกาะกับพื้นดียิ่งขึ้น จากนั้นเติมสารละลาย 1% กรดอะซิติก (Glacial acetic acid), 50% เอทานอล (Ethanol) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปเพื่อละลายตะกอนสีที่มีภายในเซลล์ เขย่าเบา ๆ แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2500 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำด้านบนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปอ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวแสง 550 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, Finland) ผลการทดสอบแสดงในรูปร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (%Cell viability) ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\%Cell\ viability = [A_T/A_C] \times 100$$

โดย A_T = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ชุดทดสอบ

A_C = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ชุดควบคุม

การทดลองนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ สารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการทำงานของผิวหนังได้แก่ Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ (nM), Quercetin (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ (nM) และยารกระตุ้นการทำงานของเซลล์ผิวหนัง Allantoin (Glyoxyldiureide) (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) ซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นของ DMSO สุดท้ายไม่เกิน 0.1%

2.8. การทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของสารสกัดสมุนไพรใช้วิธี Scratch wound healing assay ตามแนวทางของ Chen [20] โดยเตรียมเซลล์ HaCaT ไว้ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 หลุม และกำหนดให้มีจำนวนเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม เมื่อจะทำการทดสอบต้องให้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 85% ในลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว หรือ Monolayer ก่อนทำการทดสอบ จากนั้นใช้ Pipette tip ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ขูดเซลล์ตำแหน่งกลางหลุม ให้มีรอยขีดความกว้างเฉลี่ยขนาด 1 มิลลิเมตร และล้างเซลล์ที่หลุดลอกออกมาด้วย PBS, pH 7.4 ก่อนเติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ที่ผสมสารสกัดลูกใต้ใบ สารสกัดรางจืด หรือสารมาตรฐาน ตามความเข้มข้นที่กำหนด ในกรณีของชุดควบคุมลบ (Negative control) ไม่ต้องผสมสารใด ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง จากนั้นติดตามผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration) เข้าปิดรอยขีดที่กำหนดไว้เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ภาพการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการสมานแผลถูกถ่ายภาพ ณ เวลา 0 ชั่วโมง (หลังการขูดเซลล์ทันที) 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (ZEISS, Germany) กำลังขยาย 40 เท่า อย่างน้อย 3 ภาพต่อกลุ่มตัวอย่าง และใช้โปรแกรม ZEN 3.2 (ZEISS, Germany) ในการวัดระยะความกว้างของรอยขีด โดยกำหนด ให้ระยะรอยขีด (Wound distance) เริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงของแต่ละกลุ่มเซลล์ (t_0) มีค่าเท่ากับ 100% จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงของระยะทางที่เวลาต่าง ๆ (t) กับค่าเริ่มต้นของแต่ละกลุ่มเซลล์ดังกล่าว ผลการทดสอบแสดงในรูป %Wound distance ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\%Wound\ distance =$$

$$[Wound\ distance\ at\ t / Wound\ distance\ at\ t_0] \times 100$$

สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้มี 3 ชนิด คือ Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ (nM), Quercetin (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ (nM) และ Allantoin (Glyoxyldiureide) (Sigma-Aldrich, USA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) ซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นของ DMSO สุดท้ายไม่เกิน 0.1%

2.9. การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ

ผลการทดสอบแสดงเป็นค่า mean±SD เปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้จากเซลล์แต่ละกลุ่ม ซึ่งทำการทดลองซ้ำอิสระอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในรูปแบบกราฟจัดทำด้วยโปรแกรม GraphPad prism 6.0 (GraphPad Software, USA) การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบต่าง ๆ วิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 25.0 (IBM, USA) โดยกำหนดให้ $p < 0.05$ จึงจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ผลการวิจัย

3.1. ปริมาณสารพิษของสารสกัดสมุนไพร

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฟลาโวนอลทั้งหมดจากตัวอย่างสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดในการศึกษานี้แสดงใน Table 1 โดยพบว่าสารสกัดรางจืดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่าสารสกัดลูกใต้ใบ ในขณะที่สารสกัดลูกใต้ใบมีปริมาณสารประกอบแทนนิน และสารประกอบฟลาโวนอลมากกว่าสารสกัดรางจืด

3.2. ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพร

เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผล คณะผู้วิจัยจึงทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ก่อน เซลล์ที่มีชีวิตจะจับกินเม็ดสี Neutral red สะสมไว้ในไลโซโซม (Lysosome) หากเซลล์ตายจะส่งผลทำให้ไม่สามารถจับกินเม็ดสีและกักเก็บสีไว้ในเซลล์ การวัดปริมาณสีภายในเซลล์จึงสามารถใช้สะท้อนถึงการมีชีวิตของเซลล์ทดสอบได้ ในการทดลองนี้ กำหนดให้กลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ เป็นเซลล์ชุดควบคุมลบ (Negative control) ซึ่งเซลล์ในกลุ่มนี้มีรูปร่าง การเจริญเติบโต ระดับเมแทบอลิซึม (Metabolism) และการแบ่งตัวเซลล์ (Cell proliferation) ที่ไม่ถูกรบกวนจึงถือว่าเซลล์ชุดควบคุมนี้ทั้งหมดเป็นเซลล์ที่มีชีวิต หรือมีค่า %Cell viability เท่ากับ 100%

เมื่อทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT กับสารสกัดลูกใต้ใบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่ม %Cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม

เซลล์ชุดควบคุม ($p < 0.05$) เท่ากับ 27.5%, 34.9%, 44.9%, 45.0% และ 27.5% ตามลำดับ (Figure 1A) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดลูกใต้ใบที่ใช้ทดสอบกับเซลล์เป็น 2,000 และ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดลูกใต้ใบมีผลลด %Cell viability ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ชุดควบคุม ($p < 0.05$) โดยที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Cell viability น้อยที่สุดเท่ากับ 35.4% (Figure 1A) เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบสารสกัดลูกใต้ใบกับเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 1,000, 2,000 และ 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลด %Cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ชุดควบคุม ($p < 0.05$) โดยที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Cell viability น้อยที่สุดเท่ากับ 31.6% (Figure 1A)

เมื่อทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT กับสารสกัดรางจืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อ %Cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นสูงที่สุดที่คณะผู้วิจัยใช้ มีผลลด %Cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ชุดควบคุม ($p < 0.05$) โดย %Cell viability ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 63.6% (Figure 1B) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่ม %Cell viability แต่ระดับการเพิ่มขึ้นดังกล่าวไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบสารสกัดรางจืดกับเซลล์เป็น 48 ชั่วโมง พบว่า มีเพียงสารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่านั้นที่มีผลลด %Cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ชุดควบคุม ($p < 0.05$) (Figure 1B)

ส่วนการตรวจสอบความเป็นพิษของสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการทำงานของผิวหนัง และยับยั้งการทำงานของเซลล์ผิวหนัง พบว่า Quercetin ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ Epigallocatechin-3-gallate ที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ และ Allantoin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อ %Cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่เวลาการทดสอบที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง (Figure 1C)

Table 1 Bioactive compounds found in *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. extract (PAE) and *Thunbergia laurifolia* Linn. extract (TLE)

Bioactive compounds	PAE	TLE
Total phenolic content (mmol GAE/kg DW)	379.27±24.92	808.14±92.17
Total flavonoid content (mmol QE/kg DW)	292.08±34.46	2971.08±58.19
Condensed tannin content (mmol CAE/kg DW)	4.63±0.17	0.69±0.24
Total flavanol content (mmol CAE/kg DW)	4.52±0.11	2.56±1.97

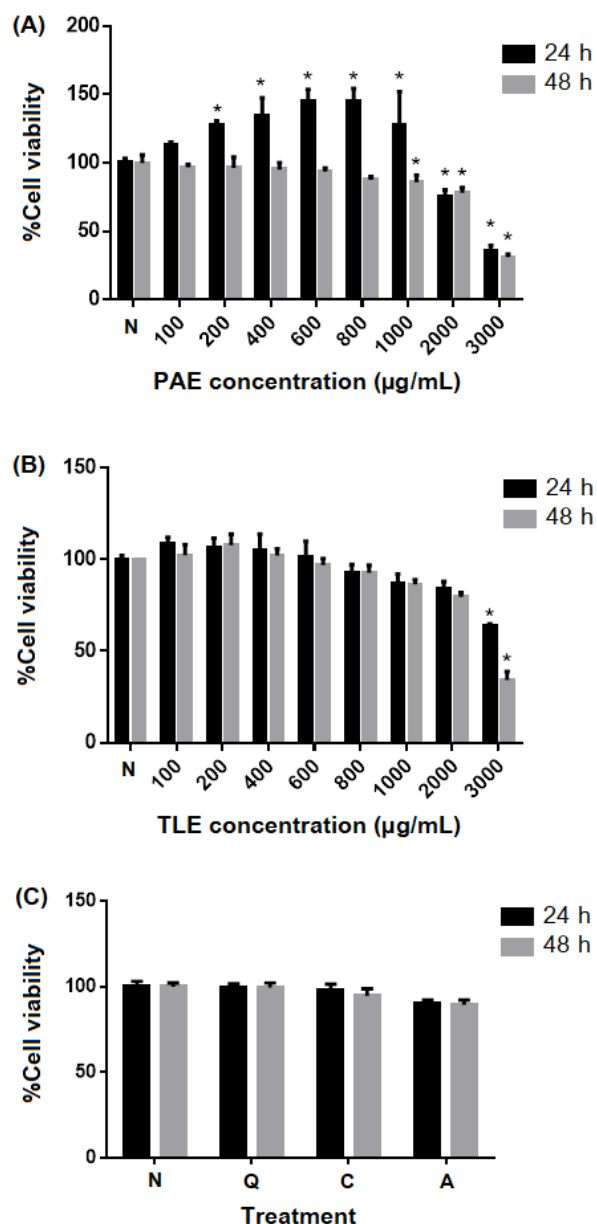


Figure 1 Cytotoxic effect of PAE (A), TLE (B) and Quercetin, Epigallocatechin-3-gallate and Allantoin (C) on HaCaT cells at 24 h (black bar) and 48 h (gray bar). Data are expressed as mean±SD (n = 3).

* indicates significant difference ($p<0.05$) compared with the negative control.

N = Negative (untreated) control, Q = Quercetin, C = Epigallocatechin-3-gallate and A = Allantoin

3.3.ฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของสารสกัดสมุนไพร

ในการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด คณะผู้วิจัยทดสอบเซลล์ HaCaT กับสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ไม่ก่อความเป็นพิษกับเซลล์

ผลการทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยงในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร และสารมาตรฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถลด %Wound distance ได้เท่ากับ 2.5%, 4.2%, 7.8% และ 13.7% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถลด %Wound distance ได้เท่ากับ 4.4%, 1.1%, 7.2% และ 8.9% ตามลำดับ ในขณะที่สารมาตรฐาน Allantoin, Epigallocatechin-3-gallate และ Quercetin สามารถลด %Wound distance ลงได้เท่ากับ 6.8%, 8.7% และ 8.4% ตามลำดับ มีเพียงกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมเท่านั้นที่มีผลลด %Wound distance ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ (Negative control) (Figure 2, Figure 3)

เมื่อติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าปิดรอยขีดต่อเนืองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถลด %Wound distance ได้เท่ากับ 8.9%, 8.8%, 15.8% และ 16.9% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถลด %Wound distance ได้เท่ากับ 6.1%, 3.1%, 14.8% และ 10.5% ตามลำดับ ในขณะที่สารมาตรฐาน Allantoin, Epigallocatechin-3-gallate และ Quercetin สามารถลด %Wound distance ลงได้ 23.2%, 22.8% และ 19.2% ตามลำดับ (Figure 2, Figure 3) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สารสกัดสมุนไพรรางจืดที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และสารมาตรฐาน Allantoin, Epigallocatechin-3-gallate และ Quercetin ให้ผลลด %Wound distance ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ (Negative control) (Figure 2, Figure 3)

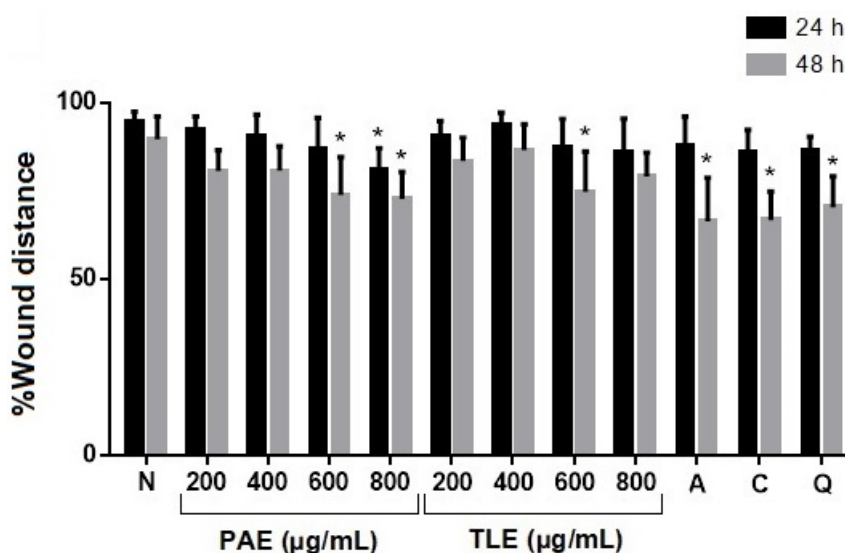


Figure 2 Wound healing activity of PAE, TLE, Allantoin, Epigallocatechin-3-gallate and Quercetin at 24 h (black bar) and 48 h (gray bar). Data are expressed as mean $\pm$ SD (n = 3).

* indicates significant difference ($p < 0.05$) compared with the negative control.

N = Negative (untreated) control, A = Allantoin, C = Epigallocatechin-3-gallate and Q = Quercetin

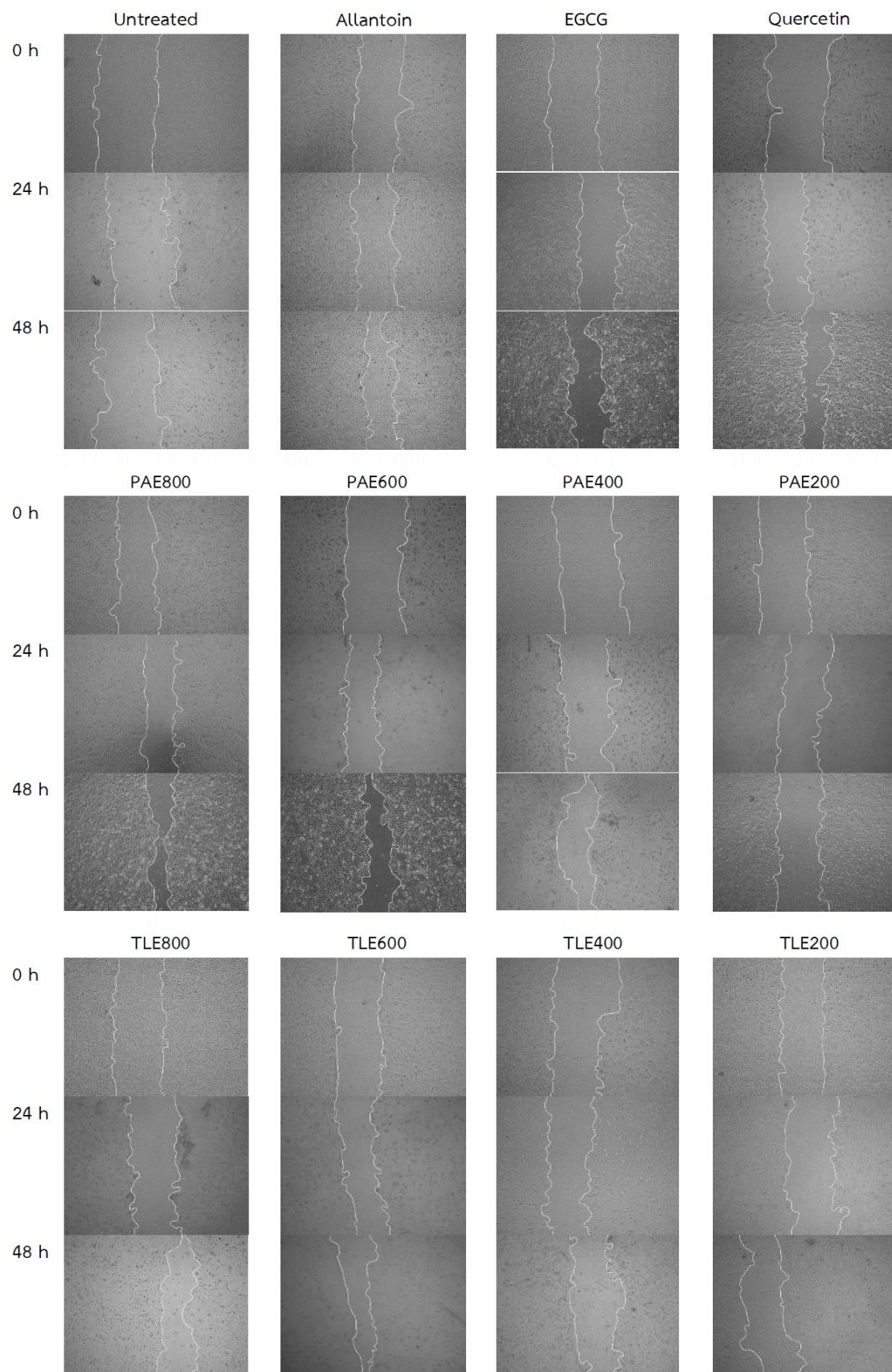


Figure 3 Wound healing assay studied on HaCaT cells after treated with PAE, TLE, Allantoin, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and Quercetin. Images were captured at 0, 24 and 48 h (40x magnification).

4. อภิปรายผลการวิจัย

การสะสมของ Reactive oxygen species (ROS) ที่เพิ่มขึ้น นับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์ผิวหนัง โดยเฉพาะเคราติโนไซต์ (Keratinocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ส่วนใหญ่ในผิวหนังชั้นนอกที่ได้รับปัจจัยเหนี่ยวนำจากภายนอก เช่น มลภาวะ รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่เร่งการสร้างอนุมูลอิสระให้เพิ่มขึ้น และปัจจัยจากภายในชั้นผิวหนังเอง เช่น การสังเคราะห์และหลั่งสารต้านอนุมูลอิสระภายในชั้นผิวที่ลดลง ปัจจัยเหล่านี้ร่วมกันส่งผลให้เคราติโนไซต์ไม่สามารถปกป้องตัวเองจากภาวะ Oxidative damage และเสื่อมชราในที่สุด การได้รับสมุนไพรที่มีสารพฤกษเคมี ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเสริมจากภายนอก จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยปรับกระบวนการเสื่อมถอยดังกล่าวนี้ให้ช้าลง ลูกใต้ใบและรางจืดเป็นสมุนไพรที่มีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดลูกใต้ใบและสารสกัดรางจืดในการส่งเสริมสุขภาพของผิวหนัง

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Neutral red accumulation assay เมื่อทำการทดสอบสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นสารสกัดตั้งแต่ 200-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่ม %Cell viability ของเซลล์ HaCaT ได้ โดยฤทธิ์ดังกล่าวนี้อาจเป็นผลที่เกิดจากคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบของลูกใต้ใบและรางจืด คณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (Cytokines) IL-6, TNF- α และ Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) จากทั้งเซลล์ HaCaT และเซลล์แมคโครเฟจ THP-1 (Macrophage THP-1) เมื่อกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วย Lipopolysaccharide (LPS) (ยังไม่ได้มีการตีพิมพ์) อนุมูลอิสระที่สะสมเพิ่มขึ้นส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีอัตราการแบ่งตัว และปรับโครงสร้างเจริญไปเป็นเซลล์ตัวเต็มวัยลดลง [21] อนุมูลอิสระเหล่านี้จะกระตุ้นให้เซลล์หลั่งสารก่อการอักเสบ (Pro-inflammatory cytokines) ซึ่งมีผลในการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ทั้งการเกาะติดพื้นผิว การเคลื่อนที่ และแบ่งตัวของเซลล์ [22], [23] อย่างไรก็ตาม %Cell viability ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการที่สารสกัดสามารถกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มขึ้น หรืออาจเกิดจากสารสกัดสามารถกระตุ้นกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ทำให้เซลล์เก็บกินเม็ดสี Neutral red มากขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการตรวจสอบด้วย Colony formation assay และ การตรวจวัดระดับ ATP ภายในเซลล์ต่อไป

ในการส่งเสริมการสมานแผลในเซลล์ HaCaT ด้วยวิธี Scratch wound healing assay ซึ่งวัดอัตราการเคลื่อนที่เข้าปิดรอยขีดหรือ Wound distance คณะผู้วิจัยเลือกใช้ช่วงความเข้มข้นสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการติดตามพฤติกรรมของเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดสมุนไพรลูกใต้ใบสามารถลดระยะรอยขีดได้มากกว่าเซลล์ชุดควบคุมในลักษณะ Dose-dependent manner กล่าวคือ เมื่อใช้ความเข้มข้นในการทดสอบเพิ่มขึ้นจะส่งผลกระตุ้นให้เซลล์เคลื่อนที่ปิดรอยขีดได้มากขึ้น โดยสารสกัดลูกใต้ใบความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลด %Wound distance ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดลูกใต้ใบสามารถลดระยะรอยขีดได้ในลักษณะ Dose-dependent manner เช่นเดิม โดยสารสกัดลูกใต้ใบที่ความเข้มข้น 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลด %Wound distance ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับสารสกัดรางจืด พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลด %Wound distance ได้ใกล้เคียงกัน ทั้งที่เวลาการทดสอบที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง แต่มีเพียงสารสกัดรางจืดความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่เมื่อให้กับเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถลด %Wound distance ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการส่งเสริมการสมานแผลของ Epigallocatechin-3-gallate และ Quercetin ซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่มีส่งเสริมการสมานแผล และ Allantoin ซึ่งเป็นยากระตุ้นการทำงานของเซลล์ผิวหนังพบว่า ณ เวลาการติดตามการทดสอบ 24 ชั่วโมง สารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดขนาดรอยขีดได้มากกว่า Epigallocatechin-3-gallate, Quercetin และ Allantoin อย่างไรก็ตาม เมื่อติดตามเปรียบเทียบผลการทดสอบ ณ เวลา 48 ชั่วโมงพบว่า Epigallocatechin-3-gallate, Quercetin และ Allantoin สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ให้เข้าปิดรอยขีดได้ดีกว่าสารสกัดลูกใต้ใบและสารสกัดรางจืดในทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองที่ใช้ในการทดลอง

เทคนิค Scratch wound healing assay เป็นการศึกษาที่สะดวกและง่าย สามารถใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารทดสอบที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับ Extracellular matrix (Cell-matrix interaction)

และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ข้างเคียง (Cell-cell interaction) ผ่านการติดตามลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell migration) ได้ การศึกษาชี้ให้เห็นว่าเทคนิคนี้พบว่าสามารถใช้ติดตามพฤติกรรมเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าปิดบาดแผลได้ดี โดยคณะผู้วิจัยได้เลือกเคราตินโอไซด์เป็นเซลล์ในการทดสอบ เพื่อให้สามารถสะท้อนกระบวนการเกิดบาดแผลบนผิวหนังมนุษย์จริง

กระบวนการสมานแผลเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่มีกลไกซับซ้อน สามารถแบ่งกระบวนการ Wound healing ได้เป็น ระยะ Inflammation phase ซึ่งเป็นช่วงแรกเมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บ เซลล์จะหลั่งสารที่ก่อการอักเสบ ในช่วงนี้ร่างกายจะเริ่มตอบสนองด้วยการสังเคราะห์และหลั่งสารที่ช่วยลดการอักเสบที่ดำเนินอยู่จนฤทธิ์ของสารก่อการอักเสบจาก ระยะ Inflammation phase หดลง ก็จะเข้าสู่ระยะ Resolution phase ซึ่งเซลล์จะมีการแบ่งตัวเพื่อซ่อมแซมส่วนชิ้นผิวหนังที่เสียหายรวมทั้งจัดระเบียบโครงสร้างของชิ้นผิวหนังใหม่ (Remodeling process) กลไกที่เกิดขึ้นในระยะ Inflammatory phase จัดเป็นกลไกที่มีบทบาทในการบ่งชี้ผลลัพธ์ของกระบวนการสมานแผลที่เกิดขึ้น เนื่องจากในระยะนี้ กระบวนการสังเคราะห์สาร Pro-resolution mediators จะถูกกระตุ้นไปพร้อม ๆ กับการสังเคราะห์สารก่อการอักเสบ หากสมดุลระหว่างสารก่อการอักเสบ และสารในกระบวนการ Resolution pathway ถูกรบกวนจะส่งผลให้การอักเสบเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนเป็นการอักเสบเรื้อรัง ส่งผลให้ขั้นตอนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อส่วนที่เสียหายเกิดขึ้นต่อได้ยาก ในกรณีของผิวหนัง หลักฐานงานวิจัยชี้ว่า การคั่งสะสมของ Proinflammatory cytokine ในกลุ่ม IL-1 β , IL-6 และ TNF- α ปริมาณมากบริเวณบาดแผลมีความสัมพันธ์แปรผันกับขนาดของแผล รวมถึงการเกิดเนื้อเยื่อ Fibrous และรอยแผลเป็น [24], [25] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Qian et al. [26] ที่พบว่า IL-1 β ที่คั่งสะสมปริมาณสูงส่งผลให้แผลเกิดจากสมานได้ช้า และโอกาสการเกิดแผลเป็นมีสูง เช่นเดียวกับการแสดงออกของ TNF- α และ IL-6 ที่มากเกินไปพบว่าส่งผลรบกวนกระบวนการสมานแผล ซึ่งทั้งหมดจะนำไปสู่พยาธิสภาพโรคผิวหนังหลายแบบ การควบคุมสมดุลการอักเสบจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งที่ใช้ในการรักษาภาวะผิวหนัง โดยเฉพาะโรคผิวหนังที่เกิดในผู้สูงอายุ ซึ่งมีกลไกเกิดจากการอักเสบเป็นปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญ สารที่ช่วยส่งเสริมการสมานแผลที่ดีจึงควรมีส่วนช่วยกำจัดเหตุปัจจัยที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เข้าปรับลดการอักเสบที่มากเกินไป และกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ระยะ Resolution phase โดยเร็ว ทั้งเร่งการสังเคราะห์สาร Pro-

resolving mediators กระตุ้นกระบวนการ Efferocytosis และส่งสัญญาณให้เกิดการดึงเซลล์อักเสบจากเนื้อเยื่อคืนกลับสู่กระแสเลือด ยาลดการอักเสบในกลุ่ม Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) แม้จะสามารถบรรเทาการอักเสบในช่วงแรกได้ดีจากกลไกการเข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ไม่ให้เร่งการสังเคราะห์สาร Prostanoids ซึ่งสารในกลุ่มนี้บางชนิดเป็น Pro-resolving mediators ยา NSAIDs จึงก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลายประการ และใช้ไม่ได้ผลในระยะยาว หลักฐานงานวิจัยชี้ว่า สารประกอบฟีนอลิกจากพืชผักสมุนไพรมีคุณสมบัติดังที่กล่าวมานี้ เช่น Catechins, Quercetin, Apigenin, Kaempferol และ Resveratrol ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1 β และ TNF- α แต่สามารถส่งเสริมการสังเคราะห์ IL-10 [27]-[29] Sesamin เป็นสาร Lignans ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในงา สามารถต้านการอักเสบโดยใช้กลไกการจับกับโปรตีน Annexin A1 ซึ่งจัดเป็นสารในกระบวนการ Resolution pathway [30] นอกจากนี้ การศึกษาทางคลินิกพบว่าอาสาสมัครที่รับประทาน Plant sterols เป็นเวลา 4 สัปดาห์มีระดับ High-sensitivity c-reactive protein ในพลาสมา (Plasma) ลดลง ในขณะที่ระดับ Lipoxin A4 ซึ่งเป็นสาร Pro-resolving mediator เพิ่มขึ้น [31] ลูกใต้ใบ และรางจืดประกอบด้วยสารออกฤทธิ์หลายกลุ่ม ในการศึกษาพบว่ามีสารสกัดทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบกับเซลล์ผิวหนังนี้มีสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ สารประกอบแทนนิน และสารประกอบฟลาโวนอล อยู่ในปริมาณสูง สารประกอบเหล่านี้จึงอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้สารสกัดมีคุณสมบัติลดการอักเสบ และส่งเสริมการสมานแผล อย่างไรก็ตามสารออกฤทธิ์สำคัญของลูกใต้ใบที่มีรายงานไว้อีกกลุ่มคือสารประกอบในกลุ่ม Lignans ได้แก่ Hypophyllanthin, Phyllanthin และ Niranthin [32] Phyllanthin มีคุณสมบัติสามารถต้านการอักเสบโดยยับยั้งการเหนี่ยวนำของ interleukin (IL) -1 และ interferon- γ ลดการผลิต TNF- α ในร่างกาย [33] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Harikrishnan et al. [34] ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดลูกใต้ใบและสารสำคัญในเซลล์ U937 macrophage โดยพบว่า สาร Phyllanthin เป็นสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบหลัก โดยมีผลเปลี่ยนแปลงกระบวนการส่งสัญญาณ Mitogen activated protein kinases (MAPKs), Phosphatidylinositol 3-kinase, Nuclear factor kappa- β (NF-KB) และ Protein kinase B (PI3K/Akt) pathway และส่งผลให้กระบวนการอักเสบเกิดขึ้น

อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังพบว่า Hypophyllanthin และ Niranthin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Lignans อีก 2 ชนิดที่พบมากในพืชตระกูล *Phyllanthus* spp. สามารถยับยั้งการสร้าง Prostaglandin E2, Cyclooxygenase-2, TNF- α และ IL-1 β ในเซลล์ U937 macrophage ที่กระตุ้นให้อักเสบด้วย LPS ได้เช่นกัน [34] การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดลูกใต้ใบในสัตว์ทดลองพบว่า Lignans สามารถยับยั้งการกระตุ้นอุ้งเท้าหนูให้อักเสบด้วย Carrageenan รวมทั้งพบว่าการคั่งสะสมของ Neutrophil ในบริเวณดังกล่าวได้ดี สัมพันธ์กับระดับสารก่ออักเสบ Bradykinin, Platelet activating factor และ Endothelin-1 ในเนื้อเยื่ออุ้งเท้าของหนูทดสอบนี้ที่ลดลง [35] สารในกลุ่ม Lignans จึงอาจมีบทบาทส่งเสริมกระบวนการสมานแผลของผิวหนังได้ดีขึ้น

สารประกอบด้วยสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) และฟลาโวนอยด์ เช่น Delphinidin และ Apigenin [36] ในปริมาณสูง และยังประกอบด้วยแอลคาลอยด์ (Alkaloids) ได้แก่ Iridoid glycosides และ Grandifloric acid ซึ่งมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดรางจืดสามารถยับยั้งการกระตุ้นในหูอักเสบด้วย Ethyl phenylpropionate (EPP) และการกระตุ้นอุ้งเท้าอักเสบด้วย Carrageenan ในหนูทดลองได้ [37] สาร Iridoid glycosides นอกจากจะพบได้มากในรางจืดแล้วยังสามารถพบในพืชชนิดอื่นได้ สาร Iridoid glycosides ที่สกัดได้จากใบ *Folium syringae* สามารถต้านการอักเสบโดยการปรับลดการแสดงออกของยีน tumor necrosis factor- α และ Interleukin-6 ผ่านกลไกการปรับลดการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม NF-KB-p65 [38] สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ของ Iridoid glycosides ที่สกัดจากต้น *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo ซึ่งสามารถลดอาการอักเสบอันเกิดจากการกระตุ้นด้วย Acetic acid ในหนูทดลอง [39] จากที่กล่าวมาทั้งหมด คุณสมบัติต้านการอักเสบของสารสกัดลูกใต้ใบ และรางจืดอาจเป็นกลไกหนึ่งซึ่งช่วยให้การเคลื่อนที่ของเคราตินไนไซด์เข้าปิดซ่อมแซมบาดแผลเกิดได้เร็วขึ้น หลังการเคลื่อนที่เข้าปิดบาดแผลแล้ว เคราตินไนไซด์จะแปลงรูปร่าง (Cell differentiation) เพิ่มการสร้างโปรตีนเคลือบผิว Keratin 1 และโปรตีน Filaggrin และ Involucrin เพื่อยึดเกาะกับพื้นผิวโดยรอบ ทำให้แผลไม่ปริแตกโดยง่าย จึงนับว่าเป็นอีกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อซ่อมแซมผิวหนังที่เสียหาย การศึกษาพบว่า สารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอล และ Epigallocatechin-3-gallate สามารถกระตุ้น p57/KIP2 ส่งผลให้เซลล์สังเคราะห์โปรตีน Keratin 1 และ Filaggrin

เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ DNA และการทำงานของ Succinate dehydrogenase ในเคราตินไนไซด์ [40]

ลักษณะน่าสนใจที่คณะผู้วิจัยสังเกตพบ คือ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการออกฤทธิ์ของสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดกับ Quercetin, Epigallocatechin-3-gallate และ Allantoin เมื่อทำการติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์เพื่อปิดรอยแผลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าปิดรอยขีดบาดแผลได้เร็วกว่า Quercetin, Epigallocatechin-3-gallate และ Allantoin แต่เมื่อติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์เพื่อปิดรอยแผลเป็นระยะเวลานานขึ้น คือ 48 ชั่วโมง Quercetin, Epigallocatechin-3-gallate และ Allantoin จะแสดงผลการสมานแผลที่เด่นชัดกว่า ดังนั้นสารสกัดสมุนไพรจึงน่าจะมีประสิทธิภาพ และนำไปประยุกต์ใช้ได้มากกว่า เนื่องจากในชีวิตประจำวัน มีการทำความสะอาดผิวหนังเป็นประจำทุกวัน การชะล้างจะทำให้ตัวยาหลุดออก ยาที่ใช้ทาบริเวณบาดแผลหากมีการออกฤทธิ์ที่ช้า ย่อมส่งผลให้ประสิทธิภาพของยาไม่เป็นไปตามที่คาดหวังไว้

5. บทสรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดรางจืดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อใช้ในความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผล โดยสารสกัดลูกใต้ใบมีฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลเมื่อใช้ในความเข้มข้น 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดรางจืดมีฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลเมื่อใช้ในความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติส่งเสริมการสมานแผลในเบื้องต้นเท่านั้น จำเป็นต้องได้รับการศึกษาในเชิงลึกเพื่อให้ทราบถึงกลไกที่แท้จริงที่ทำให้สารสกัดดังกล่าวสามารถส่งเสริมการสมานแผลได้ เช่น การศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน (Gene expression) ที่เกี่ยวข้องกับส่งเสริมการสมานแผล เช่น Wound healing growth factor progranulin gene, α v integrin gene, β 5 integrin gene และ Metallothionein-encoding genes นอกจากนี้ การศึกษาในสัตว์ทดลองก็มีความจำเป็นเพื่อเป็นการยืนยันผลของสารสกัดสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้ในการกระตุ้นการสมานแผลของผิวหนัง

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental fund ประจำปีงบประมาณ 2565

7. References

- [1] Hu, S.C., Lin, C.L. and Yu, H.S. 2019. Dermoscopic assessment of xerosis severity, pigmentation pattern and vascular morphology in subjects with physiological aging and photoaging. **European Journal of Dermatology**. 29(3): 274-280.
- [2] Melguizo-Rodriguez, L. and et al. 2021. Potential effects of phenolic compounds that can be found in olive oil on wound healing. **Foods**. 10(7): 1642.
- [3] Tripathi, A. and et al. 2019. Antimicrobial and wound healing potential of dietary flavonoid naringenin. **The Natural Products Journal**. 9(1): 61-68.
- [4] Kapoor, M. and et al. 2004. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. **The American Journal of Pathology**. 165(1): 299-307.
- [5] Xueqing, Z. and et al. 2021. Resveratrol accelerates wound healing by attenuating oxidative stress-induced impairment of cell proliferation and migration. **Burns**. 47(1): 133-139.
- [6] Beroual, K. and et al. 2017. Evaluation of crude flaxseed (*Linum usitatissimum* L) oil in burn wound healing in New Zealand rabbits. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**. 14(3): 280-286.
- [7] Ritto, D. and et al. 2017. Astaxanthin induces migration in human skin keratinocytes via Rac1 activation and RhoA inhibition. **Nutrition Research and Practice**. 11(4): 275-280.
- [8] Umeh, V.N. and et al. 2014. Wound-healing activity of the aqueous leaf extract and fractions of *Ficus exasperata* (Moraceae) and its safety evaluation on albino rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. 4(4): 246-252.
- [9] Lambebo, M.K. and et al. 2021. Evaluation of wound healing activity of methanolic crude extract and solvent fractions of the leaves of *Vernonia auriculifera* Hiern (Asteraceae) in mice. **Journal of Experimental Pharmacology**. 13: 677-692.
- [10] de Moura, F.B.R. and et al. 2021. Wound healing activity of the hydroethanolic extract of the leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. 11(5): 446-456.
- [11] Rocejanasaroj, A., Tencornao, T. and Sangkitikomol, W. 2014. Effect of *Phyllanthus amarus* extract on antioxidant, and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 6(11): 176-183.
- [12] Rocejanasaroj, A. and et al. 2020. *Thunbergia laurifolia* and *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. extract decreases interleukin-1 β levels secretion in LPS-Activated THP-1 Macrophages. **PTU Journal of Science and Technology**. 1(1): 9-23. (in Thai)
- [13] Braga Ribeiro, A.M. and et al. 2019. Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin. **Microbial Pathogenesis**. 130: 242-246.
- [14] Chaiyana, W. and et al. 2020. Chemical constituents, antioxidant, anti-MMPs, and anti-hyaluronidase activities of *Thunbergia laurifolia* Lindl. leaf extracts for skin aging and skin damage prevention. **Molecules**. 25(8): 1923.

- [15] Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. 299: 152-178.
- [16] Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**. 64: 555-559.
- [17] Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46(10): 4267-4274.
- [18] Jackson, F.S. and et al. 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 71(1): 103-110.
- [19] Zhang, S.Z. and et al. 1990. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. **Cell Biology and Toxicology**. 6(2): 219-234.
- [20] Chen, Y. 2012. Scratch wound healing assay. **Bio-protocol**. 2(5): 100.
- [21] Poljsak, B. and Dahmane, R. 2012. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatology Research and Practice**. 2012: 135206.
- [22] Wedzinska, A. and et al. 2021. The effect of proinflammatory cytokines on the proliferation, migration and secretory activity of mesenchymal stem/stromal cells (WJ-MSCs) under 5% O₂ and 21% O₂ culture conditions. **Journal of Clinical Medicine**. 10(9): 1813.
- [23] Landen, N.X., Li, D. and Stahle, M. 2016. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 73(20): 3861-3885.
- [24] Werner, S. and Grose, R. 2013. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**. 83(3): 835-870.
- [25] Rohl, J. and et al. 2015. The role of inflammation in cutaneous repair. **Wound Practice and Research**. 23(1): 8-15.
- [26] Qian, L. and et al. 2016. Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. **Wound Repair and Regeneration**. 24(1): 26-34.
- [27] Cheng, A.W. and et al. 2019. Catechin attenuates TNF- α induced inflammatory response via AMPK-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. **PLoS One**. 14(5): e0217090.
- [28] Palacz-Wrobel, M. and et al. 2017. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 93: 1205-1212.
- [29] Milenkovic, M. and et al. 2010. Quercetin ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 13: 311-319.
- [30] Kabe, Y. and et al. 2020. Annexin A1 accounts for an anti-inflammatory binding target of sesamin metabolites. **NPJ Science of Food**. 20(4): 4.
- [31] Ho, X.L., Liu, J.J. and Loke, W.M. 2016. Plant sterol-enriched soy milk consumption modulates 5-lipoxygenase, 12-lipoxygenase, and myeloperoxidase activities in healthy adults - A randomized-controlled trial. **Free Radical Research**. 50(12): 1396-1407.
- [32] Patel, J.R. and et al. 2011. *Phyllanthus amarus* ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**. 138(2): 286-313.

- [33] Kiemer, A.K. and et al. 2003. *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF- κ B pathway. **Journal of Hepatology**. 38(3): 289-297.
- [34] Harikrishnan, H. and et al. 2018. Anti-inflammatory effects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. through inhibition of NF- κ B, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 18(1): 224-237.
- [35] Kassuya, C. and et al. 2005. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions, and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. **Planta Medica**. 71(8): 721-726.
- [36] Chan, E. and et al. 2013. Phytochemistry and pharmacological properties of *Thunbergia laurifolia*: A review. **Pharmacognosy Journal**. 3(24): 1-6.
- [37] Nguyen, V.T. and et al. 2017. Physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activities of crude extracts and fractions from *Phyllanthus amarus*. **Medicines (Basel)**. 4(2): 42.
- [38] Liu, X. and Wang, J. 2011. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 133(2): 780-787.
- [39] Li, M. and et al. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of iridoid glycosides extract of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo. **Fitoterapia**. 81(3): 167-172.
- [40] Hsu, S. and et al. 2003. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 306(1): 29-34.