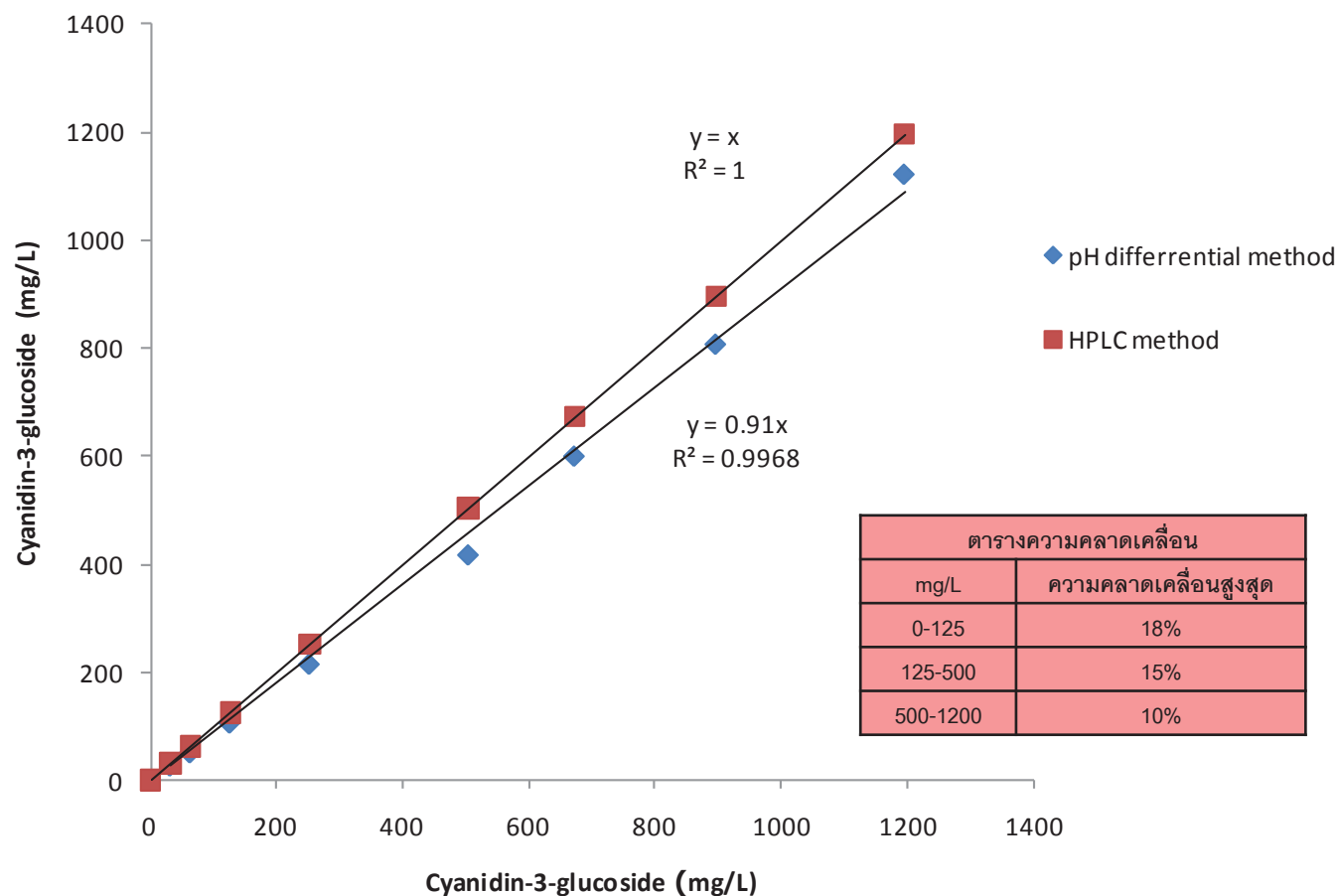
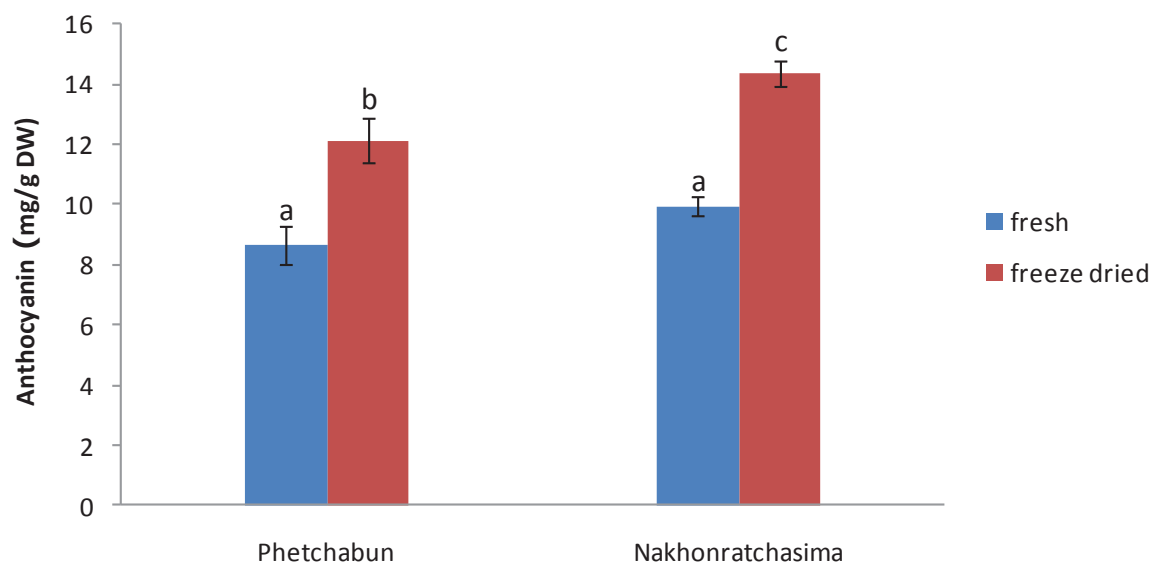


เปรียบเทียบการวิเคราะห์แอนโธไซยานินด้วยวิธี HPLC และ pH differential



ปริมาณแอนโธไซยานินในหม่อน

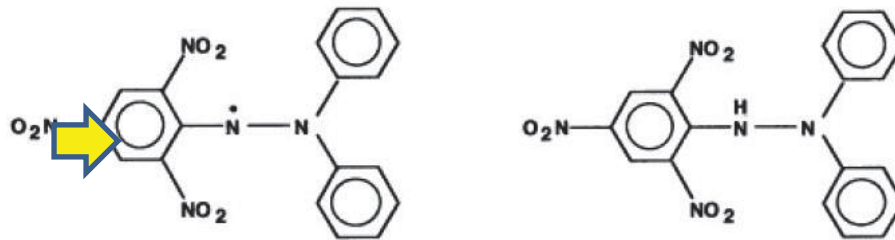
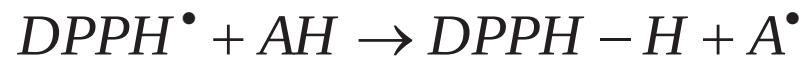


โดยที่ a, b, และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผงผลหม่อนสกัดมีปริมาณแอนโธไซยานินสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดทั้งจากเพชรบูรณ์และนครราชสีมา แต่ปริมาณแอนโธไซยานินจากแหล่งนครราชสีมาสูงกว่าเพชรบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับสีและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

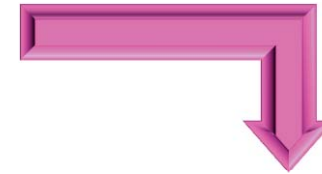
หาฤทธิ์ในการยับยั้ง อนุมูลอิสระ 1, 1-Diphenyl -2-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งมีความคงตัว ,ดูดกลืนแสงที่ 518 nm



IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง อนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50%

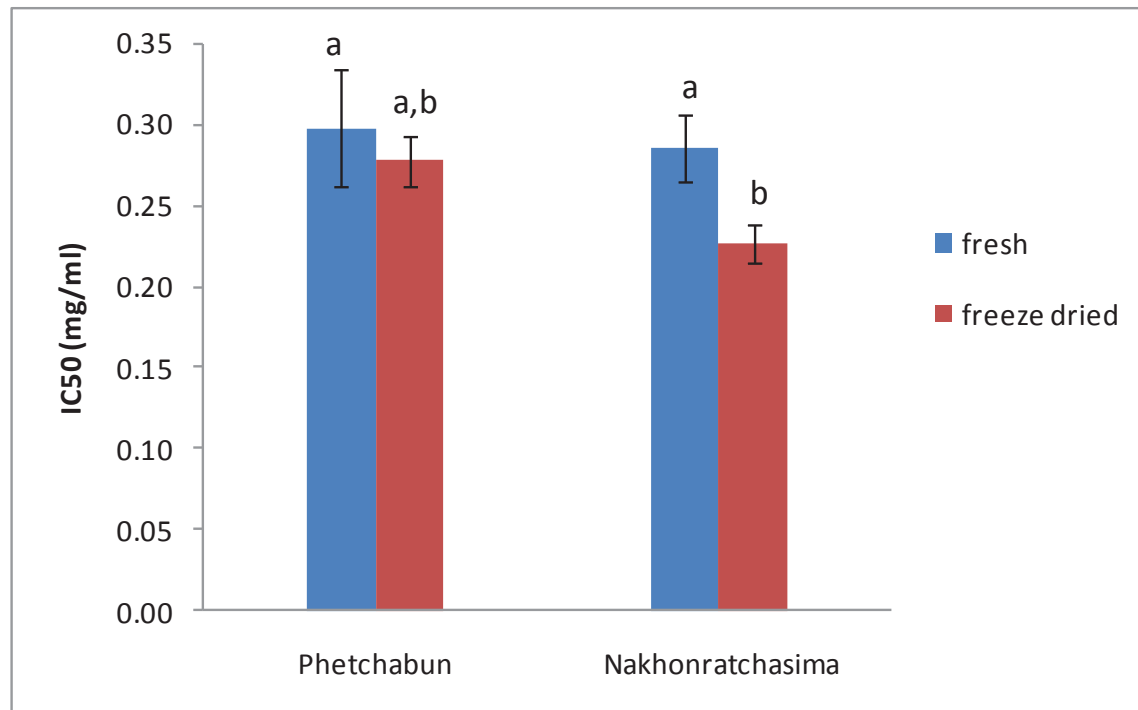
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH assay (ดัดแปลงวิธีของ Brand-William และคณะ ,1995)



สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง
% Inhibition DPPH กับความ
เข้มข้นของสารตัวอย่าง ลาก
กราฟตัดแกนได้ค่า IC_{50}

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC₅₀)



โดยที่ a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สารสกัดผลหม่อนจากนครราชสีมามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเพชรบูรณ์พิจารณาจากค่า IC₅₀ ที่ต่ำกว่า และสารสกัดผลหม่อนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสด

สรุป

- การเลือกระยะสุกของผลหม่อนมีความสำคัญต่อสมบัติต่างๆของหม่อนได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอนโธไซยานิน
- ผลหม่อนที่มีสีเข้มกว่าเนื่องจากมีระยะสุกมากกว่าทำให้มีปริมาณแอนโธไซยานินสูงกว่า
- ปริมาณน้ำตาลสูงมีผลทำให้ได้ปริมาณแอนโธไซยานินสูงเนื่องจากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นการเกิดแอนโธไซยานิน
- ปริมาณแอนโธไซยานินเป็นส่วนหนึ่งในการส่งเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งสารประกอบอื่น เช่นสารกลุ่มโพลีฟีนอล มีส่วนช่วยส่งเสริมการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบถึงประโยชน์และคุณสมบัติของผลหม่อนและแอนโธไซยานินในหม่อน
- ช่วยส่งเสริมการเพาะปลูกและการผลิตผลหม่อนในประเทศไทย
- สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาการบริโภคหม่อนเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในการแปรรูปและการนำไปใช้ของหม่อนในงานด้านต่างๆ

Acknowledgement

- งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.)โครงการการเพิ่มมูลค่าสมุนไพรครบวงจร



การสัมมนาพิเศษเพื่อเผยแพร่ความรู้

Mulberry: The Functional Fruit



ผลของแอนโธไซยานินและผลหม่อนสกัด ที่มีต่อ
การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก
ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรท พันธุ์วิสต้า

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไสรดา กนกพานนท์

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

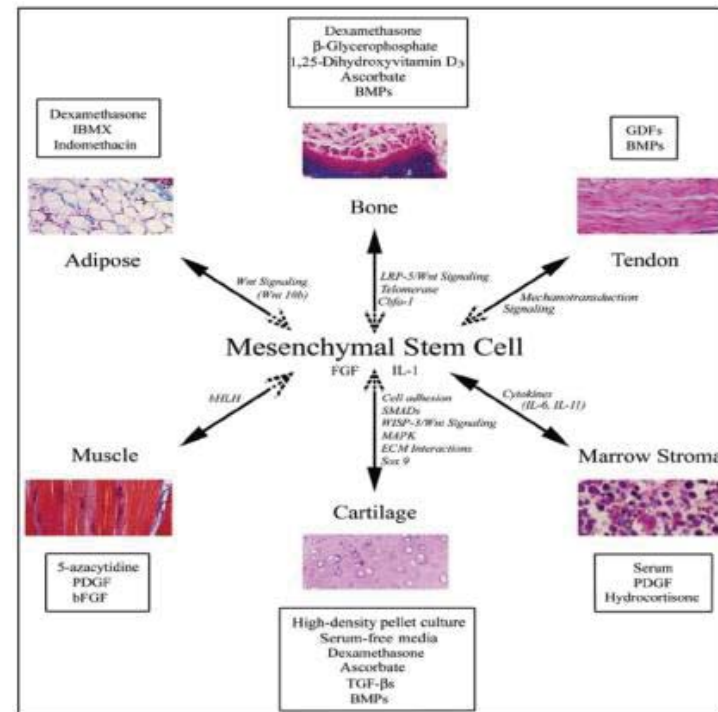
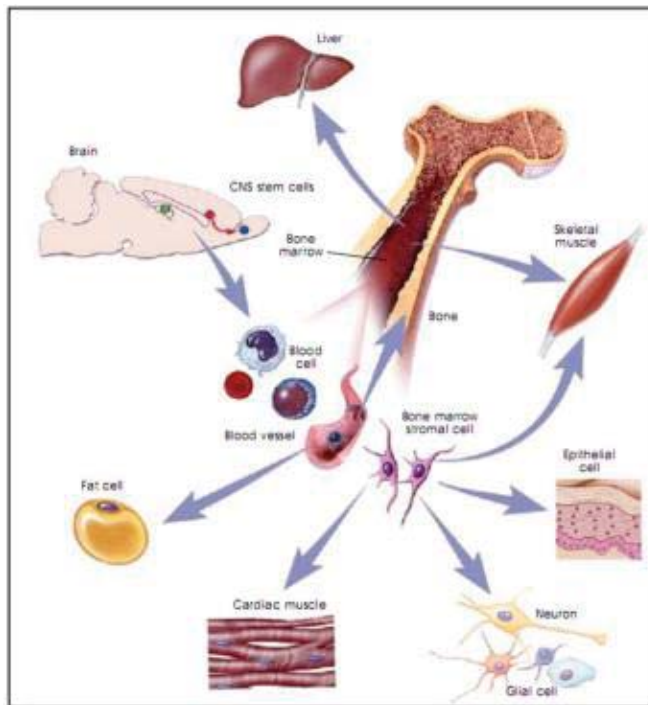
วัน จันทร์ ที่ 16 กรกฎาคม 2555

ณ ห้อง 209 อาคาร 3 คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

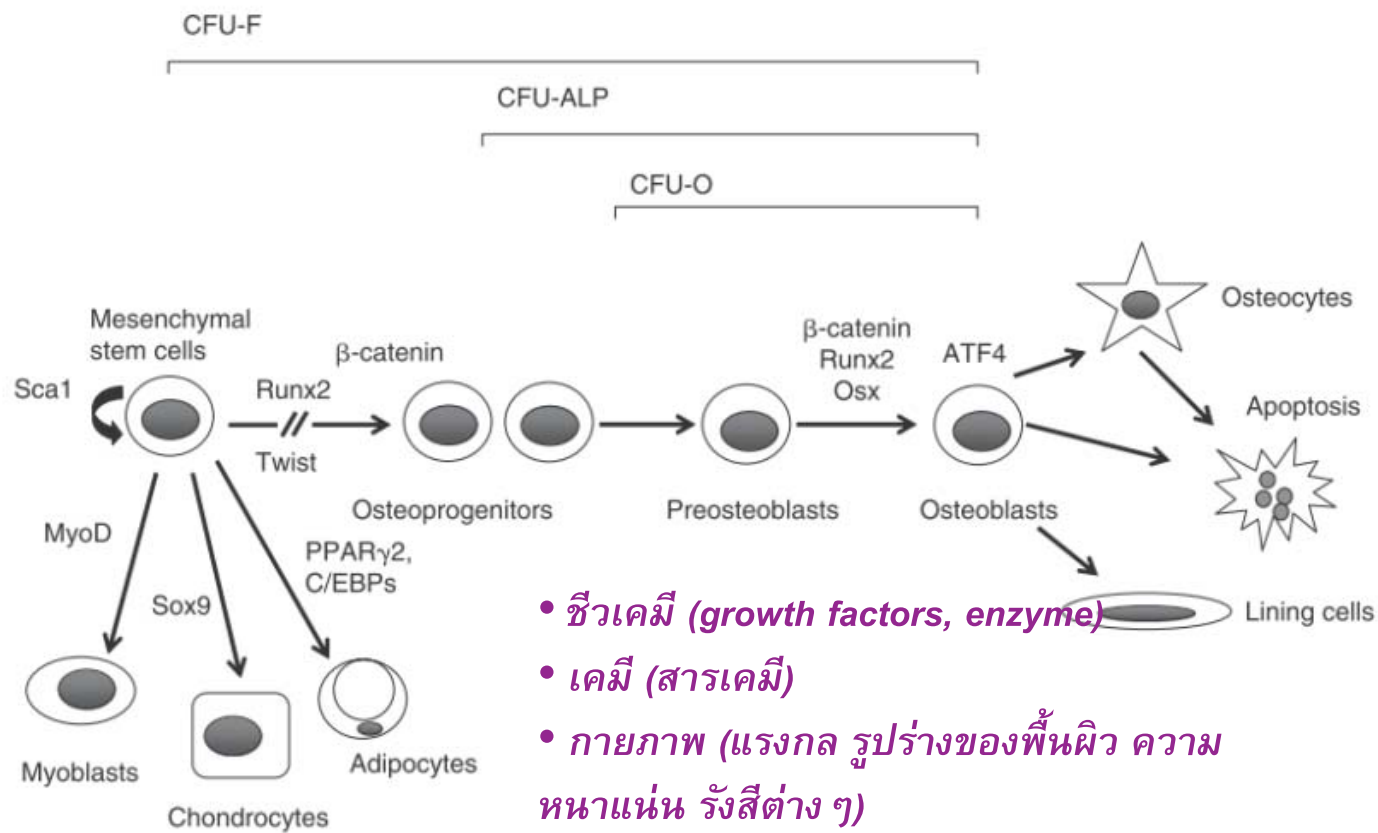
เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก

(Mesenchymal stem cell, MSC)

MSC สกัดได้จากไขกระดูก สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ที่ทำงานได้ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน เนื้อเยื่อไขมัน เส้นเอ็น และกล้ามเนื้อ สกัดได้จริงจากผู้ใหญ่ จึงมีศักยภาพในการใช้งานทางการแพทย์สูง



การเปลี่ยนแปลงของ MSC กระตุ้นได้จากปัจจัยภายนอก

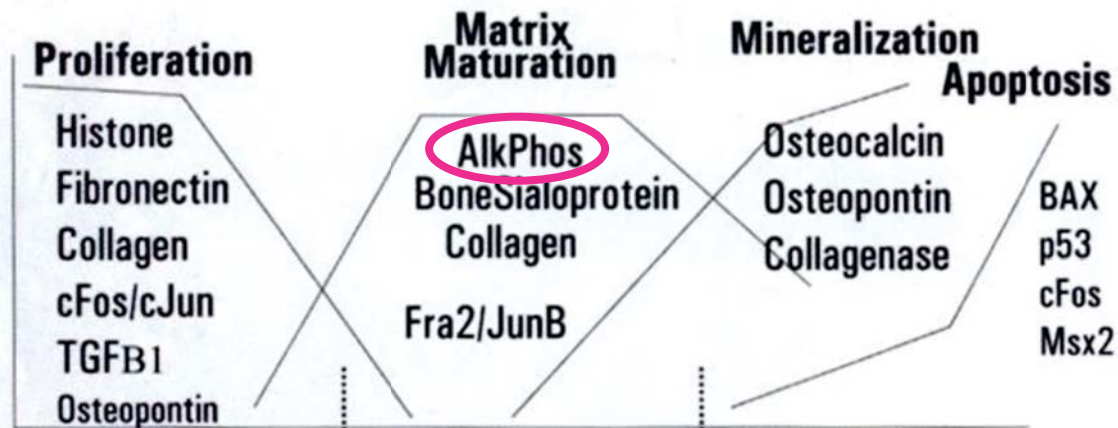


- ชีวเคมี (growth factors, enzyme)
- เคมี (สารเคมี)
- กายภาพ (แรงกล รูปร่างของพื้นผิว ความหนาแน่น รังสีต่าง ๆ)

การเปลี่ยนแปลงของ MSC ไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteoblast)

C

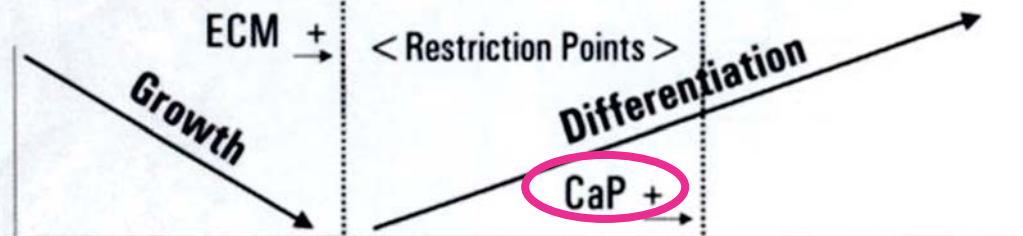
Temporal Expression of Osteoblast Genes Reflecting Growth and Differentiation Stages



สัญญาณการเปลี่ยนแปลง
เป็นกระดูกที่วัดในงานนี้

- กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase สูง (early marker)
- เซลล์มีการหลั่งแร่ธาตุแคลเซียมออกมาสะสมภายนอก (late marker)

D



การกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดให้เป็นกระดูก

- การใช้สารเคมีในอาหารเลี้ยงเซลล์
- การใช้หมู่ทางเคมีบนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ , ลำดับเปปไทด์ RGD
- การใช้สารเร่ง ประเภท Cytokines , Growth factors
- การปรับปรุงสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ เช่น การใช้แรงกด แรงเฉือน การสั่นสะเทือน รังสี
- การใช้ลักษณะพื้นผิวเฉพาะ เช่น ขนาด ความเป็นระเบียบ ความขรุขระ



การใช้สารเคมีในการกระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูก

- Dexamethasone (dex) : 10pM-1μM 28 วัน
- Beta-glycerophosphate (β -GP)
- Ascorbic acid : 50-500 μM
- Vitamin D3
- Growth factor-beta (TGF- β)
- Bone morphogenetic proteins (BMPs)

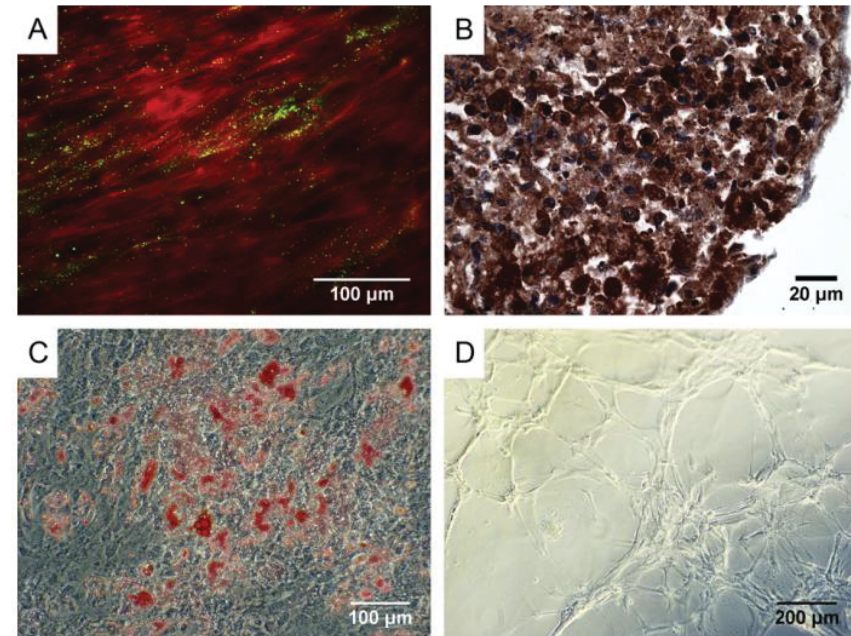
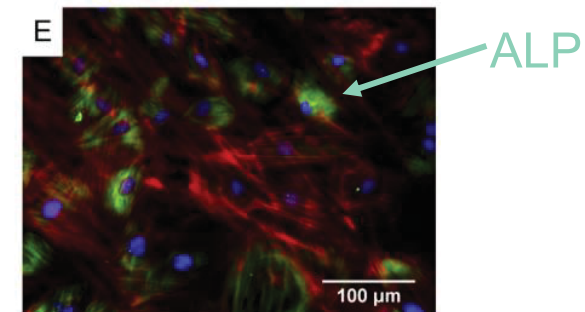


Table 1

Representative protocols used for in vitro osteogenic differentiation of MSCs (asc, ascorbic acid; bFGF, basic fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; dex, dexamethasone; FCS, fetal calf serum; ITS, insulin-transferrin-selenious acid; TGF- β , transforming growth factor-beta; vitD3, vitamin D3; β -GP, beta-glycerophosphate; BM, bone marrow; UCB, umbilical cord blood; UCWJ, umbilical cord Wharton's jelly).

Reference	FCS	dex	asc	β -GP	Other	Cell source
Oswald et al. [5]	10%	100 nM	200 μM	10 mM	–	Human BM
Jørgensen et al. [59]	10%	100 nM	–	–	vitD3 (1 nM) BMP-2 (100 ng ml ⁻¹)	Human BM
Friedman et al. [262]	–	100 nM	25 μg ml ⁻¹	5 mM	ITS (1%) bFGF (25 ng ml ⁻¹) FGF-8/FGF-10 (50 ng ml ⁻¹) TGF- β (200 pM) BMP-2/4/6/7/14 (20 nM)	Human BM
Stiehler et al. [263]	10%	100 nM	290 nM	5 mM	vitD3 (10 nM)	Human BM
Hildebrandt et al. [55]	–	10 nM 100 nM	300 μM	5 mM	BMP-2 (100 nM)	Human UCB
Pytlík et al. [73]	10%	100 nM	500 μM	10 mM	–	Human BM
Song et al. [42]	10%	100 nM	50 μM	10 mM	–	Human BM
Chen et al. [66]	10%	100 nM	200 μM	10 mM	–	Human BM/UCWJ



วัตถุประสงค์ของการทดลอง

- 1) เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษ ของสารสกัดผลหม่อน ที่มีต่อเซลล์
ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem
cells, MSC) ของหนูวิสตา (Wistar rat)
- 2) เพื่อศึกษาผลต่อการเจริญเติบโต (proliferation) และการ
เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenesis) ของสารสกัดผล
หม่อน ที่มีต่อเซลล์ MSC

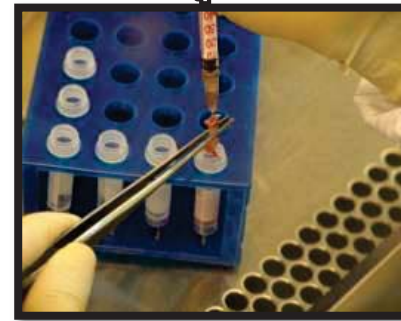
****ศึกษาในระดับห้องทดลอง นอกร่างกาย*

การแยกและเพาะเลี้ยง MSC เพื่องานวิจัย

การสกัดแยกเซลล์ต้นกำเนิด MSCs จากกระดูกต้นขาหลังของ หนูวิสต้า



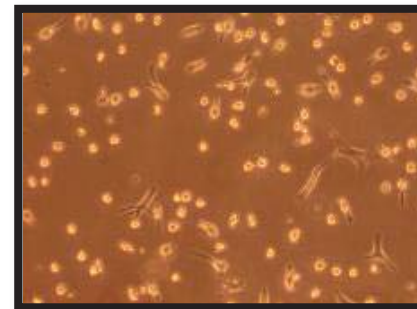
การผ่าเอากระดูกต้นขาหลังหนู



การสกัดแยกเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์



ทำการเพาะเซลล์ในสภาวะ 5 % CO₂
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน



เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์

Ref: Takahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate, Biomaterials 26, (2005), 3587-3596.

สารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์



เพาะเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อ well
ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (NM)



ในตู้บ่ม 5% CO₂
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



วัดจำนวนเซลล์
ด้วย MTT assay

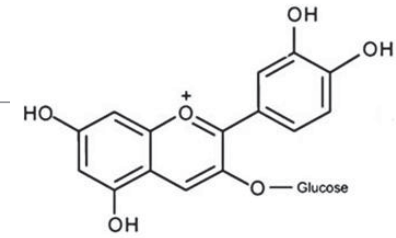
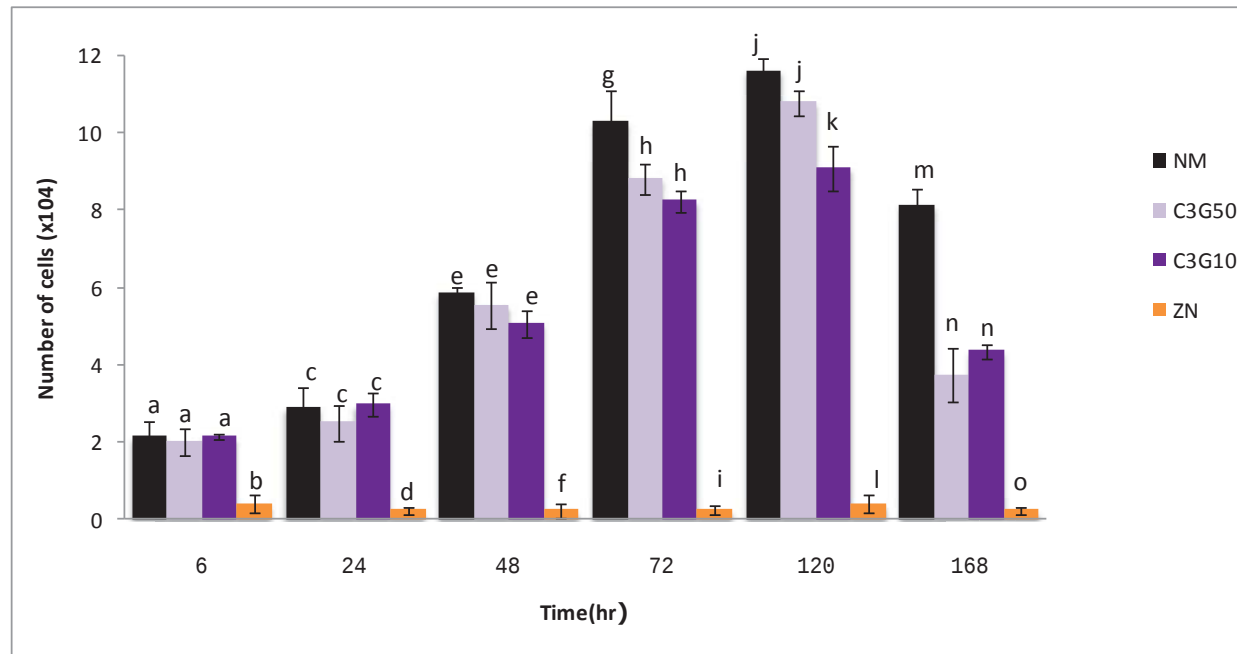
ตรวจสอบการยึดเกาะของเซลล์ ที่
เวลา 6 ชั่วโมง และเจริญเติบโตของ
เซลล์ ที่เวลา 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน



คำนวณหา Growth
rate หรือ ระยะเวลา
ที่เซลล์เพิ่มจำนวน
ขึ้นเป็น 2 เท่า (PDT)

กลุ่มที่	ตัวย่อ	สารสกัดหม่อน(mg/ml)	สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (μM)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (กลุ่มควบคุม)
2	C3G50	-	50	ไซแอนโธไซยานิน 50 ไมโครโมลาร์
3	C3G100	-	100	ไซแอนโธไซยานิน 100 ไมโครโมลาร์
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลาร์
6	Zn	-	-	Zn acetate 20 ppm ระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของ C3G ต่อ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก



Cyanidin 3-glucoside

**C3G:แอนโธไซยานินรูปที่มี
มากในสารสกัดผลหม่อน**

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ

C3G50= C3G @ 50 μ M

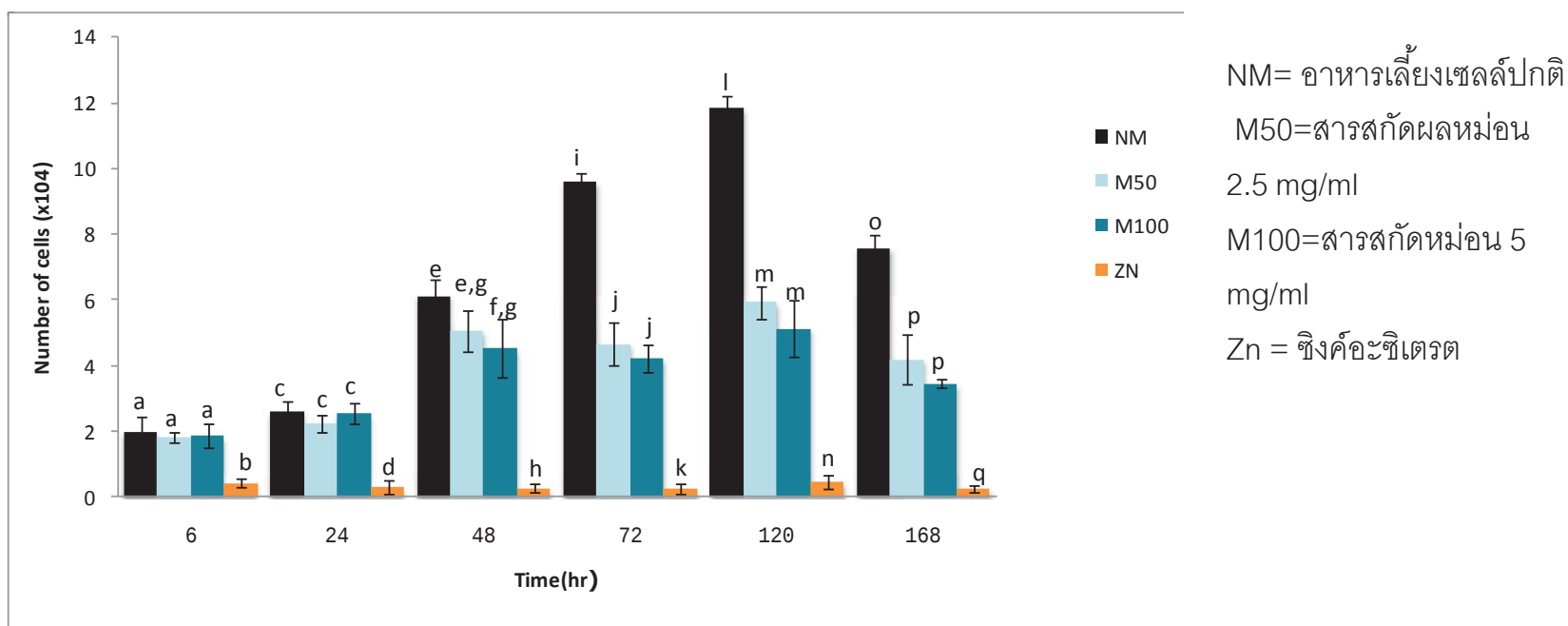
C3G100= C3G @ 100 μ M

Zn= ซิงค์อะซิเตรต

a-q แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกันและในการทดสอบครั้งเดียวกัน

- C3G ความเข้มข้น 50 และ 100 μ M ไม่เป็นพิษกับเซลล์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของ MSC
- ที่ 168 ชั่วโมงจำนวนเซลล์ลดลงเนื่องจากข้อจำกัดของพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดผลหม่อน ต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก



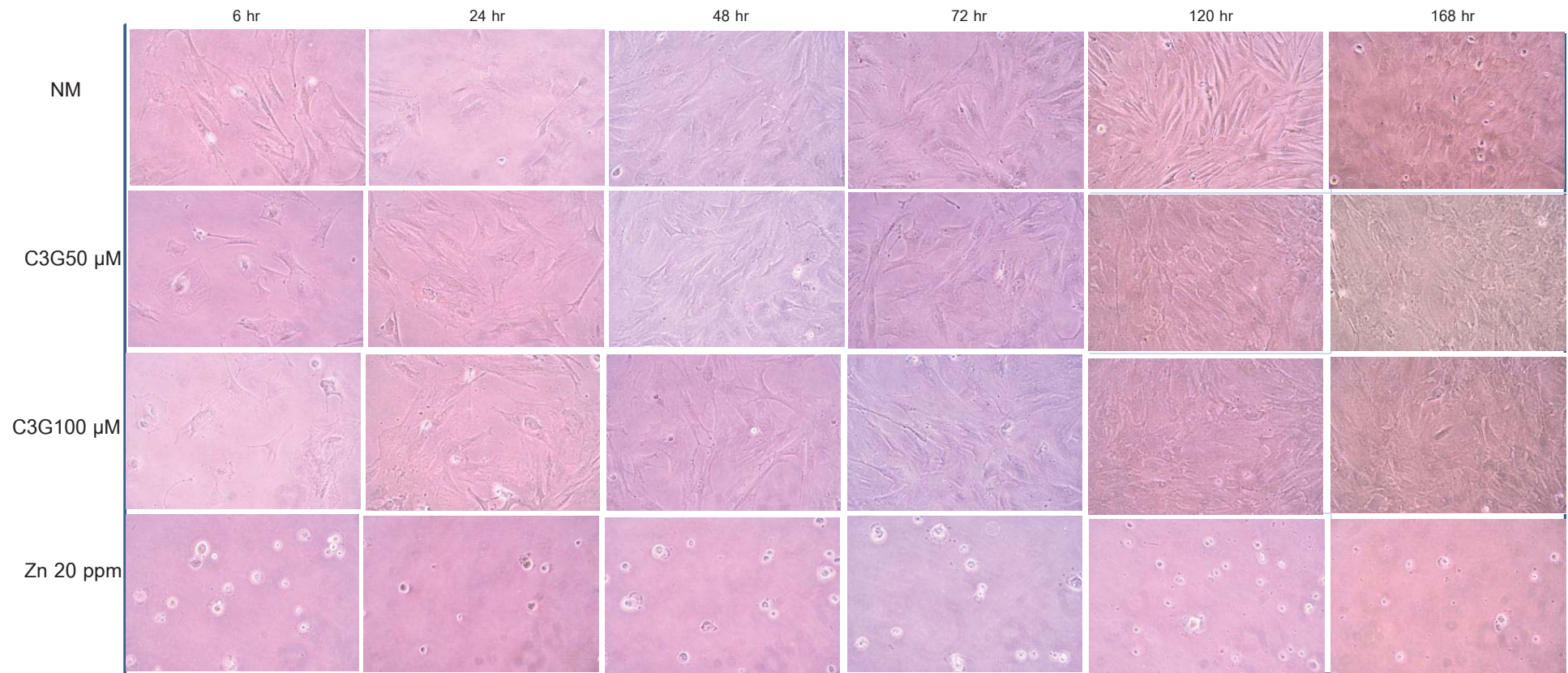
a-q แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกันและในการทดสอบครั้งเดียวกัน

- สกัดหม่อนความเข้มข้น 2.5 และ 5 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ MSC
- คาดว่าเกิดจากการที่สารสกัดหม่อนมีปริมาณน้ำตาลสูง และมีความเป็นกรด ทำให้ไม่ควรนำมาเลี้ยงเซลล์โดยตรง
- หากต้องการใช้ประโยชน์จากสารสกัดหม่อนเพื่อให้มีผลต่อ MSC ควรนำมาสกัดเอาแอนโธไซยานินบริสุทธิ์ หรือมีการแยกน้ำตาลและกรดออก ให้สารที่นำมาใช้เลี้ยงเซลล์มีค่า พีเอช 7.4 และออสโมลาริตี 290-310 mOS

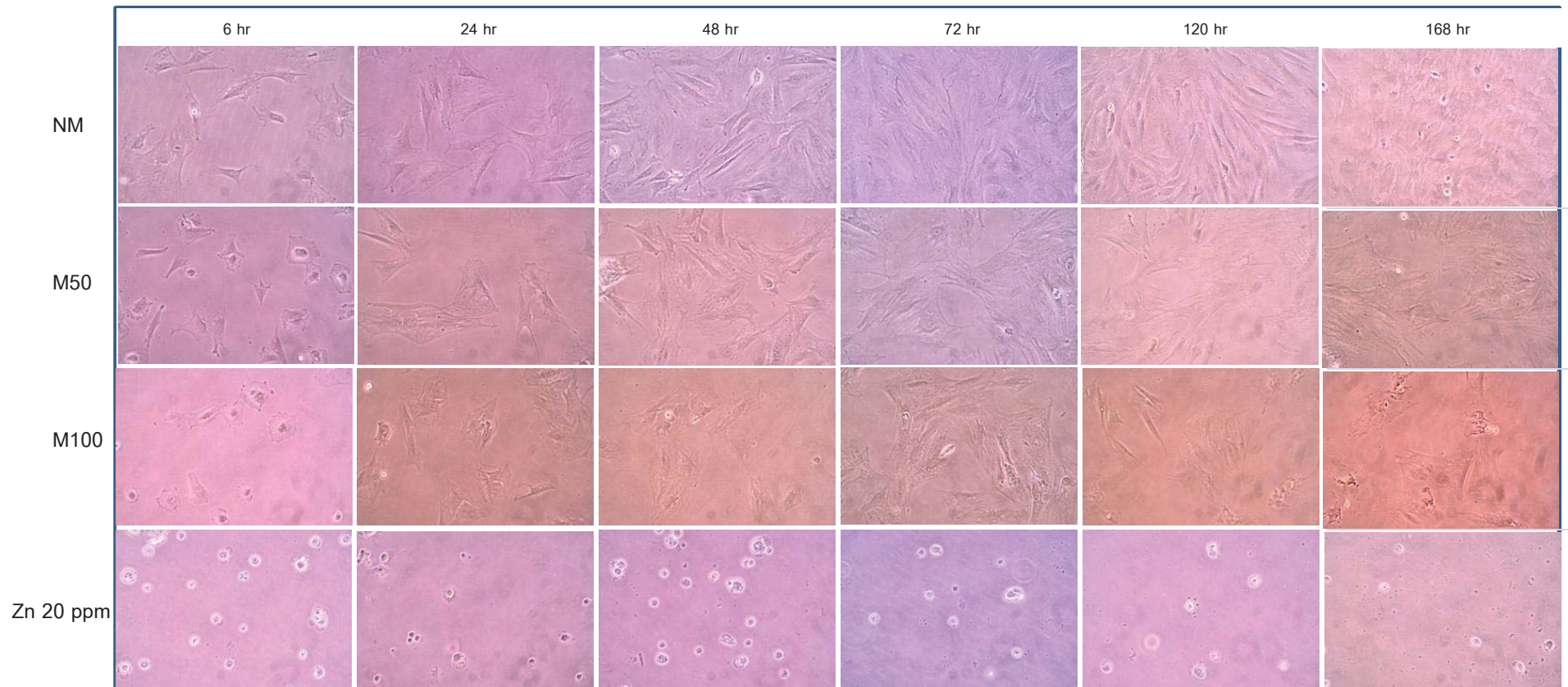
ผลการประเมิน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) , เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และ ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สูงสุด ที่เวลา $t_{\max}$

Sample	$\mu \times 10^{-3} \text{ (hr}^{-1}\text{)}$	PDT (hr)	Maximum density (cells/mm. ²)	$t_{\max}$ (hr)
NM ¹	26.34	26.33	578.75±17.97	120
C3G50 ¹	26.22	26.45	538.75±16.52	120
C3G100 ¹	21.27	32.61	453.75±29.55	120
Zn ¹	-268.24	Infinity	N/A	6
NM ²	26.95	25.74	591.67±18.93	120
M50 ²	15.35	45.17	296.67±24.66	120
M100 ²	14.94	46.43	256.67±24.66	120
Zn ²	-248.61	Infinity	N/A	6

ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เจริญ เติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ C3G



ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เจริญ เติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ C3G



สารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลง ไปเป็นเซลล์กระดูก



การเพาะเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อชม.² เลี้ยงใน
อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (NM) และอาหารเลี้ยง
เซลล์ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูก (OM)



ในตู้บ่ม 5% CO₂
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



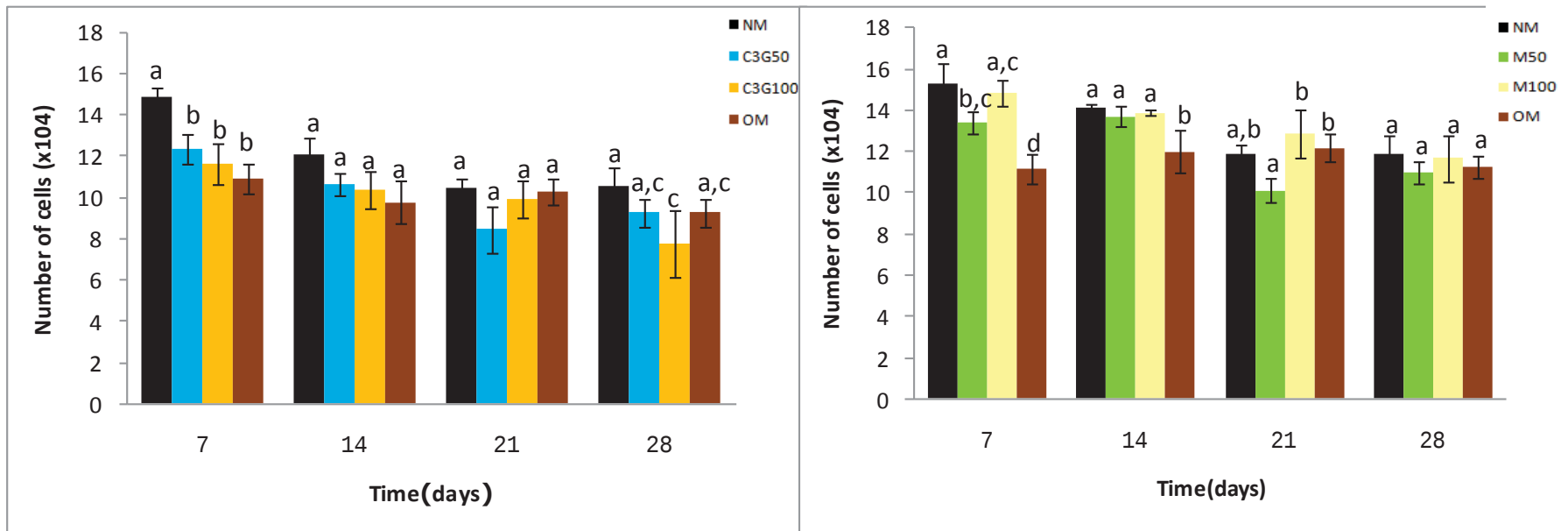
-กิจกรรมของเอนไซม์
อัลคาไรล์ฟอสฟาเตส (ALP)
-ปริมาณการสร้างแคลเซียม

เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา
4 สัปดาห์เก็บตัวอย่างทุกๆ
สัปดาห์

กลุ่มที่	ตัวย่อ	สารสกัดหม่อน(mg/ml)	สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (μM)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เพื่อเป็น negative control
2	C3G50	-	50	-
3	C3G100	-	100	-
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลลาร์
6	OM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic เพื่อเป็น positive control

OM (Osteogenic medium) = อาหารเลี้ยง MSC ที่ใช้ในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกตามมาตรฐานสากล

ผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์



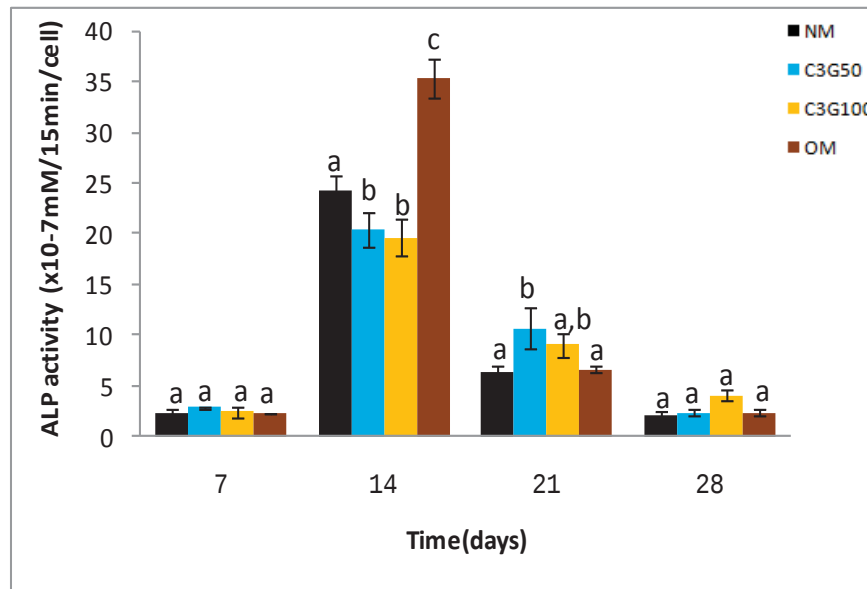
ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G)

สารสกัดหม่อน (M)

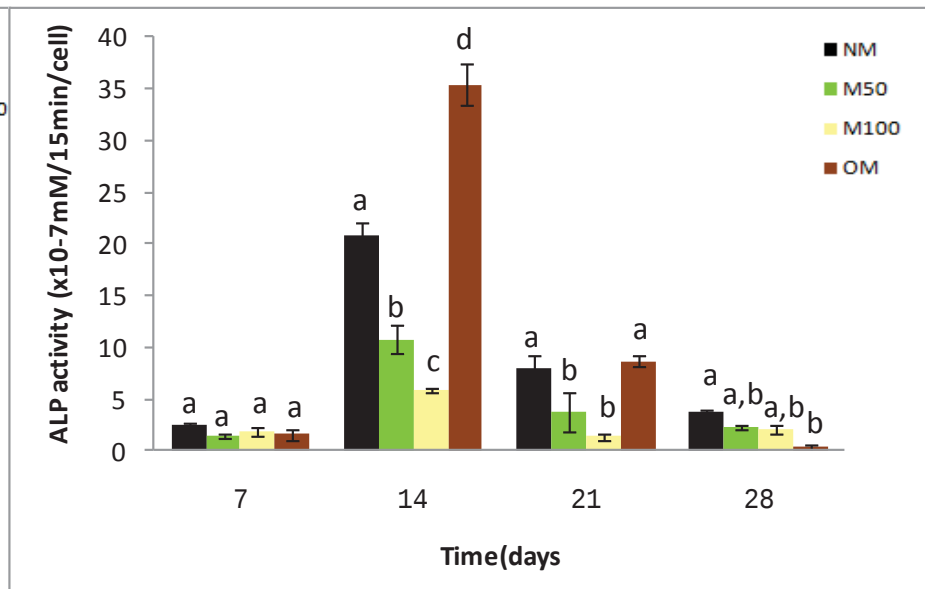
a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ , C3G50=ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (แอนโทไชยานินมาตรฐาน)ความเข้มข้น 50 μM ,
 C3G100=ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ความเข้มข้น 100 μM , M50=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 mg/ml ,
 M100=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 5 mg/ml OM = อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic

ผลกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline Phosphatase



ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G)

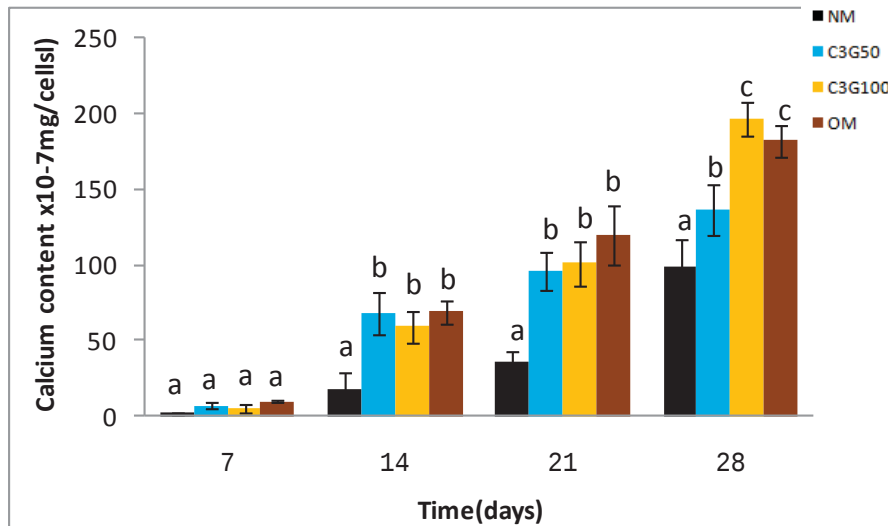


สารสกัดหม่อน (M)

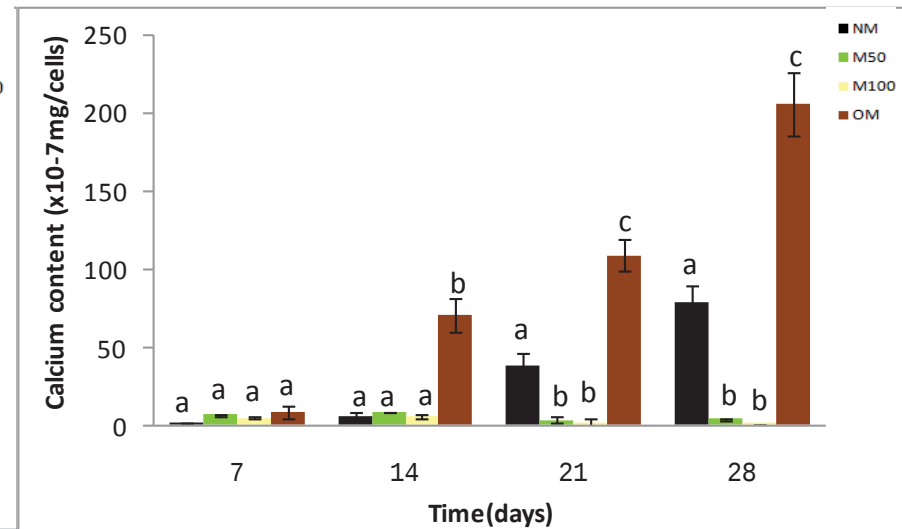
a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ , C3G50=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (แอนโทไซยานินมาตรฐาน)ความเข้มข้น 50 μ M,
 C3G100=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ความเข้มข้น 100 μ M , M50=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 mg/ml ,
 M100=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 5 mg/ml OM = อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic

ปริมาณแคลเซียมที่เซลล์หลั่งออกมาสะสม



ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G)



สารสกัดหม่อน (M)

a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ , C3G50=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (แอนโทไซยานินมาตรฐาน)ความเข้มข้น 50 μ M,
 C3G50=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ความเข้มข้น 100 μ M , M50=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 mg/ml ,
 M100=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 5 mg/ml OM = อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic

แสดงการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิด
จาก ไขกระดูกของหนูวิสตาที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร		กิจกรรมของ ALP		ปริมาณแคลเซียมสะสม	
		(x10 ⁻⁷ mM/15min/cells) สูงสุดที่ 14 วัน	ร้อยละสัมพัทธ์ เทียบกับ NM	(x10 ⁻⁷ mg/cells) สูงสุด ที่ 28 วัน	ร้อยละสัมพัทธ์เทียบ กับ NM
แอมโนโธไซยานิน	NM ¹	24.35±1.50	100%	99.13±17.63	100%
	C3G50 ¹	20.47±1.74	84.06%	136.56±16.25	137.76%
	C3G100 ¹	19.64±1.82	80.66%	196.52±11.04	198.24%
	OM ¹	29.31±3.27	120.37%	182.22±10.44	183.82%
สารสกัดผงหมอน	NM ²	20.71±1.33	100%	79.21±10.49	100%
	M50 ²	10.74±1.38	51.86%	4.41±0.70	5.57%
	M100 ²	5.87±0.22	28.34%	0.71±0.53	0.72%
	OM ²	35.39±1.98	170.88%	205.55±20.12	259.50%

สรุป

- สารสกัดหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ในขณะที่ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ซึ่งเป็นแอนโธไซยานินที่พบมากที่สุดหม่อนไม่เป็นพิษและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์
- สารสกัดหม่อนไม่มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้เป็นเซลล์กระดูกได้ในขณะที่ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์บริสุทธิ์สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ได้ที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์ ทั้งนี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาของสารเจือปนอื่นๆในสารสกัด อย่างไรก็ตามสารต่างๆเหล่านี้ น่าจะถูกดูดซึมในร่างกายอย่างไม่ผลต่อกันและกัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มขึ้นในร่างกายต่อไปก่อนการส่งเสริมให้ใช้งานจริง

ประโยชน์ที่ได้รับจากการทดลอง

- ได้ข้อมูลฤทธิ์ของสารสกัดหม่อนและแอนโธไซยานินต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก
- สามารถนำสารแอนโธไซยานินไปพัฒนาใช้เป็นสารช่วยกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดให้เป็นเซลล์กระดูกซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ในสารสกัดธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีและสารสังเคราะห์
- ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และยาที่มีฤทธิ์ช่วยส่งเสริมการซ่อมแซมกระดูก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัย และอุปกรณ์การวิจัยจากสนับสนุน
โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.)โครงการการเพิ่มมูลค่า
สมุนไพรครบวงจร โครงการพัฒนาวิศวกรรมชีวเวช จุฬาฯ 100 ปี และ
โครงการไทยเข้มแข็ง (SP2)

