



ผลของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมต่อการรักษาบาดแผลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ  
ยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์

EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM BAELEAVES ON WOUND HEALING ASSOCIATED  
WITH AQUAPORIN-3 GENE EXPRESSION IN KERATINOCYTE CELLS

บุษรินทร์ เกษรน้อย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

ผลของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมต่อการรักษาบาดแผลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ  
ยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM BAELEAVES ON WOUND HEALING ASSOCIATED  
WITH AQUAPORIN-3 GENE EXPRESSION IN KERATINOCYTE CELLS



BUDSARIN KESORNNOI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Pharmaceutical Product Development)  
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ผลของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมต่อการรักษาบาดแผลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ  
ยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์

ของ

บุษรินทร์ เกษรน้อย

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรพรรณ สิทธิถาวร) (อาจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรวินท์ พ่วงแสงทอง) (รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

..... ที่ปรึกษาร่วม  
(อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล)

ชื่อเรื่อง	ผลของน้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้มต่อการรักษาบาดแผลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์
ผู้วิจัย	บุษรินทร์ เกษรน้อย
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อรวินท์ พรางแสงทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้ม สารลิโมนีน และสารทรานแคริโอฟิลลีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้มต่อการปิดของบาดแผล และศึกษากลไกการสมานแผลที่เกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ด้วยวิธี RT real-time PCR สร้างบาดแผลโดยวิธี scratch และ culture insert ในเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่เลี้ยงในอาหารที่มี FBS ร้อยละ 2 สังเกตการปิดบาดแผลของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลโดยการถ่ายภาพและ คำนวณร้อยละการปิดของบาดแผล ผลการศึกษาพบว่าในช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้ม (5 µg/mL) ส่งผลให้การปิดของบาดแผล (ร้อยละ 84.51) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 30.81) ( $P < 0.05$ ) สารทรานแคริโอฟิลลีน (4 µg/mL) ส่งผลให้การปิดของบาดแผล (ร้อยละ 77.99) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 43.45) ( $P < 0.05$ ) ส่วนการปิดของบาดแผลจากการกระตุ้นด้วยสารลิโมนีนทุกความเข้มข้นไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ที่เวลา 48 ชั่วโมง สารทรานแคริโอฟิลลีน (0.8 µg/mL) ส่งผลให้การปิดของบาดแผล (ร้อยละ 83.99) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 58.52) ( $P < 0.05$ ) การปิดของบาดแผลจากการกระตุ้นด้วยน้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้มและสารลิโมนีนทุกความเข้มข้นไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม และผลการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ในอาหารที่มี FBS ร้อยละ 2 ที่ 24 ชั่วโมง ด้วย WST-1 assay พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้ม (5 µg/mL) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงว่าการปิดของบาดแผลไม่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (ร้อยละ 110.09) ที่ได้รับสารทรานแคริโอฟิลลีน (4 µg/mL) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่าการปิดของบาดแผลสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนเซลล์ร่วมกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 พบว่าเซลล์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้ม (5 µg/mL) และเซลล์ที่ได้รับสารทรานแคริโอฟิลลีน (4 µg/mL) มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น  $3.7 \pm 1.2$  เท่า และ  $3.0 \pm 0.9$  เท่าของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่พบว่าฤทธิ์สมานแผลของน้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้มมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ของสารทรานแคริโอฟิลลีนในองค์ประกอบและสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3

คำสำคัญ : น้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุ้ม, การสมานแผล, อะควาพอริน-3

Title	EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM BAEL LEAVES ON WOUND HEALING ASSOCIATED WITH AQUAPORIN-3 GENE EXPRESSION IN KERATINOCYTE CELLS
Author	BUDSARIN KESORNNOI
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Worapan Sitthithaworn
Co Advisor	Associate Professor Dr. Orawin Prangsaengtong
Co Advisor	Dr. Duangratana Shuwisitkul

The purpose of this research is to study the effects of volatile oil from bael leaf, limonene and trans-caryophyllene, which are components of bael leaf oil, on wound closure. The wound healing mechanism related to the expression level of the aquaporin-3 gene was studied by RT real-time PCR. Wounds were created by scratch and insert culture in keratinocyte (HaCaT) cells cultured in a medium containing 2% FBS. The wound closure was observed under a microscope, the results were photographed and the percentage of wound closure was calculated. The results showed that in the range of non-toxic concentrations at 24 h, bael leaf oil (5 µg/mL) resulted in a significant increase in wound closure (84.51%) compared to the control group (30.81%) (\* $P$ <0.05), and trans-caryophyllene (4 µg/mL) resulted in a significant increase in wound closure (77.99%) compared to the control group (43.45%) (\* $P$ <0.05). Wound closure was not significantly different from the control group at any concentration of limonene. At 48 h, trans-caryophyllene (0.8 µg/mL) resulted in significant increase in wound closure (83.99%) compared to the control group (58.52%) (\* $P$ <0.05). Wound closure from all concentrations of bael leaf oil and limonene was not different from the control group. The results of the cell viability study in 2% FBS medium at 24 hours by WST-1 assay showed that the percentage of cell viability treated with bael leaf oil (5 µg/mL) was not different from the control group. This suggests that wound closure is unrelated to cell proliferation. The percentage of cell viability (110.09%) that received trans-caryophyllene (4 µg/mL) was significantly increased compared to the control group (\* $P$ <0.05). Thus, wound closure is associated with cell proliferation and cell migration. The results of a study on the expression level of the aquaporin-3 gene revealed that cells treated with bael leaf oil (5 µg/mL) and trans-caryophyllene (4 µg/mL) had  $3.7\pm 1.2$  fold and  $3.0\pm 0.9$  fold increase in gene expression, respectively, compared to the control group. This is the first study to demonstrated that the wound healing effect of bael leaf oil is related to the activity of trans-caryophyllene in its constituents and to the expression of the aquaporin-3 gene.

Keyword : Bael leaf oil Wound healing Aquaporin-3

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ทั้งนี้อันเนื่องมาจากความเมตตากรุณา ให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านความรู้และการดำเนินชีวิต พร้อมทั้งให้กำลังใจตลอดการดำเนินงานวิจัยจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณรัตน์ พรางแสงทอง และ อาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล ที่กรุณาอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีรศักดิ์ สามี ที่กรุณาเป็นกรรมในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ เลิศประภามงคล ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณบิดามารดา และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจมาตลอดจนการวิจัยและการศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จด้วยดี

บุษรินทร์ เกษรน้อย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ .....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ภูมิหลัง.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ตัวแปรที่ศึกษา.....	2
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	2
1.6 กรอบแนวคิดในงานวิจัย.....	3
1.7 สมมุติฐานในการวิจัย.....	3
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 มะตูม.....	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	4
2.1.2 สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในใบมะตูม.....	5
2.1.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบมะตูม.....	9
2.2 ระบบต่อคุ้มร่างกาย.....	11



2.3 กลไกการรักษาบาดแผล.....	13
2.4 การเคลื่อนที่ของเซลล์.....	16
2.5 น้ำมันหอมระเหยต่อกระบวนการรักษาบาดแผล.....	18
2.6 ความสัมพันธ์ของอะควาพอริน-3 กับการรักษาบาดแผล.....	20
2.7 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี WST-1 assay.....	23
2.8 การแสดงออกของยีน.....	24
2.9 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน.....	25
2.10 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายเทียบกับยีนมาตรฐาน housekeeping gene ด้วย RT real-time PCR.....	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	30
3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง.....	31
3.2 สารทดสอบ.....	31
3.3 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี.....	31
3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	33
3.4.1 การเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง.....	33
3.4.2 การเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนภาชนะเลี้ยงเซลล์.....	34
3.4.3 การนับเซลล์ด้วยสไลด์สำหรับนับเซลล์.....	35
3.5 วิธีการเก็บเซลล์.....	36
3.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ต่อความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ด้วย WST-1 assay.....	37
3.7 การศึกษาฤทธิ์การสมานแผลด้วยวิธี wound healing assay.....	38
3.7.1 วิธี scratch.....	38
3.7.2 วิธี Culture-Insert 4 well.....	39

3.8 การศึกษาการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์ของมนุษย์หลังจากการทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ที่ความเข้มข้น 5 µg/mL และสารสกัดทรานส์แคโรฟีลลีน ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL.....	40
3.8.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์เคราติโนไซต์สำหรับนำมาสกัด RNA.....	40
3.8.2 การสกัด RNA ด้วย RNeasy spin column .....	40
3.8.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพ RNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis .....	42
3.8.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ RNA.....	42
3.8.5 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA).....	43
3.8.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน aquaporin-3 .....	43
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล .....	45
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	46
4.1 ผลการกำหนดความเข้มข้นของสารเพื่อใช้ในการศึกษา.....	46
4.1.1 การทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมต่อการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ด้วยเทคนิค WST-1 assay .....	46
4.1.2 การกำหนดความเข้มข้นเพื่อนำไปทดสอบผลของสารต่อการสมานแผล.....	51
4.2 ผลการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และสารทรานส์แคโรฟีลลีน (trans-caryophyllene) ต่อความสามารถในการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ด้วยวิธี wound healing assay.....	52
4.3 ผลทดสอบความเกี่ยวข้องของการสมานแผลที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ด้วย ด้วยเทคนิค WST-1 assay .....	60
4.4 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) ด้วยเทคนิค RT real-time PCR.....	65
4.4.1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของ total RNA ด้วย agarose gel electrophoresis.....	65
4.4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA โดยเทคนิค fluorescence spectroscopy ด้วย microplate reader.....	66

4.4.3 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) เทียบกับ housekeeping gene (GAPDH) ด้วย RT real-time PCR.....	68
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	70
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	70
5.1.1 การทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารต่อการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	70
5.1.2 การทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และสารทรานส์แคโรฟีลลีน (trans-caryophyllene) ต่อความสามารถในการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ด้วยวิธี wound healing assay.....	71
5.1.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) ด้วยเทคนิค RT real-time PCR.....	73
5.2 ข้อสรุป.....	76
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	76
บรรณานุกรม.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	108

## สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 องค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม.....	7
ตาราง 2 แสดงโครงสร้างองค์ประกอบหลักของสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่พบในใบมะตูม .....	8
ตาราง 3 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในใบมะตูมที่ใช้ในการศึกษานี้ (ได้จากการสกัดด้วยวิธี hydrodistillation และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยวิธี GC-MS).....	9
ตาราง 4 แสดงความสัมพันธ์ของประเภทของ growth factors, Integrin, เอนไซม์ metalloproteases (MMPs) ที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์ ที่บาดแผลของหนู ในกระบวนการ re-epithelialization .....	16
ตาราง 5 แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) .....	43
ตาราง 6 แสดง primer ที่ใช้สำหรับ Real time PCR.....	44
ตาราง 7 แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย Real time PCR.....	45
ตาราง 8 แสดงสถานะในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย Real time PCR.....	45
ตาราง 9 แสดงช่วงความเข้มข้นของ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และ สารทรานส์แคโรฟิลลีน (trans-caryophyllene) ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง โดยจำแนกได้เป็นความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (non-proliferative dose) และ ความเข้มข้นที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferative dose) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม .....	51
ตาราง 10 ตารางแสดงการคำนวณจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นสูงสุด ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์.....	52
ตาราง 11 แสดงการกำหนดช่วงความเข้มข้นของสารที่จะนำไปทดสอบ wound healing assay	52
ตาราง 12 แสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์ เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผล (% wound closure) และการเพิ่มจำนวนของ เซลล์ (cell proliferation) โดยประเมินจากร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) หลังจาก	

ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ใน serum reduced medium (2%FBS) ที่เวลา 24 ชั่วโมง .....	63
ตาราง 13 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA .....	67
ตาราง 14 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่เวลา 24 ชั่วโมง .....	102
ตาราง 15 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่เวลา 48 ชั่วโมง .....	102
ตาราง 16 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารลิโมนีนที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	103
ตาราง 17 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารลิโมนีนที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	103
ตาราง 18 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารทรานแคริโอฟิลลีนที่เวลา 24 ชั่วโมง .....	103
ตาราง 19 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารทรานแคริโอฟิลลีนที่เวลา 48 ชั่วโมง .....	104
ตาราง 20 ผลการทดสอบการเพิ่มชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม..	104
ตาราง 21 ผลการทดสอบการเพิ่มชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารลิโมนีน .....	104
ตาราง 22 ผลการทดสอบการเพิ่มชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารทรานแคริโอฟิลลีน .....	105
ตาราง 23 ผล Cycle Threshold (Ct) ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้น 5 µg/mLและกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร.....	105
ตาราง 24 ผลการคำนวณระดับการแสดงออกของยีนอะความพอริน-3 ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้น 5 µg/mLและกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร.....	106
ตาราง 25 ผล Cycle Threshold (Ct) ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทรานแคริโอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 4 µg/mLและกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร .....	107
ตาราง 26 ผลการคำนวณระดับการแสดงออกของยีนอะความพอริน-3 ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทรานแคริโอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 4 µg/mLและกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร .....	107

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ลักษณะของไบมะตุ่ม .....	4
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างผิวหนัง .....	11
ภาพประกอบ 3 กลไกของการรักษาบาดแผลและส่วนประกอบหลักของเซลล์.....	14
ภาพประกอบ 4 แสดงลำดับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (A) การเคลื่อนที่ของเซลล์แบบเซลล์เดี่ยวและแบบกลุ่มเซลล์ที่มีการยึดเกาะระหว่างเซลล์และเซลล์ (B) .....	17
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างมอเนออร์เมอร์และการรวมตัวเป็นเดตระเมอร์ (A) และมุมมองภาพด้านบนในลักษณะการรวมตัวเป็นเดตระเมอร์ของอะควาพอรินแสดงช่องทางการผ่านของน้ำ (B) .....	20
ภาพประกอบ 6 แสดงความสัมพันธ์ของหน้าที่ของอะควาพอริน-3 (AQP-3) ที่เกี่ยวข้องกับ ความชุ่มชื้นของผิวหนัง, การหายของบาดแผล และ การเกิดเนื้องอกของผิวหนัง .....	21
ภาพประกอบ 7 การเกิดปฏิกิริยาของ WST-1 ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสเปลี่ยนเป็นฟอร์มาซาน .....	23
ภาพประกอบ 8 นิวคลีโอไทด์สายคู่ (double-stranded helix) .....	24
ภาพประกอบ 9 การแสดงออกของยีนหรือกระบวนการสร้างโปรตีนในยูคาริโอตเซลล์.....	25
ภาพประกอบ 10 กระบวนการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA).....	26
ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR.....	27
ภาพประกอบ 12 กราฟวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR.....	28
ภาพประกอบ 13 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย เน้นการดำเนินงานวิจัยในส่วนที่ไฮไลต์.....	30
ภาพประกอบ 14 Hemocytometer .....	36
ภาพประกอบ 15 แสดงแผ่นเซลล์และพื้นที่บาดแผล .....	38
ภาพประกอบ 16 ขั้นตอนการสกัด RNA ด้วย RNeasy spin column .....	41

ภาพประกอบ 17 ภาพถ่ายแสดงลักษณะการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราตินโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย bael leaf oil ความเข้มข้น 0, 5, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ (กำลังขยาย 40 เท่า).....	57
ภาพประกอบ 18 ภาพถ่ายแสดงลักษณะการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราตินโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย limonene ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.1 และ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (กำลังขยาย 40 เท่า).....	58
ภาพประกอบ 19 ภาพถ่ายแสดงลักษณะการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราตินโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย trans-caryophyllene ความเข้มข้น 0, 0.8, 4 และ 8 $\mu\text{g/mL}$ (กำลังขยาย 40 เท่า).....	59
ภาพประกอบ 20 แสดงตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยการยื่นหรือแผ่ส่วนของเซลล์ (filopodia and lamellipodia formation) (ลูกศรสีดำ) บริเวณขอบของบาดแผลเข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลของเซลล์เคราตินโนไซต์ (HaCaT) ของกลุ่มที่ยังไม่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง), กลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ กลุ่มที่เซลล์ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม และ สารทรานแคโรฟิลลีน ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200 เท่า).....	64
ภาพประกอบ 21 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของ RNA ด้วย agarose gel electrophoresis ....	66
ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงระดับการเรืองแสงของอาร์เอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ...	67
ภาพประกอบ 23 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ที่เกี่ยวข้องกับยีนอะควาพอริน-3 ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในการส่งเสริมการสมานแผล....	75



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ภูมิหลัง

ผิวหนังทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันระหว่างร่างกายและสิ่งแวดล้อมภายนอกเมื่อร่างกายเกิดบาดแผลที่ผิวหนังจะมีกระบวนการรักษาบาดแผลเกิดขึ้นเองตามกลไกธรรมชาติ โดยการหายของบาดแผลในแต่ละคนใช้ระยะเวลาในการรักษาแตกต่างกันอาจเกิดจากความผิดปกติของผิวหนัง ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาแผลอาจติดเชื้อแบคทีเรียแล้วนำไปสู่แผลเรื้อรังได้ และเมื่อแผลหายสนิทแล้วจะเกิดรอยแผลเป็นที่เกิดจากเซลล์สร้างคอลลาเจนมาซ่อมแซมบริเวณบาดแผลมากเกินไป มีรายงานว่า beta-caryophyllene ซึ่งเป็นสารประเภท terpenes ในน้ำมันหอมระเหยที่พบในพริกไทยดำ อบเชย กานพลู ลาเวนเดอร์ และกัญชา เป็นต้น (Fidy et al., 2016) มีฤทธิ์ช่วยในการรักษาบาดแผลบนผิวหนังของหนูโดยทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการรักษาบาดแผล (Koyama et al., 2019) และผลการศึกษาในหนูที่มีบาดแผลพบว่าการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (aquaporin-3, AQP-3) ปริมาณมากบริเวณบาดแผลที่มีความสัมพันธ์ในการส่งเสริมการหายของบาดแผล (Kyoko Nakahigashi et al., 2011)

ในปัจจุบันมีความนิยมเลือกใช้การแพทย์ทางเลือกมากขึ้นกล่าวคือมีการนำส่วนของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากส่วนของพืชมาใช้มากขึ้น จากการสืบค้นงานวิจัยพบว่าในใบมะตูมมีน้ำมันหอมระเหยประเภท terpenes ได้แก่ limonene, caryophyllene,  $\alpha$ -phellenderene,  $\alpha$ -pinene (Verma et al., 2014) เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งอาจมีฤทธิ์ช่วยในการรักษาบาดแผลได้ อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีรายงานการศึกษาฤทธิ์และกลไกของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมต่อการหายของบาดแผล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการแพทย์ทางเลือกในการนำน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมมาใช้ศึกษาฤทธิ์การหายของบาดแผล รวมถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 โดยศึกษาในเซลล์เคราติโนไซต์ของมนุษย์ (Human keratinocyte cell line, HaCaT) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหายของบาดแผลที่ชั้นผิวหนัง (Massimo M. Santoro & Giovanni Gaudino, 2005) หากงานวิจัยดำเนินไปตามเป้าหมาย น้ำมันหอมระเหยใบมะตูมอาจนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกที่ใช้สำหรับรักษาบาดแผลที่ผิวหนังที่มีความปลอดภัย มีประสิทธิผลที่ดี



## 1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของบาดแผลของน้ำมันหอมระเหยจากไบบะตุ้มในเซลล์เคราตินโนไซต์ของมนุษย์
2. ศึกษาการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในกลไกการหายของบาดแผลในเซลล์เคราตินโนไซต์ของมนุษย์

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เคราตินโนไซต์ของมนุษย์ ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการหายของบาดแผล
2. ศึกษากลไกการหายของบาดแผลในระดับเซลล์เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นที่ทำให้บาดแผลหายดีที่สุด โดยวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราตินโนไซต์ของมนุษย์

## 1.4 ตัวแปรที่ศึกษา

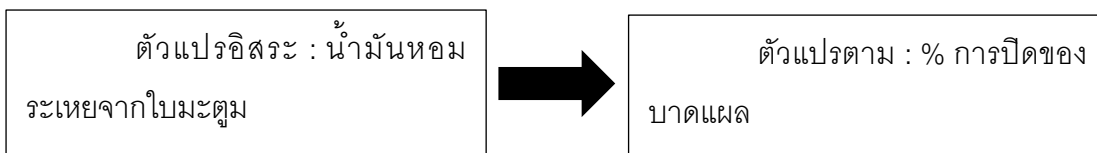
1. การทดสอบฤทธิ์การหายของบาดแผล  
ตัวแปรอิสระ : ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากไบบะตุ้ม  
ตัวแปรตาม : % การหายของบาดแผล
2. การแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3  
ตัวแปรอิสระ : ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากไบบะตุ้มที่ทำให้บาดแผลหายดีที่สุด  
ตัวแปรตาม : ระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3

## 1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

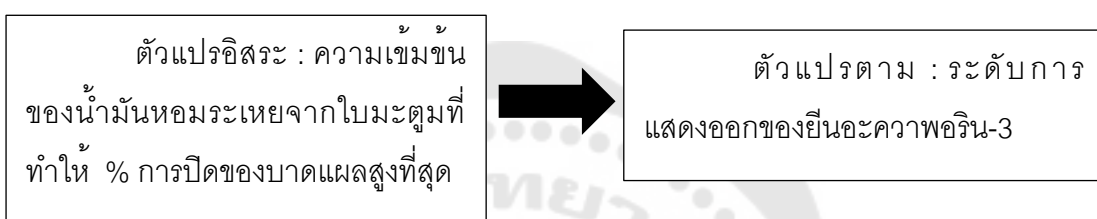
1. กระบวนการหายของบาดแผล คือ การซ่อมแซมเมื่อผิวหนังเกิดบาดแผลซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยมี 4 ระยะ ได้แก่ ระยะห้ามเลือด ระยะอักเสบ ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์ และระยะการปรับเปลี่ยนสู่สภาวะปกติ
2. การหายของบาดแผล คือ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากขอบของบาดแผลเข้ามาใกล้กันและประสานเป็นเนื้อเดียวกัน
3. น้ำมันหอมระเหยจากไบบะตุ้ม คือ น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ วิธีการกลั่นโดยไบบะตุ้มแช่อยู่ในน้ำเดือดและใช้ความร้อนเพื่อให้กลิ่นน้ำมันหอมระเหยออกจากไบบะตุ้ม

## 1.6 กรอบแนวคิดในงานวิจัย

### 1. การทดสอบฤทธิ์การหายของบาดแผล



### 2. การแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3



## 1.7 สมมุติฐานในการวิจัย

น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมมีผลกระตุ้นการเคลื่อนที่หรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์เคราตินในไซโตพลาสซึมของมนุษย์ ช่วยส่งเสริมการหายของบาดแผลและสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ภายในเซลล์

## 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบถึงความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมต่อการหายของบาดแผล
- เข้าใจกลไกการหายของบาดแผลที่เกิดจากฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมว่าสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 มะตูม

##### 2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะตูมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aegle marmelos* (L.) Correa (Bael) จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae มีถิ่นกำเนิดในภาคเหนือของอินเดีย พบได้ทั่วไปในคาบสมุทรอินเดียและในประเทศศรีลังกา พม่า บังกลาเทศ ไทยและอินโดจีน (Rahman & Parvin, 2014) ลำต้นสูง 18 เมตร เปลือกลำต้นมีสีเทาเรียบเป็นร่องตื้น เนื้อไม้แข็ง มีสีขาวแกมเหลืองและมีกลิ่นหอมโคนต้นและกิ่งก้านมีหนามแหลมยาว แข็ง ออกเดี่ยวหรือเป็นคู่ตามกิ่ง ใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปไข่หรือรูปหอก มี 3 ใบ ดอกสีขาวหรือขาวอมเขียว มีกลิ่นหอม ผลมีเปลือกแข็งเรียบและมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-15 เซนติเมตร เนื้อผลเหนียวข้น มีกลิ่นหอม และมีเมล็ดจำนวนมากแทรกอยู่ในเนื้อผล โดยเมล็ดจะมีขนหนาปกคลุม (Wikipedia สารานุกรมเสรี, 2020: Online) (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะของใบมะตูม

### 2.1.2 สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในใบมะตูม

Verma et al. (2014) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยตามฤดูกาลในใบมะตูมโดยทำการสกัดด้วยวิธี hydrodistillation และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค gas chromatography (GC) และ gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) พบสารสำคัญกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ได้แก่ limonene 31.0–90.3%,  $\alpha$ -phellandrene <0.05–43.5%, (E)- $\beta$ -ocimene 0.7–7.9%,  $\alpha$ -pinene <0.05–7.5% และ (E)-caryophyllene 0.5–5.3%,  $\beta$ -elemene <0.05–4.2% และ germacrene B 0.0–3.3%

Fawzi Mahomoodally et al. (2018) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยและคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในใบมะตูมโดยนำใบสดมาทำการสกัดด้วยวิธี hydrodistillation และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีสาร limonene มากถึง 74.9% ตามด้วย  $\beta$ -phellandrene 4.4%, *p*-cymene 4.2%, (E)- $\beta$ -ocimene 2.5% และ  $\beta$ -caryophyllene 2.0%

Rathee et al. (2017) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในใบมะตูมทำการแยกน้ำมันหอมระเหยโดยใช้วิธีการสกัดแบบ hydrodistillation และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC-MS จากการวิเคราะห์พบองค์ประกอบที่สำคัญถึง 13 ชนิด มากกว่า 85% เป็นองค์ประกอบของน้ำมันซึ่งพบเป็นสารประกอบโมโนเทอร์พีน ได้แก่ limonene 67.83%, caryophyllene 8.76%,  $\alpha$ -Ocimene 4.84%, cubedol 3.29%, humulene 2.84%, myrcene 2.60% และ  $\alpha$ -copaene 2.53%

Satyal et al. (2012) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยและฤทธิ์ทางชีวภาพในใบมะตูมในประเทศเนปาล โดยนำใบสดมาบดและทำการสกัดด้วยวิธี hydrodistillation และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS พบองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่สามารถระบุได้ถึง 81 ชนิด องค์ประกอบหลักที่พบในปริมาณมากที่สุด ได้แก่ limonene 64.1%, (E)- $\beta$ -ocimene 9.7%, germacrene B 4.7%, (E)-caryophyllene 2.4%, myrcene 2.0%, (Z)- $\beta$ -ocimene 1.9%, (2Z,6E)-farnesol 1.9%, linalool 1.8% และ  $\gamma$ -curcumene 1.7%

Nabaweya A. Ibrahim et al. (2015) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมในประเทศอียิปต์ โดยนำใบสดมาทำการสกัดด้วยวิธี hydrodistillation และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS พบองค์ประกอบสำคัญ 27 ชนิดในน้ำมันหอมระเหยพบมาก ได้แก่  $\alpha$ -phellandrene 20.97%,  $\alpha$ -

pinene 17.76% ,  $\delta$ -carene 16.37%  $\gamma$ -cadinene 8.01% , *trans*-2-hydroxycinnamic acid 6.85% และ  $\beta$ -myrcene 4.32%

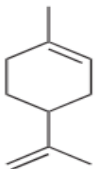
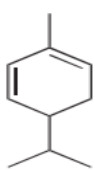
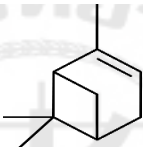
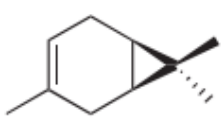
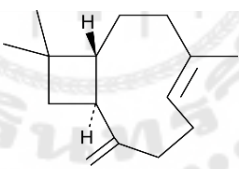

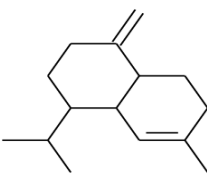
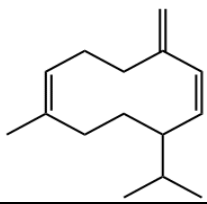
จากรายงานการศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในใบมะตูมด้วยเทคนิค GC-MS ที่สกัดด้วยวิธี hydrodistillation พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในใบมะตูมคือ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (ตาราง 1) โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบมะตูมแสดงใน (ตาราง 2) และองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำที่ใช้ในการศึกษานี้แสดงใน (ตาราง 3)



ตาราง 1 องค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม

Ram S Verma <i>et al.</i> ,2013	Mohamad Fawzi Mahomoodallya Verma <i>et al.</i> ,2018	Deepti Rathee Verma <i>et al.</i> ,2017	Prabodh Satyal. <i>et al.</i> ,2012	Nabaweya A. Ibrahim <i>et al.</i> ,2015
limonene (31.0–90.3%)	limonene (74.9%)	limonene (67.83%)	limonene (64.1%)	$\alpha$ -phellandrene (20.97%)
$\alpha$ - phellandrene (<0.05–43.5%)	$\beta$ -phellandrene (4.4%)	caryophyllene (8.76%)	(E)- $\beta$ -ocimene (9.7%)	$\alpha$ -pinene (17.76%)
(E)- $\beta$ -ocimene (0.7–7.9%)	p-cymene (4.2%)	$\alpha$ -ocimene (4.84%)	germacrene B (4.7%)	$\delta$ -carene (16.37%)
$\alpha$ -pinene (<0.05–7.5%)	(E)- $\beta$ -ocimene (2.5%)	cubedol (3.29%)	(E)- caryophyllene (2.4%)	$\gamma$ -cadinene (8.01%)
(E)- caryophyllene (0.5–5.3%)	$\beta$ - caryophyllene (2.0%)	humulene (2.84%)	myrcene (2.0%)	trans-2- hydroxycinnmic acid (6.85%)

ตาราง 2 แสดงโครงสร้างองค์ประกอบหลักของสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่พบในใบมะตูม

สารหลัก	โครงสร้าง	สูตรโมเลกุล
limonene		$C_{10}H_{16}$
$\alpha$ -phellandrene		$C_{10}H_{16}$
$\alpha$ -pinene		$C_{10}H_{16}$
$\delta$ -carene		$C_{10}H_{16}$
caryophyllene		$C_{15}H_{24}$
(E)- $\beta$ -ocimene		$C_{10}H_{16}$
$\gamma$ -cadinene		$C_{15}H_{24}$
germacrene D		$C_{15}H_{24}$

ตาราง 3 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในใบมะตูมที่ใช้ในการศึกษานี้ (ได้จากการสกัดด้วยวิธี hydrodistillation และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยวิธี GC-MS)

ลำดับ	องค์ประกอบ	อัตราส่วน (%)
1	beta-myrcene	0.072
2	limonene	0.321
3	cis-ocimene	1.512
4	trans-ocimene	6.591
5	linalool	3.995
6	octatriene-2-ol	1.399
7	beta-elemene	11.322
8	trans-caryophyllene	14.863
9	alpha-humulene	6.252
10	germacrene D	24.659
11	germacrene B	3.594
12	germacrene A	11.647
13	delta-cadinene	1.238
14	caryophyllene oxide	4.603
15	unknown	2.758
16	unknown	3.223
17	phytol	1.953

### 2.1.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบมะตูม

ใบมะตูมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการปวดและต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

ฤทธิ์ต้านการปวดและต้านการอักเสบในหนูเห็ดออกจากใบและผลมะตูมที่สกัดด้วยเอทานอลโดยให้ยาขนาด 100 และ 200 mg/kg ของน้ำหนักตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนการทดสอบด้วยวิธี Eddy's hot plate เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ 1% carboxy methyl cellulose เป็น negative control และ pentazocine 10 mg/kg เป็น positive control พบว่าสารสกัดจากใบและผลที่ขนาด 200 mg/kg มีฤทธิ์ต้านการปวดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) และวิธี acetic



acid induced writhing เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ diclofenac 10 mg/kg เป็น positive control พบว่าสารสกัดจากใบและผลที่ขนาด 200 mg/kg มีฤทธิ์ต้านการปวดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ในส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบทดสอบด้วยวิธี carrageenan induced paw edema ที่ขนาดยา 200 mg/kg เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ diclofenac 10 mg/kg เป็น positive control พบว่าสารสกัดจากใบและผลที่ขนาด 100 และ 200 mg/kg มีฤทธิ์ลดการอักเสบไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ( $P > 0.05$ ) (K et al., 2017)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบเรื้อรังในหนูของสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากใบมะตูมโดยใช้วิธี cotton pellet implantation ป้อนยาให้ทางปากเป็นเวลา 7 วัน ในขนาด 100 mg/kg ของน้ำหนักตัวเทียบกับยาต้านการอักเสบมาตรฐาน indomethacin 10 mg/kg พบว่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการก่อตัวของแกรนูโลมาหลังการรักษาด้วยสารสกัดด้วยน้ำเท่ากับ 16.5% เอทานอล 25.72% และ indomethacin 39.37% (Rahman, Eva, et al., 2016)

ฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะอาหารเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูด้วย 90% เอทานอล 1 mL/ต่อน้ำหนักตัวหนู 1 kg หลังจาก 1 ชั่วโมง หนูจะได้รับสารสกัดเอทานอลจากใบมะตูม 400 mg/kg ของน้ำหนักร่างกายและได้รับ omeprazole 10 mg/kg จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบ 400 mg/kg สามารถยับยั้งแผลในกระเพาะอาหารได้ 56.33% และ omeprazole ยับยั้งแผลในกระเพาะอาหารได้ 50.44% (Rahman, Quader, et al., 2016)

ฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระศึกษาผลของสารสกัดจากใบมะตูมที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ เฮกเซน ในการต้านเชื้อ *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *E. coli* และเชื้อรา *A. niger*, *A. flavus* และ *Fusarium* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดจาก อะซีโตน และ เฮกเซน มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *P. aurogenosa* และสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดใบมะตูมด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 63.84% (Karumaran et al., 2016)

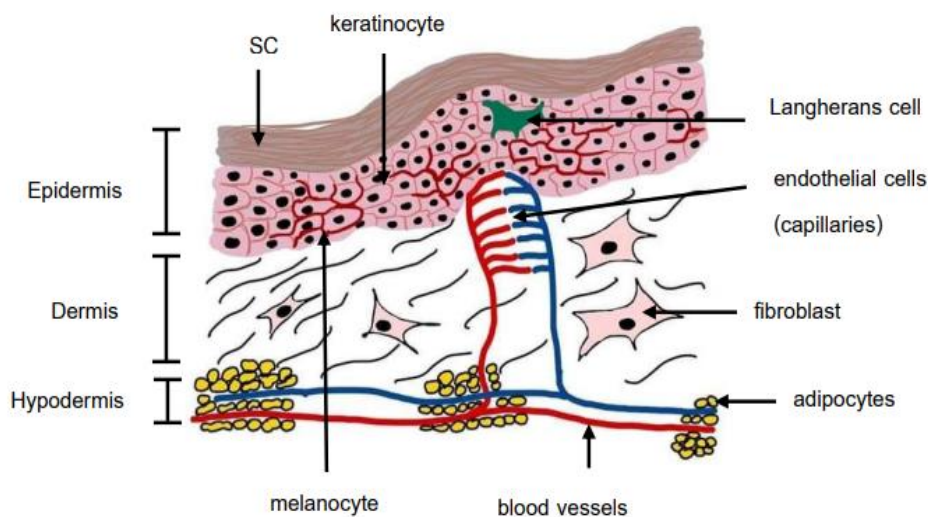
## 2.2 ระบบห่อหุ้มร่างกาย

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกายมีหน้าที่ปกป้องอวัยวะภายในจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ช่วยป้องกันเชื้อโรคและอันตรายต่างๆ จากภายนอก ป้องกันการระเหยของน้ำใต้ผิวหนังและช่วยรักษาอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่ เป็นต้น ผิวหนังของคนเราประกอบด้วย 3 ชั้นหลัก (Patel et al., 2017) (ภาพประกอบ 2) คือ

1. ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) มีส่วนประกอบหลัก 4 ชนิด คือ เซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) เซลล์เมลานินไซต์ (melanocytes) เซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (langerhans cells) และ เซลล์เมอร์เกิล (merkel cells)

2. ชั้นหนังแท้ (dermis) ประกอบด้วยไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ทำหน้าที่สร้างคอลลาเจน (collagen) อีลาสติน (elastin) และมีส่วนประกอบของมาตริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ในชั้นนี้จะมีส่วนหลอดเลือด (capillaries) จำนวนมาก

3. ชั้นไขมัน (hypodermis) ประกอบด้วยเซลล์ไขมัน (adipocytes) เป็นแหล่งพลังงานให้ความอบอุ่นแก่ร่างกายจากความหนาวเย็นและความบาดเจ็บ



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างผิวหนัง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Boury-Jamot et al. (2009).

ในชั้นหนังกำพร้าซึ่งเป็นชั้นนอกสุดของผิวหนัง มีความหนาประมาณ 0.05-0.1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเซลล์หลัก 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์เคราติโนไซต์ เซลล์เมลานोไซต์ เซลล์แลงเกอร์ฮานส์ และ เซลล์เมอร์กิล โดยเซลล์เคราติโนไซต์เป็นเซลล์หลักในชั้นของหนังกำพร้าประเภท stratified squamous epithelium เซลล์เคราติโนไซต์จะยึดติดกันด้วยโปรตีนหลายกลุ่มที่สำคัญ คือ เดสโมโซม (desmosome) สำหรับการยึดติดกับหนังแท้มีชั้น basement membrane (Dermo-epidermal junction) เป็นตัวกั้น มีส่วนประกอบโปรตีนหลายชนิดในชั้นนี้ เช่น เฮมิเดสโมโซม (hemidesmosome) คอลลาเจนประเภทที่ 1, 2, 3 เป็นต้น

เซลล์เคราติโนไซต์ที่ผิวหนังสามารถแบ่งเป็นชั้นต่างๆ ตามรูปร่างและส่วนประกอบในเซลล์เรียงจากชั้นในไปนอกสุด ดังนี้

**stratum basale** เป็นชั้นล่างสุดในชั้นนี้พบมีเคราติโนไซต์ที่มีคุณสมบัติเป็นสเต็มเซลล์ (stem cell) ของผิวหนังซึ่งสามารถแบ่งตัวและสร้างเป็นเซลล์เคราติโนไซต์ตัวใหม่ได้

**stratum spinosum** เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์เคราติโนไซต์ซ้อนกัน รูปร่างเป็นหนาม (spinous/prickle cell)

**stratum granulosum** ประกอบด้วยเซลล์เคราติโนไซต์ซ้อนกัน 3-5 ชั้น ลักษณะเด่นคือมี เม็ดแกรนูล (granule) ภายในเซลล์ซึ่งเม็ดแกรนูล ดังกล่าวคือ keratohyaline granules มีหน้าที่ช่วยในการสร้างเคราติน

**stratum corneum** หรือผิวหนังชั้นขี้ไคลเป็นชั้นนอกสุดของหนังกำพร้า ประกอบด้วย เซลล์เคราติโนไซต์ที่ไม่มีนิวเคลียส เรียกว่า คออร์นีโอไซต์ (corneocytes) ตัวเซลล์จะแบนมีไขมันมาเคลือบระหว่างเซลล์

สำหรับชั้น **stratum lucidum** เป็นเพียงช่องว่างระหว่างชั้น stratum granulosum and stratum corneum โดยจะพบแค่ผิวหนังบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า บางครั้งเรียกรวมผิวหนังชั้น stratum basale และ stratum spinosum ว่าเป็น stratum malpighii

การแบ่งตัวและเจริญของเคราติโนไซต์ จากชั้น stratum basale ไปถึงชั้น stratum corneum ใช้เวลา 2 สัปดาห์ และชั้น stratum corneum ใช้เวลาดอกหลุดอีก 2 สัปดาห์ ทำให้ระยะเวลารวมของผิวหนัง ชั้นกำพร้าจากชั้นล่างสุดเจริญไปจนเป็นชั้นขี้ไคลแล้วหลุดใช้เวลา รวม 4 สัปดาห์

## 2.3 กลไกการรักษาบาดแผล

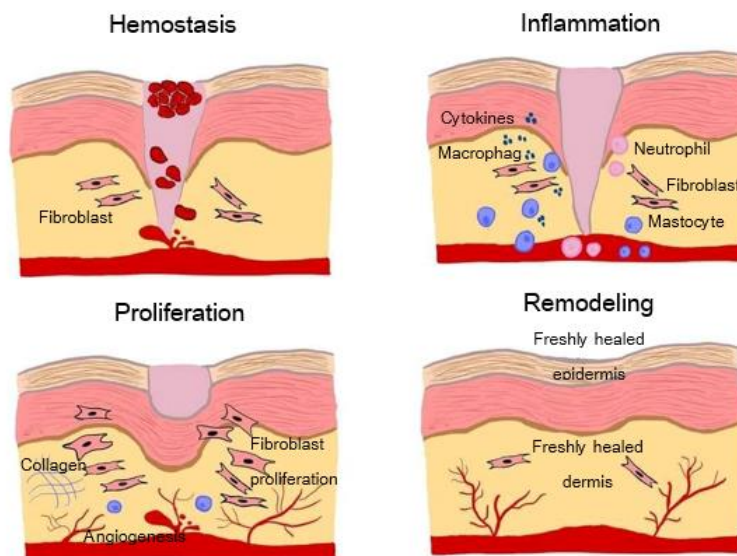
กลไกการรักษาบาดแผลที่ผิวหนังเมื่อเกิดการบาดเจ็บชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้ในคนที่ปกติร่างกายจะมีกลไกในการซ่อมแซมเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยมี 4 ระยะ (ภาพประกอบ 3) ดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะห้ามเลือด (hemostasis phase) หลังจากได้รับบาดเจ็บหลอดเลือดที่ถูกทำลายจะหดตัว (vasoconstriction) จากนั้นเกล็ดเลือดจะถูกกระตุ้นให้มารวมตัว (aggregation) จับกันเป็นลิ่มเลือด ผสานเป็นร่างแหอุดรอยรั่วของหลอดเลือดทำให้เลือดไม่ไหลออก (fibrin clot) เพื่อป้องกันแบคทีเรียและเชื้อโรคเข้าสู่บริเวณแผล

ระยะที่ 2 ระยะอักเสบ (inflammation phase) หลังการควบคุมการไหลของเลือดได้ เซลล์ภูมิคุ้มกัน (mastocyte) จะหลั่งไฮสตามีนและสารเคมีอื่น ๆ ไปยังบริเวณแผลเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ทำให้แผลมีลักษณะบวมแดง (Lorena Maria Cucci et al., 2021) จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลล์ (neutrophil) และมาโครฟาจ (macrophage) จำนวนมากจะออกมากำจัดแบคทีเรียและเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว นอกจากนี้ยังมีการหลั่งสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factors) ที่จำเป็นต่อการสร้างเมทริกซ์ กระตุ้นการสร้างไฟโบรบลาสต์ และสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) เพื่อช่วยฟื้นฟูหลังจากเกิดแผล

ระยะที่ 3 ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation phase) ในระยะนี้จำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนและสารอาหารที่เพียงพอเพื่อสังเคราะห์คอลลาเจน โดยไฟโบรบลาสต์ เคลื่อนที่เข้าไปที่แผลทำการสร้างเส้นใยโปรตีนที่เรียกว่า คอลลาเจนประเภทที่ 3 (type III collagen) โดยสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ส่งผลให้แผลแข็งแรงเกิดสะเก็ดปกคลุมแผลในขณะเดียวกันก็ทำหน้าที่สร้างเส้นเลือดใหม่

ระยะที่ 4 ระยะการปรับเปลี่ยนสู่สภาวะปกติ (remodeling phase) ขั้นตอนของระยะนี้คือการหดตัวของแผลเกือบหายดีและคอลลาเจนประเภทที่ 3 สะสมไว้เปลี่ยนแปลงไปเป็นรูปแบบของคอลลาเจนประเภทที่ 1 (type I collagen) ซึ่งมีความต้านทานต่อแรงดึง ผิวหนังและหลอดเลือดแข็งแรงขึ้นกระบวนการนี้อาจใช้เวลามากกว่า 1 ปี โดยมีความแข็งแรงประมาณ ร้อยละ 80 ของผิวหนังปกติเท่านั้น (นงนุช หอมเนียม, 2557)



### ภาพประกอบ 3 กลไกของการรักษาบาดแผลและส่วนประกอบหลักของเซลล์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Lorena M. Cucci et al. (2021).

เซลล์เคราติโนไซต์ เป็นเซลล์ที่อยู่ล่างสุดในชั้นล่างสุดของชั้นหนังกำพร้ามีการแบ่งตัวตลอดเวลา โดยเซลล์ชนิดนี้จะมีการเคลื่อนที่สู่ชั้นผิวหนังด้านบนเมื่อมีอายุมากขึ้น และเกิดการเสื่อมสภาพจนกลายเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว โดยเซลล์เคราติโนไซต์ทำหน้าที่ป้องกันการสูญเสียน้ำให้กับชั้นของผิวหนัง (M. M. Santoro & G. Gaudino, 2005)

เซลล์เคราติโนไซต์ยังทำหน้าที่ในการฟื้นฟูผิวหนังชั้นนอกหลังจากได้รับบาดเจ็บ โดยเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมบาดแผลหลังจากกระบวนการอักเสบของบาดแผล ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่เรียกว่า re-epithelialization โดยจะมีการเคลื่อนที่ (migration) และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ของเซลล์เคราติโนไซต์จากขอบของบาดแผล (wound edge) เข้ามาสู่บริเวณบาดแผล (denuded area) (Pastar et al., 2014; Massimo M. Santoro & Giovanni Gaudino, 2005)

ในสัตว์ทดลองการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่

1. เกิดการสลายของโปรตีนเฮมิเดสโมโซมที่เชื่อมระหว่างเซลล์เคราติโนไซต์กับชั้นหนังกำพร้าและมาตริกซ์นอกเซลล์
2. เกิดการหดสั้นของโปรตีนภายในเซลล์ ได้แก่ tonofilaments และ keratin filaments



3. เกิดการสลายตัวของโปรตีนเดสโมโซม ที่ทำหน้าที่ยึดติดเซลล์กับเซลล์ข้างเคียง

4. เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสายใยแอกติน (actin filament) เกิดการสร้างส่วนยื่นออกมา เรียกว่า ลามेलลิโพเดีย (lamellipodia) และเกิดการยึดติดกับมาตริกซ์นอกเซลล์ครั้งใหม่ (focal contacts) เพื่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Singer & Clark, 1999)

โดยเซลล์เคราติโนไซต์ที่บริเวณขอบของบาดแผลจะทำหน้าที่เป็นตัวนำ (leading keratinocyte) จะเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (actively migrating cells) สู่บริเวณของบาดแผล ส่วนเซลล์เคราติโนไซต์ส่วนที่ติดตามมานั้นจะเกิดการแบ่งตัว เกิดเป็นพื้นของบาดแผล (wound bed) โดยในสัตว์ทดลอง การเคลื่อนที่และการแบ่งตัวของเซลล์ทั้งสองส่วนนี้ เกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของปัจจัยหลัก ได้แก่ สารกระตุ้นการเจริญเติบโต, อินทิกริน (Integrin), เอนไซม์ metalloproteases (MMPs) รวมถึงองค์ประกอบของโปรตีนภายในมาตริกซ์นอกเซลล์ที่แตกต่างกัน (ตาราง 4)

การเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์หลังจากที่เกิดบาดแผลขึ้น นั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เช่น Macrophage stimulating proteins ช่วยกระตุ้นกระบวนการ re-epithelization เมื่อจับกับ Ron tyrosine kinase receptor, Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ช่วยกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น โปรตีนอินทิกริน และ เอนไซม์ metalloproteases โดยการทำงานของโปรตีนอินทิกรินที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์ ได้แก่  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha v\beta 6$  ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนภายในมาตริกซ์นอกเซลล์ คือ Laminin 5 ทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signalling) ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง นอกจากนี้เอนไซม์ metalloproteases-1, 2, 9 และ 10 ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในมาตริกซ์นอกเซลล์ในขณะที่เซลล์เกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่บาดแผล และกระตุ้นการเชื่อมการยึดติดระหว่างเซลล์ได้

ตาราง 4 แสดงความสัมพันธ์ของประเภทของ growth factors, Integrin, เอนไซม์ metalloproteases (MMPs) ที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์ ที่บาดแผลของหนู ในกระบวนการ re-epithelialization

	Reepithelization (migration)	Reepithelization (proliferation)
Growth factors	MSP, TGFb1	EGFs, TGFa, KGF, GM-CSF
Integrins	a3b1, a6b4, avb6	avb3/b5, b4, b1
ECM	Laminin-5	Laminins and collagens
MMPs	MMP-1, 2, 9, 10	MMP3

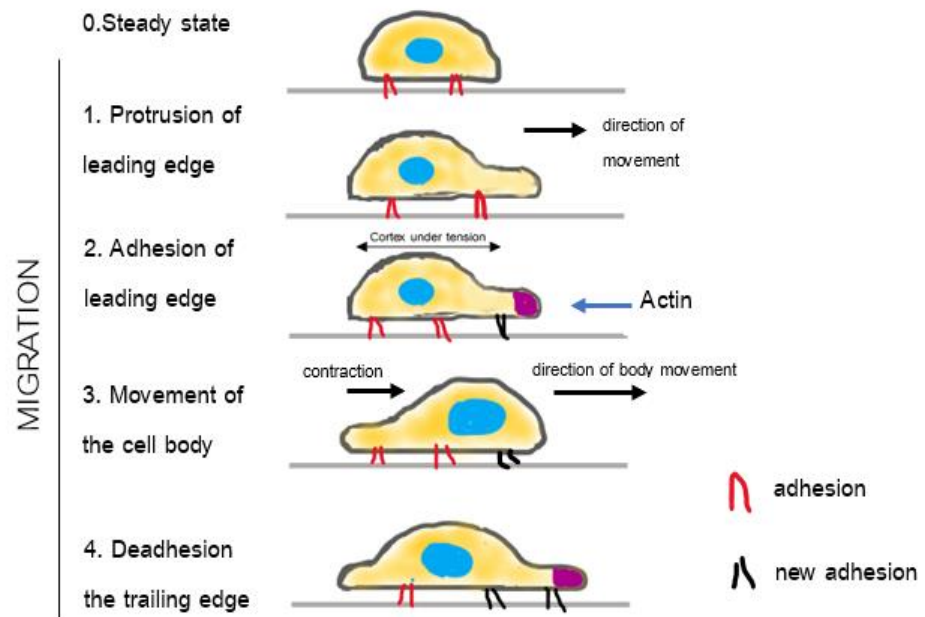
ที่มา : M. Santoro and G Gaudino (2005).

## 2.4 การเคลื่อนที่ของเซลล์

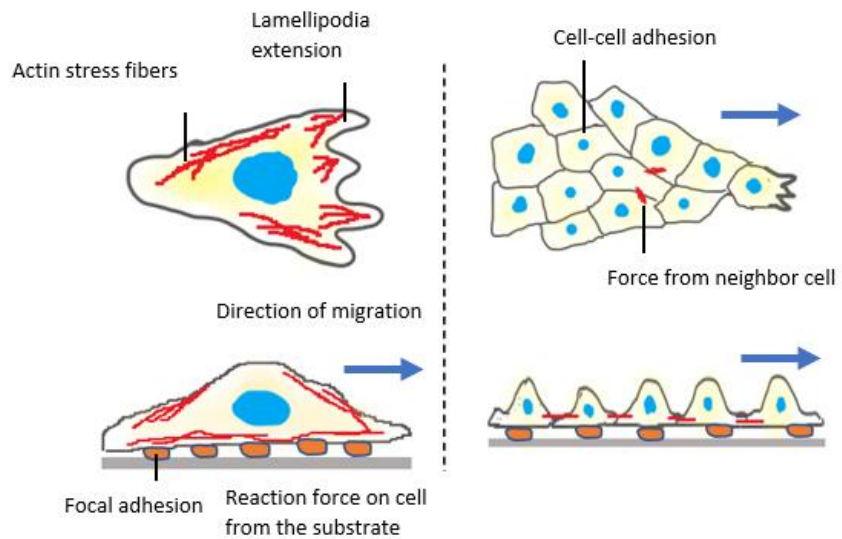
เป็นกลไกในระดับโมเลกุลที่ตอบสนองต่อปัจจัยภายนอก เช่น การเคลื่อนที่ของเซลล์เพื่อสมานแผล โดยมีลำดับในการเคลื่อนที่ของเซลล์เริ่มจาก 1) การยื่นออก (protrusion) ของลามลลิโพเดียและฟิลิโพเดีย (filopodia) ตรงบริเวณขอบนำของเซลล์ที่เต็มไปด้วยเส้นใยแอกติน การยื่นออกของฟิลิโพเดียทำหน้าที่เป็นเซ็นเซอร์ในการตรวจสอบสภาพแวดล้อมในการย้ายเซลล์ 2) การยึดเกาะ (adhesion) เซลล์จะแผ่ส่วนลามลลิโพเดียออกมายึดกับมาตริกซ์นอกเซลล์เพื่อสร้างแรงดึงทำให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 3) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (movement) เซลล์ส่วนท้ายจะมีการหลุดเข้าไปในทิศทางเดียวกับตัวเซลล์ 4) ถอนการยึดเกาะ (deadhesion) เซลล์ส่วนท้ายถอนออกจากมาตริกซ์เก่าที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ MMPs และเคลื่อนที่ต่อไปข้างหน้า (ภาพประกอบ 4 A) (Bras et al., 2022)

การเคลื่อนที่ของเซลล์ในกระบวนการสมานแผลมีลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์ประสานกันเป็นกลุ่มเซลล์ (collective cell migration) โดยการยึดเกาะกันและมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และเซลล์ ด้วย แอดฮีเอร์เรนส์จังก์ชัน (adherens junction), เดสโมโซม (desmosome), ไทท์จังก์ชัน (tight junctions) และ แกปจังก์ชัน (gap junction) เพื่อให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพร้อมกันได้ (ภาพประกอบ 4 B) (Shellard & Mayor, 2020)

(A)



(B)



ภาพประกอบ 4 แสดงลำดับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (A) การเคลื่อนที่ของเซลล์แบบเซลล์เดี่ยวและแบบกลุ่มเซลล์ที่มีการยึดเกาะระหว่างเซลล์และเซลล์ (B)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Saw et al. (2015).



## 2.5 น้ำมันหอมระเหยต่อกระบวนการรักษาบาดแผล

ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์รักษาบาดแผลจากน้ำมันหอมระเหย *Oregano* เป็นพืชในวงศ์ *lamiaceae* โดยทดสอบในเซลล์เคราติโนไซต์ของมนุษย์ (HaCaT) พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS คือสารประเภทโมโนเทอร์พีน ได้แก่ *carvacrol* 35.95%, *thymol* 25.02% และ *p-cymene* 21.54% ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย *interferon-gamma* (IFN), *histamine* (H) พบว่าสามารถลดสารสื่อกลางในการกระตุ้นการอักเสบ (pro-inflammatory) ได้แก่ ROS, ICAM-1, iNOS, COX-2, 8-OHdG, MMP-1 และ MMP-12 และในส่วนฤทธิ์สมานแผลจากการทดสอบด้วยวิธี *scratch assay* พบว่าความเข้มข้น 25  $\mu\text{g/mL}$  ทำให้บาดแผลแคบลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (Avola et al., 2020)

ฤทธิ์รักษาบาดแผลของน้ำมันหอมระเหยที่มี *beta-caryophyllene* เป็นองค์ประกอบหลักทดสอบบนผิวหนังหนู โดยการหยदन้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 50 mg/kg ของน้ำหนักรับประทานของหนูที่ถูกทำให้เป็นแผล ทำการย้อมสี *Immunofluorescence* ของ *keratin-14* พบการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์บริเวณขอบของบาดแผลเข้าสู่บริเวณแผลมากกว่ากลุ่มควบคุม ในส่วน *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) พบว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนที่ขอบของแผลอย่างมากทั้งในการทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยและกลุ่มควบคุม ซึ่งผลของ *keratin-14* และ PCNA แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และการเพิ่มจำนวนของเซลล์หรือกระบวนการ *re-epithelialization* ทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (*proliferation*) ด้วย *5-bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ที่ผิวหนังชั้นนอก ที่รูขุมขน และบริเวณแผลและพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 26  $\mu\text{M}$  เซลล์มีการเพิ่มจำนวนสูงสุดและลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นแสดงว่าการรักษาด้วยน้ำมันหอมระเหย มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อใหม่มากกว่าการยับยั้งการอักเสบ ในส่วนผลการทดสอบการรักษาบาดแผลด้วยวิธี *scratch* พบว่าความกว้างของบาดแผลแคบลง 39.2% ในขณะที่กลุ่มควบคุมแคบลง 6.7% ในเวลา 6 ชั่วโมง (Koyama et al., 2019)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหยจาก *Lindera erythrocarpa* จากการสกัดด้วยวิธี *hydrodistillation* วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบหลักได้แก่ *nerolidol* 18.73%, *caryophyllene* 14.41%,  $\alpha$ -*humulene* 7.73%, *germacrene D* 4.82% และ  $\alpha$ -*pinene* 4.47% พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเกิด *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *cyclooxygenase-2* (COX-2),

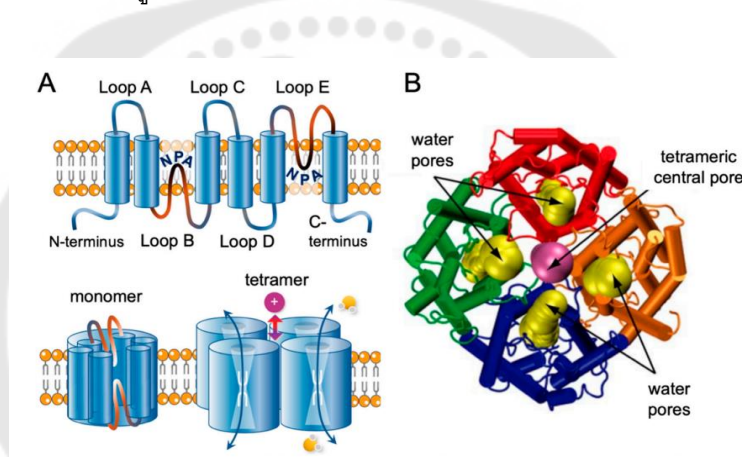
prostaglandin E2 (PGE2) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ใช้น้ำมันหอมระเหย (Ko et al. (2017) สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหยจาก *Tagetes minuta* ที่มีองค์ประกอบหลักได้แก่ Dihydrotagetone 33.86%, E-Ocimene 19.92%, tagetone 16.15%, cis- $\beta$ -ocimene (7.94%), Z-ocimene (5.27%) และ limonene 3.1% ผลการทดสอบพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/mL}$  สามารถลดการสร้าง NADH oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS) และลดการแสดงออกของยีน TNF- $\alpha$  ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (J774.1A) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) (Karimian et al., 2014)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหยจาก *Seseli gummiferum* (SG) และ *Seseli corymbosum* subsp. *coiybosum* (SC) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-FID และ GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก (SG) มีองค์ประกอบหลักได้แก่ germacrene D 54.1% และ sabinene 22.4% และในน้ำมันหอมระเหย (SC) ได้แก่  $\beta$ -phellandrene 29.2%,  $\alpha$ -phellandrene 8.2% และ germacrene D 2.5% ทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ผลการทดสอบพบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก (SG) และ (SC) สามารถยับยั้งการผลิต nitric oxide (NO) ที่  $IC_{50}$  เท่ากับ 108.2 และ 56.1  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับและยังสามารถยับยั้ง prostaglandin E2 (PGE2) ที่  $IC_{50}$  เท่ากับ 95.5  $\mu\text{g/mL}$  และ 49.4  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ สอดคล้องกับการลดลงของ inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) (Tosun et al., 2016)

ฤทธิ์รักษาบาดแผลในการนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกของน้ำมันหอมระเหยจาก lavender, chamomile, tea tree, thyme และ ocimum ทดสอบโดยหยदन้ำมันหอมระเหยจาก lavender และ chamomile ลงบาดแผลโดยตรงในผู้ป่วยบาดแผลเรื้อรัง 3-4 คน ผลการรักษาพบว่าบาดแผลหายเร็วกว่ากลุ่มควบคุม น้ำมันหอมระเหยจาก tea tree ใช้รักษาโรคกระดูกอักเสบและรักษาบาดแผลเรื้อรัง น้ำมันหอมระเหยจาก thyme ช่วยระงับความเจ็บปวดในหนูที่เกิดบาดแผลจากการถูกไฟไหม้และช่วยในการรักษาบาดแผล และการทา thyme ช่วยกระตุ้นการสะสมคอลลาเจนการสร้างเส้นเลือดและการเคลื่อนที่ของเคราตินไซโตในการรักษาบาดแผล ocimum ช่วยรักษาแผลสิ่ว (Woollard et al., 2007)

## 2.6 ความสัมพันธ์ของอะควาพอริน-3 กับการรักษาบาดแผล

อะควาพอริน (aquaporins; AQP) เป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านของน้ำและโมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่มีขั้ว พบโปรตีนชนิดนี้ได้ทั้งในแบคทีเรีย พืชและสัตว์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ orthodox aquaporins และ aquaglyceroporins โครงสร้างของอะควาพอรินประกอบด้วย 6 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วย loop A-E เรียกว่ามอโนเมอร์ (monomer) ในการควบคุมการผ่านของน้ำแต่ละมอโนเมอร์จะรวมกันเป็นเตตระเมอร์ (tetramer) (ภาพประกอบ 5 A) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำของ loop B และ E มีกรดอะมิโน NPA (asparagine-proline-alanine) ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้โมเลกุลที่มีประจุผ่านเข้าออก ในการรวมตัวเป็นเตตระเมอร์จะมีรูปร่างเหมือนเป็นรูเพื่อให้น้ำผ่าน (ภาพประกอบ 5 B) (Khan et al., 2021)

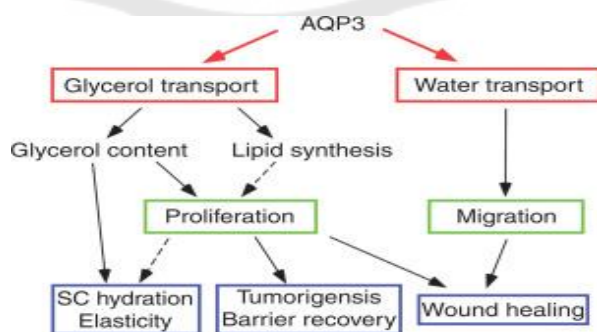


ภาพประกอบ 5 โครงสร้างมอโนเมอร์และการรวมตัวเป็นเตตระเมอร์ (A) และมุมมองจำลองภาพด้านบนในลักษณะการรวมตัวเป็นเตตระเมอร์ของอะควาพอรินแสดงช่องทาง การผ่านของน้ำ (B)

ที่มา: Khan et al. (2021).

อะควาพอรินที่พบในร่างกายมนุษย์มี 13 ชนิด ได้แก่ AQP0 ถึง AQP12 ซึ่ง AQP 0, 1, 2, 4, 5, 6 และ 8 เรียกว่า orthodox aquaporins ทำหน้าที่ขนส่งน้ำเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เดียวกัน AQP 3, 7, 9, และ 10 เรียกว่า aquaglyceroporins ทำหน้าที่ขนส่งกลีเซอรอล (glycerol) ยูเรีย (urea) แอมโมเนีย (ammonia) และโมเลกุลขนาดเล็กที่เป็นกลาง (Portincasa & Calamita, 2019) สำหรับอะควาพอรินที่พบบริเวณผิวหนัง ได้แก่ AQP1, AQP3, AQP5, AQP7, AQP9 และ AQP10 (Pastar et al., 2014; Massimo M. Santoro & Giovanni Gaudino, 2005) โดยพบการ

แสดงออกของยีนและโปรตีนอะควาพอรินชนิด AQP3, AQP9 และ AQP10 ที่เซลล์เคราติโนไซต์ในชั้นผิวหนังของมนุษย์และในสัตว์ทดลอง (Boury-Jamot et al., 2006; Ma et al., 2002; Sougrat et al., 2002; Y Sugiyama et al., 2001) และพบว่าอะควาพอริน-3 มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังมากที่สุด (Gaelle et al., 2007) จากการศึกษาโดยใช้หนูสายพันธุ์อะควาพอริน-3 null mice สนับสนุนความสำคัญของอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์ว่าทำหน้าที่กระตุ้นการขนส่งน้ำ (water transport) ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ เร่งให้เกิดการหายของบาดแผลที่ผิวหนัง (healing of cutaneous wounds) กระตุ้นให้เกิดการขนส่งกลีเซอรอล (glycerol transport) ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นและยืดหยุ่น (skin hydration and elasticity) และช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นต้น (Gaelle et al., 2007) อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของอะควาพอริน-3 ที่มากเกินไป (overexpression of AQP-3) ส่งผลให้เกิดความผิดปกติได้ เช่น เกิดเนื้องอกของผิวหนัง (skin tumorigenesis) ในโรค human squamous cell carcinoma เนื่องจากการกระตุ้นเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มากขึ้น (M. Hara-Chikuma & A. Verkman, 2008) นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของทั้งยีนและโปรตีนอะควาพอริน-3 ที่มากเกินไปยังเป็นผลให้เกิดโรคผิวหนังบางชนิด เช่น โรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic eczema) (Olsson et al., 2006) เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการสูญเสีย น้ำและผิวหนังแห้ง รวมถึงกระตุ้นเซลล์เคราติโนไซต์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature keratinocytes) ให้เพิ่มเป็นจำนวนมาก (hyperproliferation) ทำให้ทำหน้าที่เป็นตัวปิดกั้นความชุ่มชื้นของชั้นผิวหนังได้ไม่ดี (Boury-Jamot et al., 2006) ในทางกลับกันหากไม่มีการแสดงออกของอะควาพอริน-3 พบว่ามีความสัมพันธ์กับการบวมน้ำระหว่างเซลล์ (intercellular edema) (Gaelle et al., 2007)



ภาพประกอบ 6 แสดงความสัมพันธ์ของหน้าที่ของอะควาพอริน-3 (AQP-3) ที่เกี่ยวข้องกับ ความชุ่มชื้นของผิวหนัง, การหายของบาดแผล และ การเกิดเนื้องอกของผิวหนัง

ที่มา: M. Hara-Chikuma and A. S. Verkman (2008).

บทบาทของอะควาพอริน-3 ในกระบวนการหายของบาดแผล พบว่าการเพิ่มขึ้นของอะควาพอริน-3 ที่แสดงออกอย่างมากที่เซลล์เคราติโนไซต์ในชั้นหนังกำพร้า ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่งน้ำและกลีเซอรอลนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เคราติโนไซต์

การศึกษาการแสดงออกของอะควาพอริน-3 ในคนที่เป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง (atopic dermatitis, AD) โดยการทดสอบด้วยวิธี immunostaining พบการแสดงออกของอะควาพอริน-3 ปริมาณมากที่เยื่อหุ้มเซลล์เคราติโนไซต์ของคนที่เป็นโรคมกกว่าคนสุขภาพดีรวมทั้งผลการตัดชิ้นเนื้อมาทดสอบด้วยวิธี reverse transcription-PCR ก็พบว่ามีแสดงออกของยีนในผู้ป่วยที่มีรอยโรค AD มากกว่าผู้ป่วยที่สุขภาพดี จากนั้นทำการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (normal human keratinocyte, NHKs) ด้วยการถ่ายโอน plasmid พบว่าอะควาพอริน-3 เพิ่มขึ้นมากกว่าเวกเตอร์เปล่าแสดงว่าการแสดงออกของอะควาพอริน-3 ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเคราติโนไซต์ นอกจากนี้ทำการทดสอบในหนูที่ทำให้เกิดโรค AD สายพันธุ์ wild-type mice และ AQP3-deficient mice พบการแสดงของอะควาพอริน-3 อย่างมากในชั้น epidermis ของหนู wild-type mice ตรงกันข้ามในหนู AQP3-deficient mice พบว่ามีแสดงออกของอะควาพอริน-3 ลดลงและส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เคราติโนไซต์ที่ลดลง จากข้อมูลการศึกษาแสดงถึงการแสดงออกของอะควาพอริน-3 ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์เคราติโนไซต์อย่างมากที่ผิวหนังชั้นนอกในคนที่เป็นโรค AD การควบคุมการแสดงออกของอะควาพอริน-3 อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยในการพัฒนายาสำหรับใช้รักษาคนที่เป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง (K. Nakahigashi et al., 2011)

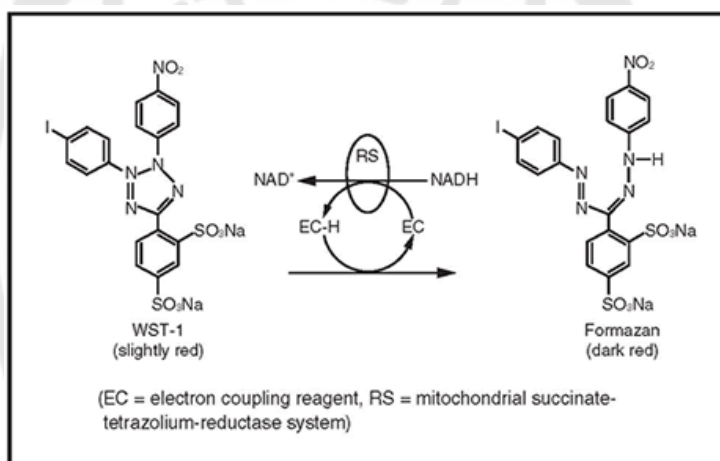
การศึกษาผลของอะควาพอริน-3 ต่อการเคลื่อนที่และการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังระหว่างการรักษาบาดแผลโดยทำการทดลองในหนูสองสายพันธุ์คือ wild-type mice และ AQP-3 null mice โดยทำให้หนูเกิดบาดแผลที่หลัง ติดตามผลในระหว่างการรักษาบาดแผลพบว่าหนูสายพันธุ์ AQP-3 null mice การหายของแผลช้ากว่าและบริเวณขอบแผลปิดช้ากว่าสอดคล้องกับการทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ ด้วยวิธี BrdU พบว่ามีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นน้อยกว่าสายพันธุ์ wild-type mice และสอดคล้องกับการทดสอบในเซลล์จำลองที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของอะควาพอริน-3 โดยวิธี siRNA พบว่าการแสดงออกของอะควาพอริน-3 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของน้ำและกลีเซอรอลลดลง อีกทั้งยังส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ข้างซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในระหว่างการรักษาบาดแผล (Mariko Hara-Chikuma & A. S. Verkman, 2008)



## 2.7 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี WST-1 assay

WST-1 (water soluble tetrasodium salt, 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene sulfonate) เป็นการวัดการเพิ่มจำนวนและความมีชีวิตรอดของเซลล์อาศัยการเปลี่ยนแปลงสี (colorimetric method) หลักการคือเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการทำงานของ ไมโตคอนเดรีย โดย WST-1 ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenases) ในไมโตคอนเดรียจากสีแดงของ WST-1 เป็นสีเหลืองส้มของฟอร์มazan (ภาพประกอบ 7) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

กระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์เกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) ร่วมกับการแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) เพื่อทดแทนเซลล์เก่าหรือเซลล์ที่เสียหายและรักษาสภาวะสมดุลของร่างกายซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิต

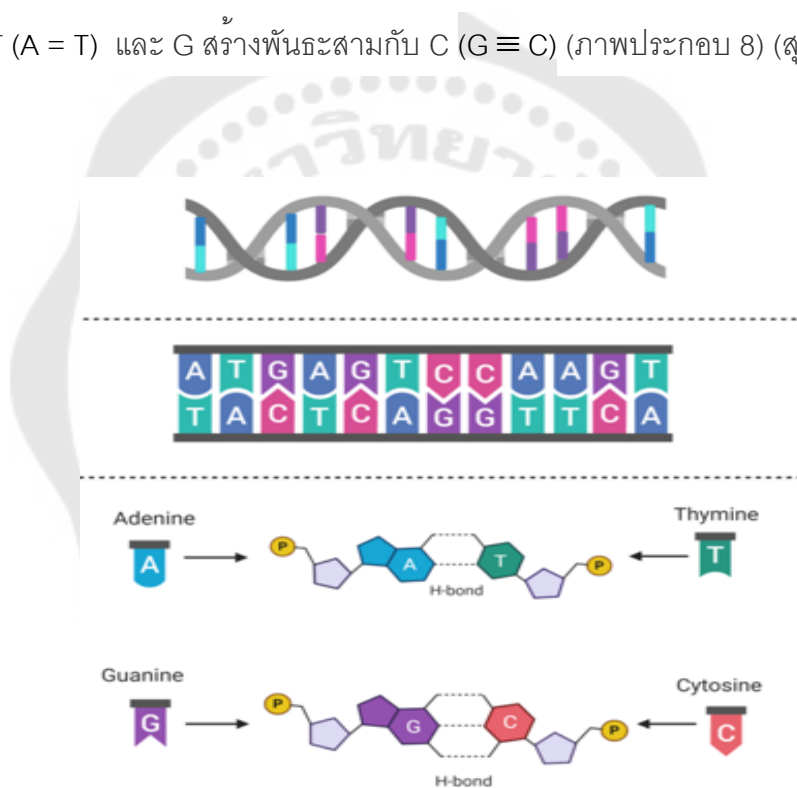


ภาพประกอบ 7 การเกิดปฏิกิริยาของ WST-1 ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสเปลี่ยนเป็นฟอร์มazan

ที่มา: <https://www.takarabio.com/products/gene-function/cell-biology-assays/cell-biology-reagents/wst-1-cell-proliferation> (Online)

## 2.8 การแสดงออกของยีน

ยีนคือส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) เป็นพอลิเมอร์สายยาวของ นิวคลีโอไทด์ทำหน้าที่เก็บข้อมูลและกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม โครงสร้างของดีเอ็นเอ ประกอบด้วย ไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) 2 ประเภทคือ เบสพิวรีน (purine base) ได้แก่ อะดีนีน (adenine; A) กัวนีน (guanine; G) และเบสไพริมิดีน (pyrimidine base) ได้แก่ ไซโทซีน (cytosine; C) ไทมีน (thymine; T) น้ำตาลเพนโตสชนิดดีออกซีไรโบส (deoxyribose) และ หมู่ฟอสเฟต (phosphate group) พันกันเป็นเกลียวคู่ (double-stranded helix) โดยมีลำดับเบสคู่สม (complementary bases) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) โดย A สร้างพันธะคู่ T (A = T) และ G สร้างพันธะสามกับ C ( $G \equiv C$ ) (ภาพประกอบ 8) (สุภาวดี ง้อเหรียญ, 2563)



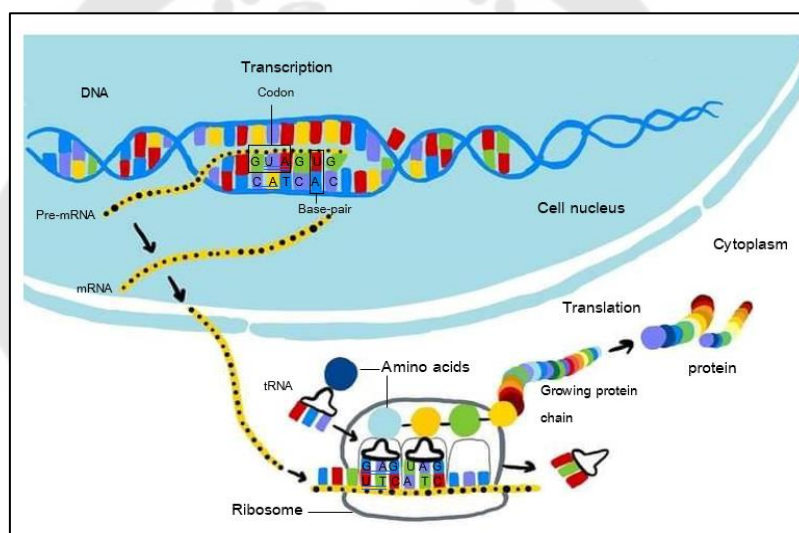
ภาพประกอบ 8 นิวคลีโอไทด์สายคู่ (double-stranded helix)

ที่มา: <https://snl.no/adenin> (Online)

การแสดงออกของยีนหรือกระบวนการสร้างโปรตีนในเซลล์ยูคาริโอตเกิดเมื่อเซลล์ต้องการสร้างโปรตีนจะเกิดกระบวนการถอดรหัสภายในนิวเคลียส และการแปลรหัสที่ไซโตพลาสซึม กระบวนการทำงานประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ การถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation)

1. การถอดรหัส (transcription) ดีเอ็นเอสายคู่จะถูกแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวด้วย เอนไซม์ RNA polymerase เกิดการสร้างเป็นเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) บนสายของ mRNA จะมีส่วนของ เอ็กซอน (exon) ที่ใช้เป็นรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีนจะถูกส่งออกจากนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสซึมเพื่อถูกแปลรหัส

2. การแปลรหัส (translation) สายเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) จะถูกแปลรหัสโดย transfer RNA (tRNA) นิวคลีโอไทด์สามตัวที่เรียงต่อกันจะได้เป็นกรดอะมิโน 1 ชนิด โดยจะเริ่มแปลรหัสที่ AUG ได้เป็นกรดอะมิโน methionine และแปลรหัสไปเรื่อยๆ จนกระทั่งการแปลรหัสจะสิ้นสุดลงเกิดเป็นกรดอะมิโนสายยาวที่มาเรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์เรียกว่า โปรตีน (ภาพประกอบ 9) (วรพรรณ สิทธิถาวร, 2564)



ภาพประกอบ 9 การแสดงออกของยีนหรือกระบวนการสร้างโปรตีนในยูคาริโอตเซลล์

ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/transcription> (Online)

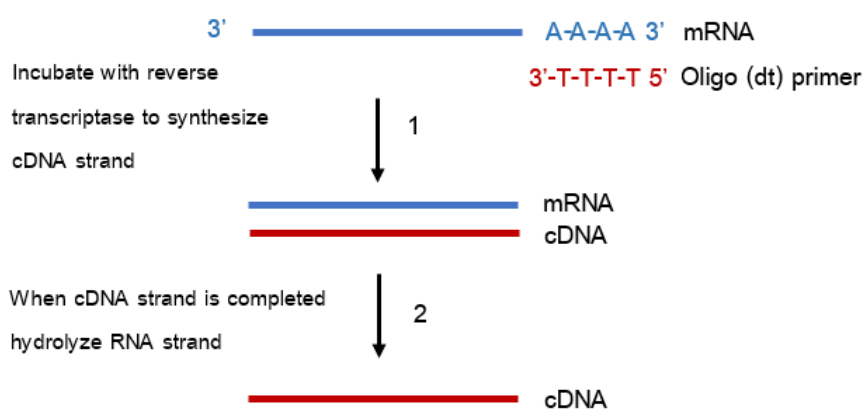
## 2.9 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน

เป็นการศึกษาในขั้นตอนของการคัดลอกการถอดรหัส (transcription) ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์ mRNA โดยลำดับเบสบน DNA จะถูกถอดออกมาเป็นลำดับเบสบน mRNA ปัจจุบันวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน แต่เทคนิคนี้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ mRNA ได้โดยตรงต้องทำการ



เปลี่ยน mRNA ให้เป็น complementary DNA (cDNA) แล้วจึงนำ cDNA ที่ได้ไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในการทำ PCR การตรวจวัด mRNA ด้วยวิธีนี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ 1. reverse-transcription (RT) และ 2. polymerase chain reaction (PCR)

1. reverse-transcription (RT) คือกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (cDNA) จากเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ปลายด้าน 3' ของ mRNA จะมีลักษณะเป็น poly A tail เมื่อเริ่มทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่เป็น oligo dT จะเข้าไปจับบริเวณ poly A tail ได้เป็น cDNA โดยใช้ reverse transcriptase จากนั้น mRNA แม่แบบที่จับอยู่กับ cDNA จะถูกย่อยสลายด้วย RNase H ได้เป็น cDNA สายเดี่ยว จึงจะสามารถนำดีเอ็นเอสายเดี่ยวไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 10 กระบวนการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://theory.labster.com/reverse-transcriptase-pcr/> (Online)

2. polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยอาศัยหลักการเลียนแบบ DNA replication ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ได้เป็นจำนวนมาก ส่วนประกอบหลักในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dNTPs) : อะดีนีน กัวนีน ไสโทซีน และ ไทมีน เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เอส (DNA polymerase) และ ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งไพรเมอร์มีความสำคัญมากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะสำเร็จหรือไม่ขึ้นกับการออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับดีเอ็นเอต้นแบบมากที่สุด โดยมี 3 ขั้นตอนหลักดังนี้

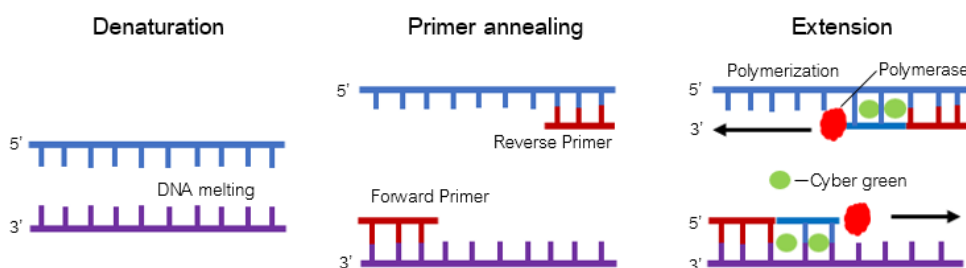
1. ดีเอ็นเอเดรนแบบคลายเกลียว (denaturation)
 

เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเดรนแบบจากเกลียวคู่ใหญ่กลายเป็นสายเดี่ยว 2 สาย โดยใช้อุณหภูมิในช่วง  $94-96^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1-2 นาที
2. ไพรมเมอร์จับกับดีเอ็นเอเดรนแบบ (annealing)
 

เป็นขั้นตอนการของไพรมเมอร์เข้าไปจับกับเบสคู่สมจำเพาะโดยใช้อุณหภูมิในช่วง  $40-60^{\circ}\text{C}$  (พิจารณาจากค่า  $T_m$ ) เป็นเวลา 30 วินาที -1 นาที
3. สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (extension)
 

เป็นขั้นตอนการยัดสายดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส โดยใช้อุณหภูมิในช่วง  $72^{\circ}\text{C}$  ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Taq DNA polymerase เป็นเวลา 1-2 นาที

เมื่อปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอนเสร็จสิ้นลงนับเป็น 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นจำนวน  $2n$  และปฏิกิริยารอบใหม่จะเริ่มขึ้นและดำเนินไป 20-30 รอบ (ภาพประกอบ 11)

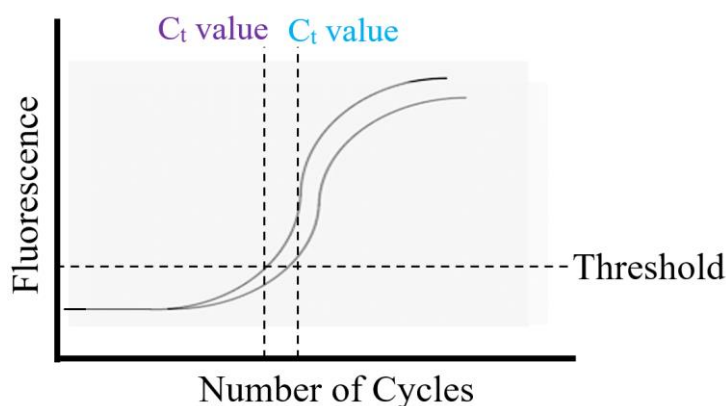


ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR

ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://www.stratech.co.uk/aat-bioquest/polymerase-chain-reaction-pcr/> (Online)

real-time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR)

เทคนิค PCR ได้ถูกพัฒนาเป็น real-time PCR เพื่อใช้ในการตรวจติดตามดูปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยาตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา โดยในปฏิกิริยาต้องใช้สารเรืองแสง SYBR Green I โดยสารเรืองแสงนี้จะเข้าไปอยู่บริเวณร่อง (minor groove) ของสายดีเอ็นเอ และเปล่งแสงออกมาปริมาณแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ (exponential amplification) ลักษณะกราฟรูปตัว S (sigmoid curve) (ภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 กราฟวิเคราะห์การแสดงผลของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR

ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://www.medmastery.com/guide/covid-19-clinical-guide/how-rt-pcr-used-test-covid-19> (Online)

สารเรืองแสงที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR

เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ SYBR Green I ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้ (DNA binding fluorescent dyes) จะจับกับบริเวณร่องของดีเอ็นเอสายคู่แบบไม่จำเพาะแล้วเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเปล่งแสงออกมาสัญญาณของสารเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น

## 2.10 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายเทียบกับยีนมาตรฐาน housekeeping gene ด้วย RT real-time PCR

real-time PCR เป็นเครื่องมือที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพในการวัดปริมาณ mRNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อประเภทต่างๆ ในการวัดการแสดงออกของยีนเป้าหมายมีความจำเป็นต้องใช้ยีนมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อลดความแปรปรวนที่เกิดจากคุณภาพและปริมาณของ mRNA จากวิธีการสกัด ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA การปนเปื้อนระหว่างการจัดการตัวอย่าง และความแตกต่างของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ ยีนมาตรฐาน (housekeeping gene) คือยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาเพื่อทำหน้าที่สร้างโปรตีนให้เซลล์ใช้ในการดำรงชีวิต และมีการแสดงออกอย่างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไม่ว่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อนั้นจะอยู่ในสภาวะใดก็ตาม ยีนมาตรฐานที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulin, phosphoglycerate kinase (PGK), ubiquitin (UBQ), ribosomal protein 19 (RPL-19) และ 18S ribosomal RNA (18S rRNA) เป็นต้น (Reboucas et al., 2013)

การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนเป้าหมายโดยการเปรียบเทียบกับยีนมาตรฐานเรียกว่า การวัดปริมาณแบบสัมพัทธ์ (relative expression) โดยการเปรียบเทียบค่า cycle threshold (Ct) ของยีนเป้าหมายกับยีนมาตรฐาน โดยค่า Ct หมายถึงจำนวนรอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาซึ่งจะแปรผกผันกับปริมาณของยีน

$$\Delta Ct (\text{treated}) = \text{treated gene of interest} - \text{treated housekeeping gene} \quad (1)$$

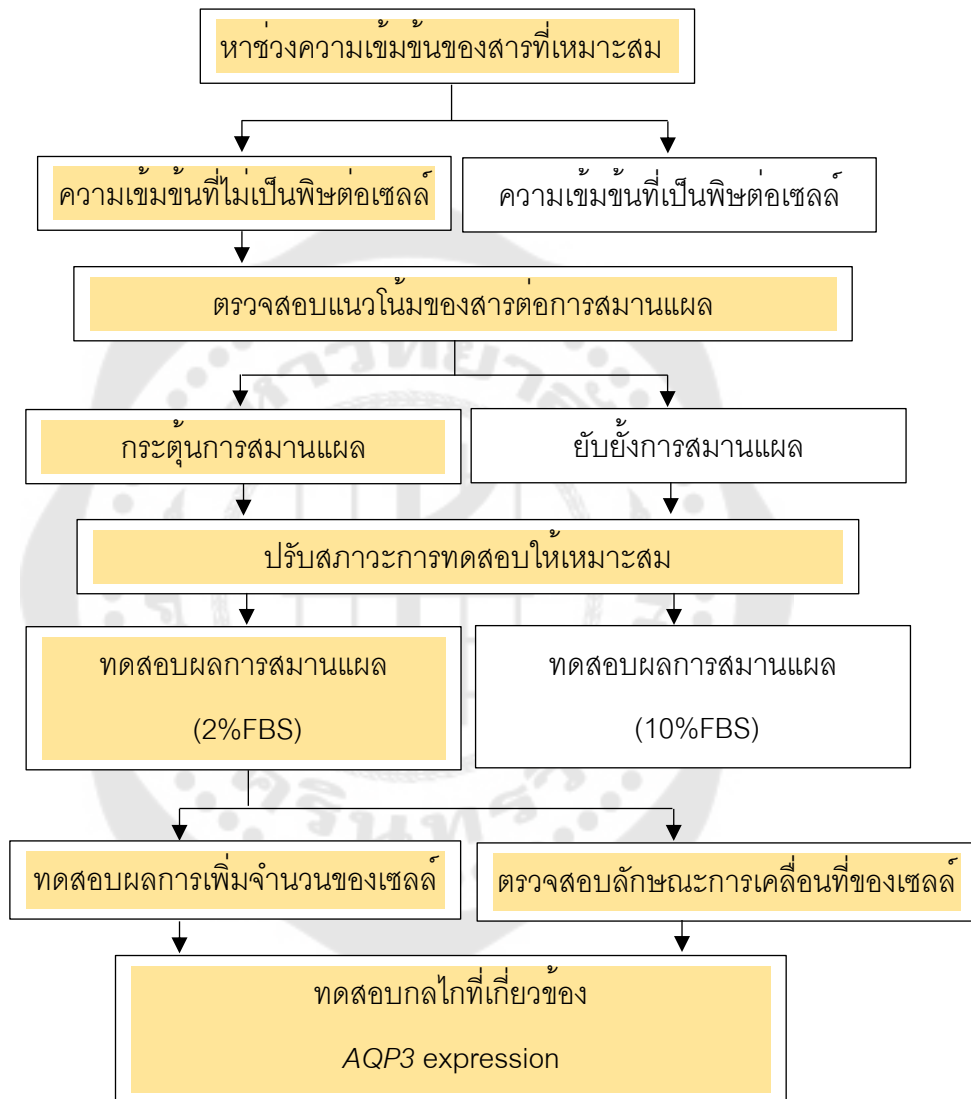
$$\Delta Ct (\text{control}) = \text{control gene of interest} - \text{control housekeeping gene} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated}) - \Delta Ct (\text{control}) \quad (3)$$

การคำนวณปริมาณการแสดงออกของยีน แสดงออกมาเป็นจำนวนเท่า (fold change)  $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$  ตามวิธี Livak & Schmittgen จากสมการที่ 1, 2 และ 3 โดยที่  $\Delta Ct (\text{treated})$  หมายถึงระดับการแสดงออกของยีนหรือปริมาณ mRNA ในเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ ซึ่งได้หักลบกับปริมาณ mRNA ของ housekeeping gene และ  $\Delta Ct (\text{control})$  หมายถึงระดับการแสดงออกของยีนหรือปริมาณ mRNA ในเซลล์ที่เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับสารทดสอบ และได้หักลบกับปริมาณ mRNA ของ housekeeping gene

### บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองมีลำดับขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยตามแผนผัง ดังนี้



ภาพประกอบ 13 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย เน้นการดำเนินงานวิจัยในส่วนที่ไฮไลต์

### 3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เคราตินโนไซต์ (Human keratinocyte cell line HaCaT) (CLS lines service number 300493, Germany)

### 3.2 สารทดสอบ

น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene, purity 97%, Sigma-Aldrich) และสารทรานแซคริโอฟิลลีน (trans-caryophyllene, purity 98.5%, Sigma-Aldrich) โดยเตรียม stock solution ความเข้มข้น 50 mg/mL ใน 100% DMSO

### 3.3 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี

- อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีสำหรับการศึกษาฤทธิ์ในเซลล์

Name	Company
Culture insert 4 wells	Ibidi, Germany
Centrifuge tube (15, 50 mL)	Biologix Research, USA
Microcentrifuge tubes (1.5 mL)	Kirgen, China
Cell Culture flask (75 cm <sup>2</sup> )	Corning, USA
Micropipette (10, 20, 200, 1000 µL)	Rainin, USA
Pipette tips (10, 100, 1000 µL)	Corning, USA
Disposable Serological Pipette (3, 5, 10 mL)	Thermo Fisher Scientific, USA
Ultra pipet controller	Corning, USA
Hemocytometer	Boeco, Germany
96-well plate	Corning, USA
24-well plate	Corning, USA
Cryovial	SPL life sciences, USA
Cell freezing container	Corning, USA
CO <sub>2</sub> incubator	New Brunswick, England
Refrigerate Centrifuge	CE, Germany
Inverted Microscope	Nikon eclipse, Japan
Microplate reader	SpectraMax M3, USA

Name	Company
Water bath	Julabo, Germany
Vortex Mixer	Witeg, Germany
Refrigerator	Mitsubishi electric inverter
Freezer (-80 °C)	Arctiko, USA
Analytical Balances	Mettler Toledo, USA
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Pan Biotech, Germany
Fetal bovine serum (FBS)	Pan Biotech, Germany
Phosphate buffer saline (PBS)	Merck Millipore, USA
0.75% Penicillin-Streptomycin	PAN Biotech, Germany
0.05% Trypsin-EDTA	PAN Biotech, Germany
WST-1 reagent	Merck Millipore, USA
Trypan blue	PAN Biotech, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Corning, USA
Cryoprotective medium	Lonza, USA
Buffer RLT Lysis buffer	Qiagen, Germany

- อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีสำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

Name	Company
PCR tube	Biorad, USA
ECOPLATE 48	Cole-Parmer Lid.,UK
Sample loading dock	PCR MAX, UK
Gel electrophoresis	Mupid-exu, Gibthai
ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare, UK
PCR thermal cycler	Biometra, USA
Real time PCR machine	PCR MAX ECO48, UK
Duran bottle 500 mL	Duran, Germany
Microwave	Electrolux, Thailand



Name	Company
96% Ethanol	Merck Millipore, USA
RNase -free water	Geneaid, Taiwan
RNeasy Mini kit	Qiagen, Germany
Agarose powder	GeneMate, USA
1x TAE buffer	Amresco, USA
5x glycerol gel loading	Amresco, USA
SYBR <sup>®</sup> Safe DNA gel stain	Invitrogen, USA
100bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
Quan-iT <sup>™</sup> RNA Assay kit	Invitrogen, USA
5x qScript <sup>®</sup> cDNA SuperMix	Quantabio, Germany
2x PerfeCTa SYBR Green FastMix	Invitrogen, USA
AQP3: forward primer and reverse primer	Macrogen, Thailand
GAPDH: forward primer and reverse primer	Macrogen, Thailand

### 3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษานี้เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT (CLS Cell Lines Service, 300493) เลี้ยงเซลล์ใน Culture flask ขนาด 75 cm<sup>2</sup> ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS) และ 0.75% Penicillin-Streptomycin ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C โดยรายละเอียดและวิธีการต่างๆ มีดังนี้

#### 3.4.1 การเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง

วัตถุประสงค์ : เพื่อละลายเซลล์หลอดแช่แข็งเพื่อนำมาเพาะเลี้ยง มีขั้นตอนดังนี้

1. นำหลอดแช่แข็งของเซลล์เพาะเลี้ยงแช่ใน water bath เพื่อทำการละลายเกล็ดน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 37°C อย่างรวดเร็วจากนั้นทำความสะอาด หลอดเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย 70% ethanol

2. นำ cell suspension จากหลอดแช่แข็งของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ละลายแล้วใส่ลงใน centrifuge tube ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 4 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที นำส่วน supernatant ออก ใช้นิ้วเคาะ vial เพื่อให้เซลล์กระจายตัว

3. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 mL ลงใน centrifuge tube และ ปิดฝิตั้งขึ้นลง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์

4. เตรียมภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 10 mL
5. นำ cell suspension จาก centrifuge tube ใส่ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C
6. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 48 ชั่วโมง
7. เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตและมีการเพิ่มจำนวนจนมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ในช่วง 70-80% ของพื้นที่ภาชนะต้องทำการขยายพื้นที่เซลล์ (cell passage/subculture) เพื่อให้เซลล์หนาแน่นจนเกินไปซึ่งจะทำให้เซลล์ตายได้หรือนำเซลล์ไปทำการทดสอบต่อไป

#### 3.4.2 การเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนภาชนะเลี้ยงเซลล์

วัตถุประสงค์ : เพื่อขยายพื้นที่ในการเลี้ยงเซลล์และเพื่อการเก็บเซลล์ที่เลี้ยงไว้ นำไปใช้ในการทดสอบ ทำได้โดยการ trypsinization มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์มาส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ โดยเซลล์ HaCaT จะมีลักษณะการเจริญเติบโตแบบชั้นเดียว (monolayer) ประเภทเกาะติด (adherent) กับภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์
2. ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และทิ้งอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าในภาชนะที่มีน้ำยาฆ่าเชื้อ
3. ทำการล้างเซลล์โดยเติม Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 5 mL แล้วดูดออก
4. ทำการ trypsinization คือการทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะที่เซลล์เกาะติดอยู่ เนื่องจากเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) จะมีลักษณะการเจริญเติบโตแบบชั้นเดียว (monolayer) ประเภทเกาะติด (adherent) กับภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ โดยการเติม 0.05% Trypsin-EDTA ลงไป 3 mL ให้เคลือบบนผิวหน้าเซลล์จนทั่ว
5. นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7-8 นาทีแล้วส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตการร่อนหลุดของเซลล์จากภาชนะเลี้ยงเซลล์ (อาจทำร่วมกับการเคาะด้วยอุ้งมือเพื่อช่วยให้เซลล์หลุดเร็วขึ้น) โดยเซลล์ที่หลุดออกมาจะมีลักษณะกลม
6. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ 4 mL เพื่อหยุดกระบวนการ trypsinization แล้วทำการตีเซลล์ให้กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้การปิเปตดูดขึ้นลง 2-3 ครั้ง

7. บีเปิดเซลล์ใส่ centrifuge tube ขนาด 15 mL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 3 นาที

8. เทส่วน supernatant ทิ้งไป แล้วใช้นิวเคสเซลล์ที่ตกตะกอนใน centrifuge tube เพื่อให้เซลล์กระจายตัว

9. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 mL ใน centrifuge tube ใช้บีเปิดดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายตัวในลักษณะเซลล์แขวนลอยเป็น cell suspension

10. นำ cell suspension ที่ได้ไปนับจำนวนด้วยสไลด์สำหรับนับเซลล์ (hemocytometer) เพื่อนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ในหัวข้อ 3.4.3)

11. นำเซลล์จำนวน  $1.5 \times 10^5$  cells/mL ใส่ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 10 mL บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C

### 3.4.3 การนับเซลล์ด้วยสไลด์สำหรับนับเซลล์

วัตถุประสงค์ : เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ มีขั้นตอนดังนี้

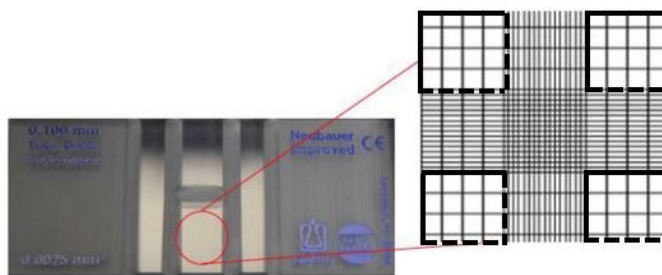
1. ทำความสะอาดสไลด์สำหรับนับเซลล์ (hemocytometer) และ coverslip ด้วย 70% ethanol

2. เตรียม trypan blue ใน 96-well plate จำนวน 2 หลุม หลุมละ 90  $\mu$ L

3. บีเปิดเซลล์แขวนลอย ที่ได้หลังจากกระบวนการ trypsinization แล้ว จำนวน 10  $\mu$ L ใส่ลงใน trypan blue ปริมาตร 90  $\mu$ L ที่เตรียมไว้ (เจือจาง 10 เท่า) แล้ว บีเปิดขึ้นลงให้เซลล์กระจายตัว

4. บีเปิดเซลล์จากเซลล์ที่กระจายตัวใน trypan blue ปริมาตร 10  $\mu$ L ลงใน hemocytometer แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. ทำการนับเซลล์ จำนวน 4 ช่อง ในแต่ละช่องให้นับเซลล์ในบริเวณด้านในของเส้น และเซลล์ที่ทับเส้นขอบจำนวน 2 ด้าน (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 14 Hemocytometer

ที่มา: Vembadi et al. (2019).

นำเซลล์ที่นับได้ทั้ง 4 ช่องมาหาค่าเฉลี่ย (cells/square) และคำนวณดังสูตรต่อไปนี้ (Lindee, 2007; Liu et al., 2011; Thibodeaux et al., 1992)

- ความหนาแน่นของเซลล์ที่เตรียมทั้งหมด (cells/mL) = ค่าเฉลี่ยของ cells/square  $\times 10^4$  x dilution factor ของการเจือจางด้วย trypan blue

หมายเหตุ : dilution factor จากการเตรียมด้วยวิธีนี้มีค่า 10

- จำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cells) = ความหนาแน่นของเซลล์ (cells/mL) x ปริมาตรของเซลล์ทั้งหมด

หมายเหตุ : dilution factor จากการเตรียมด้วยวิธีนี้มีค่า 10

ปริมาตรของเซลล์ทั้งหมด คือ 3 มิลลิลิตร (ในหัวข้อ 3.4.2 ข้อ 9)

6. คำนวณปริมาณที่ต้องการเพื่อการเพาะเลี้ยงหรือเพื่อการทดสอบต่อไป

### 3.5 วิธีการเก็บเซลล์

วัตถุประสงค์ : เพื่อเก็บรักษาเซลล์โดยการแช่แข็ง

1. ทำเหมือนการ trypsinization ในหัวข้อ 3.4.2 ข้อ 1-8
2. เติม cryoprotective medium 5 mL ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายตัวใน

ลักษณะเซลล์แขวนลอย

3. ปิเปตต์เซลล์ความหนาแน่น  $1.5 \times 10^5$  cells/mL ใส่ใน cryovial จำนวน 5 หลอด ปริมาตรหลอดละ 1mL และ เก็บใน Cell freezing container Corning® แช่ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  1 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนไปแช่ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$

### 3.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ต่อความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ด้วย WST-1 assay

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาช่วงความเข้มข้นของสารต่อความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) มีขั้นตอน ดังนี้

1. ทำการเลี้ยงเซลล์และเตรียมเซลล์สำหรับใช้ทดสอบตามข้อ 3.4
2. ใส่เซลล์ลงใน 96-well plate จำนวน  $1.5 \times 10^4$  cells/well นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี  $5\% \text{CO}_2$  อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ใส่สารทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และสารทรานแคริโอฟิลลีน และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุม (Control DMSO) ใส่ลงใน 96 well plate โดยให้ได้ปริมาตรสุดท้ายของหลุมที่มีทั้งเซลล์และสารเท่ากับ  $100 \mu\text{L}/\text{well}$  (กำหนดให้ความเข้มข้นของ %DMSO ทุกหลุมมีค่าเท่ากัน) นำ 96-well plate ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี  $5\% \text{CO}_2$  อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง
4. ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง นำ 96-well plate ออกมาเติม WST-1 reagent จำนวนหลุมละ  $10 \mu\text{L}$  จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี  $5\% \text{CO}_2$  อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์
6. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และสารทรานแคริโอฟิลลีน ต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control DMSO) และคำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการทดสอบละ 3 ซ้ำ ( $n = 3$ ) ดังสมการ (ราชพร, 2558)

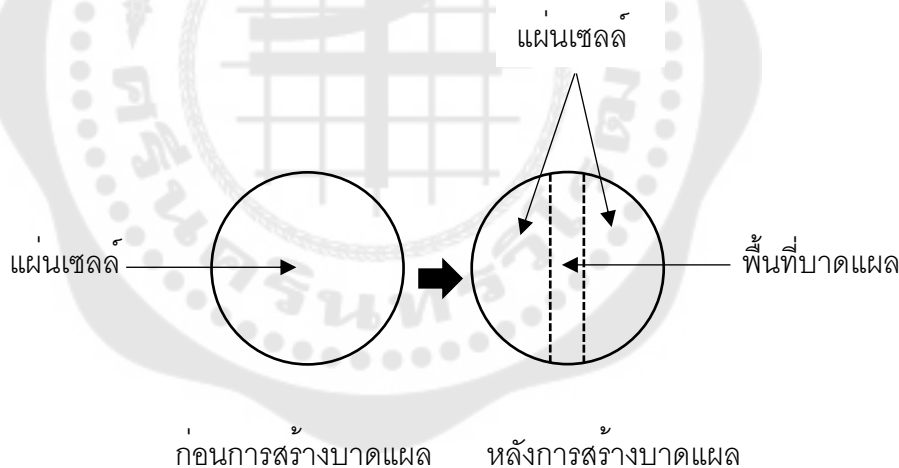
$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{OD } 450 \text{ นาโนเมตร ของกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ}}{\text{OD } 450 \text{ นาโนเมตร ของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

### 3.7 การศึกษาฤทธิ์การสมานแผลด้วยวิธี wound healing assay

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากไอบะมะตูม, สารลิโมนีน และสารทรานแคริโอฟิลลีน ที่มีผลต่อการปิดของแผลในระดับเซลล์ โดยศึกษาอัตราการปิดของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผล (wound area) ด้วยวิธี wound healing assay โดยการศึกษานี้ใช้ 2 วิธีคือ scratch และ culture-Insert 4 well มีขั้นตอนดังนี้

#### 3.7.1 วิธี scratch

1. ทำการเลี้ยงเซลล์และเตรียมเซลล์สำหรับใช้ทดสอบตามข้อ 3.4
2. ใส่เซลล์จำนวน  $2.5 \times 10^5$  cells/well ปริมาตร 500  $\mu$ L ลงใน 24-well plate แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง
3. ทำการสร้างทางพื้นที่ของบาดแผล (wound area) ระหว่างแผ่นเซลล์ (monolayer) 2 ข้าง เพื่อศึกษาการเคลื่อนที่หรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์เข้ามาสู่ช่องว่างนั้น โดยใช้ micropipette tip 200  $\mu$ L ชีดตรงกลางของแต่ละหลุม (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 แสดงแผ่นเซลล์และพื้นที่บาดแผล

4. ทำการล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และดูดออกจนหมด
5. ใส่สารทดสอบตามความเข้มข้นที่กำหนด จำนวน 600  $\mu$ L/well ลงใน 24-well plate ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากไอบะมะตูม ที่ความเข้มข้น 50, 25 และ 5  $\mu$ g/mL, สารลิโมนีน ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.1 และ 0.02  $\mu$ g/mL และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ที่ความเข้มข้น 8, 4 และ 0.8

µg/mL โดยให้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุม (Control DMSO) (กำหนดให้ ความเข้มข้นของ %DMSO ทุกหลุมของแต่ละสารมีค่าเท่ากัน)

6. บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C และทำการถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ของบาดแผล (wound area) ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมงด้วยกล้อง Nikon eclipse

7. วัดพื้นที่ของบาดแผล (wound area) ด้วยโปรแกรม Nikon NIS Element Imaging

8. คำนวณหาค่าร้อยละการปิดของบาดแผล (%Wound closure) (Grada et al., 2017)

$$\text{ร้อยละการปิดของบาดแผล} = \frac{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก} - \text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันถัดไป}}{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก}} \times 100$$

### 3.7.2 วิธี Culture-Insert 4 well

1. ทำการเลี้ยงเซลล์และเตรียมเซลล์สำหรับใช้ทดสอบเหมือนในข้อ 3.4  
 2. ใส่เซลล์จำนวน  $2 \times 10^5$  cells/well ปริมาตร 100 µL ลงใน Culture-Insert 4 well  
 3. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบของ Culture-Insert ปริมาตร 700 µL แล้วนำไป บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์เจริญเติบโต (confluent layer)

4. ใช้ sterile tweezers ดึงที่มุม Culture-Insert ออกเบาๆ จะเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์

5. ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดหรือเศษเซลล์ออกด้วย PBS 1mL แล้วดูดออกจนหมด

6. ใส่สารทดสอบปริมาตร 1.4 mL ดังนี้ น้ำมันหอมระเหยจากไอบะตุมที่ความเข้มข้น 50, 25 และ 5 µg/mL, สารลิโมนีน ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.1 และ 0.02 µg/mL และ สารทรานแคโรฟิลลิน ที่ความเข้มข้น 8, 4 และ 0.8 µg/mL (กำหนดให้ ความเข้มข้นของ %DMSO ทุกหลุมของแต่ละสารมีค่าเท่ากัน)

7. บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37°C และทำการถ่ายภาพพื้นที่ของบาดแผล (wound area) ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมงด้วยกล้อง Nikon eclipse

8. วัดพื้นที่ (wound area) ด้วยโปรแกรม Nikon NIS Element Imaging



9. ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่าร้อยละการปิดของบาดแผล (%Wound closure) ตามสมการในข้อ 3.7.1 ข้อ 8

**3.8 การศึกษาการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์ของมนุษย์**  
หลังจากการทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ที่ความเข้มข้น 5 µg/mL และสาร  
สารทรานแคริโอฟิลลีน ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาการระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในกลไกการ  
หายของบาดแผลในเซลล์เคราติโนไซต์ของมนุษย์

### 3.8.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์เคราติโนไซต์สำหรับนำมาสกัด RNA

เก็บตัวอย่างเซลล์ HaCaT ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์การสมานแผลโดยการล้างด้วย  
PBS 1 mL และทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม buffer RLT ในชุดสกัด RNeasy Mini kit ใช้ปิเปตต์  
ดูดขึ้นลง 2-3 ครั้ง แล้ว ปิเปตต์ลง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL เนื่องจากปริมาณเซลล์  
น้อยกว่า  $5 \times 10^6$  cell/mL จึงเก็บเซลล์ใน buffer RLT 350 µL ตามคำแนะนำของชุดสกัด และเก็บ  
เซลล์ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้โดยเก็บเซลล์ดังนี้

1. เซลล์ที่ทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้น 5 µg/mL (treated bael leaf oil)
2. เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (control bael leaf oil)
3. เซลล์ที่ทดสอบด้วยสารทรานแคริโอฟิลลีน ที่ความเข้มข้น 4 µg/mL (treated trans-caryophyllene)
4. เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (control trans-caryophyllene)

### 3.8.2 การสกัด RNA ด้วย RNeasy spin column

สกัด RNA จากเซลล์ ด้วย RNeasy Mini kit กระบวนการสกัดมี 4 ขั้นตอนดังนี้  
(ภาพประกอบ 16)

- Lysate, homogenization and add ethanol

1. นำเซลล์มา vortex เพื่อให้เซลล์แตก เติม 70% ethanol ปริมาตรเท่ากับ buffer RLT ผสมให้เข้ากันโดยใช้การปิเปตต์ขึ้นลง

- Bind total RNA (RNeasy spin column)

1. นำตัวอย่างที่ผสมเข้ากันแล้ว ปิเปตต์ลงใน RNeasy spin column ขนาด 2 ml ปิดฝา  
นำไป centrifuge 1 นาที ที่ 10000 rpm ทั้งสารละลายที่ถูกชะออกมา

- Wash

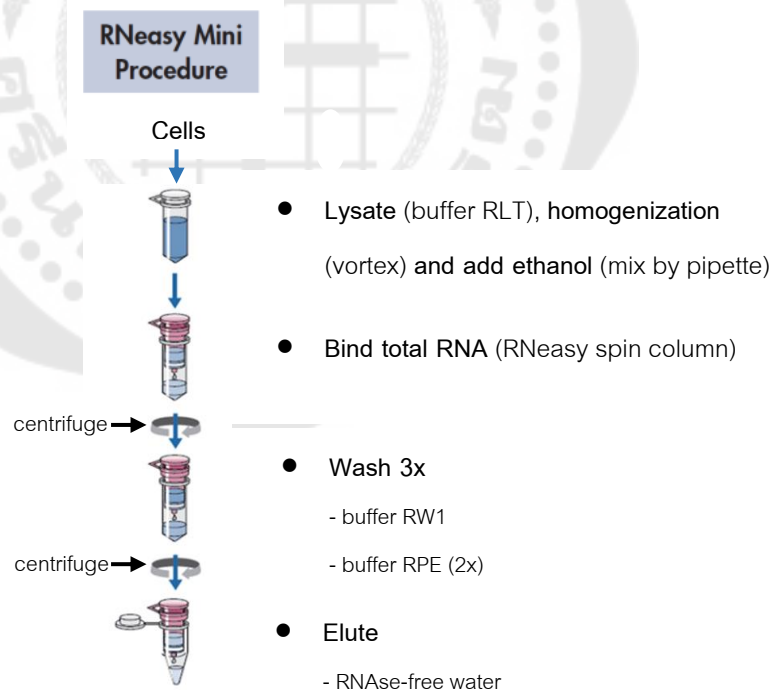
1. เติม 700  $\mu$ l buffer RW1 ลงใน RNeasy spin column ปิดฝานำไป centrifuge 1 นาที ที่ 10000 rpm ที่ซึ่งสารละลายที่ถูกชะออกมา

2. เติม 500  $\mu$ l buffer RPE ลงใน RNeasy spin column ปิดฝานำไป centrifuge 1 นาที ที่ 10000 rpm ที่ซึ่งสารละลายที่ถูกชะออกมา

3. เติม 500  $\mu$ l buffer RPE ลงใน RNeasy spin column ปิดฝานำไป centrifuge 1 นาที ที่ 10000 rpm ที่ซึ่งสารละลายที่ถูกชะออกมานั้น centrifuge ต่ออีก 1 นาที เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มี ethanol เหลือ

- Elute

1. นำ RNeasy spin column วางใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL เติม RNase-free water 30-50  $\mu$ L นำไป centrifuge 1 นาที ที่ 10000 rpm เพื่อให้ RNA ที่บริสุทธิ์ถูกชะออกมา เก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จึงนำไปตรวจสอบคุณภาพต่อไป



ภาพประกอบ 16 ขั้นตอนการสกัด RNA ด้วย RNeasy spin column

ที่มา : ดัดแปลงจาก RNeasy Mini kit Handbook protocol, QIAGEN

### 3.8.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพ RNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1. เตรียม 1.2% agarose gel ซึ่งน้ำหนัก agarose powder 0.18 กรัม ลงในขวด Duran ขนาด 500 mL
2. เติม 1xTAE 15 mL ปิดปากขวดด้วย parafilm เจาะรูเล็กน้อย นำไปต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟจน agarose powder ละลายหมดเป็นสารละลายใส ต้มต่ออีก 2 ครั้ง พักทิ้งไว้ให้พออุ่นๆ เติม SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain 0.1  $\mu$ L แล้วค่อยๆ เทลงภาตวางเจล
3. ประกอบภาตวางเจลวางที่หวีให้หลังล็อก เทเจลลงในภาตวางเจลที่เตรียมไว้ รอประมาณ 20 นาทีจนเจลแข็งตัว แล้วค่อยๆ ดึงที่หวีออกเบาๆ
4. นำแผ่นเจลที่ได้วางลงในเครื่อง gel electrophoresis เติม 1xTAE จนท่วมแผ่นเจล
5. บีเบตต์ 5x glycerol gel loading dye 2  $\mu$ L และบีเบตต์ตัวอย่าง RNA 8  $\mu$ L ลงไปผสมกันโดยการใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงบนแผ่น parafilm
6. โหลดตัวอย่าง RNA ลงในหลุมของเจลโดยจุ่มปลายปิเปตต์ลงในหลุมๆ ละ 8  $\mu$ L และหลุม marker (100bp DNA Ladder) 5  $\mu$ L (ระวังไม่จุ่มไปลึกเกินจะทำให้เจลทะลุได้)
7. ปิดฝาเครื่อง และต่อขั้วไฟฟ้าให้ตรงขั้ว เปิดสวิตช์
8. ตั้งโปรแกรมเครื่องให้กระแสไฟฟ้า 100volt เวลา 20 นาที กดปุ่ม run เพื่อให้ RNA เคลื่อนที่ไปตามกระแสไฟฟ้า
9. นำแผ่นเจลที่ได้ไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ImageQuant LAS 4000 mini ทำการถ่ายภาพและอ่านตำแหน่งของ RNA เปรียบเทียบกับ marker (100bp DNA Ladder)

### 3.8.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ RNA

1. เตรียม reagent ทั้งหมดให้อยู่ที่อุณหภูมิห้อง
2. เตรียมสารละลายโดยการเจือจาง Quan-iT<sup>™</sup> RNA reagent อัตราส่วน 13  $\mu$ L ต่อ Quan-iT<sup>™</sup> RNA buffer 2600  $\mu$ L (1:200)
3. โหลดสารละลายลงใน microplate well หลุมละ 200  $\mu$ L จำนวน 12 หลุม
4. ใส่ 10 $\mu$ L ของ Quan-iT<sup>™</sup> RNA standards ลงในแต่ละหลุม ประกอบด้วย 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ng/ $\mu$ L ผสมให้เข้ากันดี
5. ใส่ตัวอย่าง RNA 2  $\mu$ L ลงในแต่ละหลุม จำนวน 4 หลุม ผสมให้เข้ากันดี
6. นำไปวัดด้วย microplate reader ภายใต้แสง fluorescence (excitation 644 nm/emission 673 nm)
7. สร้าง standard curve เพื่อคำนวณปริมาณ RNA ในตัวอย่าง

### 3.8.5 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

1. ปิเปตต์ส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) โดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 20  $\mu\text{L}$  ลงใน PCR tube (ตาราง 5) นำไปปั่นเหวี่ยงเล็กน้อยให้ส่วนผสมเข้ากัน ทั้งนี้ได้ปรับปริมาตร RNA จากแต่ละตัวอย่าง เพื่อให้ทุกตัวอย่างมี RNA เริ่มต้นเท่าๆ กันคือ ตัวอย่างละประมาณ 2  $\mu\text{g}$

2. นำไปบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตาราง 5 แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

Component	Volume for 20 $\mu\text{L}$ /reaction	Final Concentration
qScript cDNA SuperMix (5x) ( $\text{MgCl}_2$ , dNATPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), recombinant RNase inhibitor protein, qScript reverse transcriptase, random primers, oligo(dT) primer and stabilizers)	4 $\mu\text{L}$	1X
RNA template		
control bael leaf oil	1 $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{g}$
treated bael leaf oil	1.2 $\mu\text{L}$	0.12 $\mu\text{g}$
control transcaryophyllene	1 $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{g}$
treated transcaryophyllene	1 $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{g}$
Add RNase-free water to make total volume	20 $\mu\text{L}$	

### 3.8.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน aquaporin-3

1. โพรเมออร์ที่ใช้ในการศึกษาจากบริษัท Macrogen Asia Pacific PTE. Ltd. (Boury-Jamot M, et al., 2006) โดยมีลำดับเบสดังแสดงใน (ตาราง 6)

2. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน AQP3 ใช้ cDNA ที่เตรียมได้จากข้อ 3.8.5 โดยเป็น cDNA จาก 1. treated bael leaf oil, 2. control bael leaf oil, 3. treated trans-

caryophyllene และ 4. control trans-caryophyllene การทำปฏิกิริยา Real-time PCR ทำ 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ AQP3 และชุดที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ GAPDH

3. ปิเปตต์ส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย Real-time PCR โดยให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 20  $\mu$ L (ตาราง 7) นำไปปั่นเหวี่ยงเล็กน้อยให้ส่วนผสมเข้ากัน

4. นำเข้าเครื่อง Real-time PCR เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ

5. ตั้งสภาวะเครื่องโดยการกำหนดเวลาในการเกิดปฏิกิริยาตาม PerfeCTa SYBR Green FastMix protocol (ตาราง 8)

6. ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละตัวอย่าง จะปรากฏเป็นค่า Ct นำค่า Ct ที่ได้มา คำนวณ จากสูตร Relative expression เท่ากับ  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001)

$$\Delta Ct (\text{treated}) = \text{treated AQP3} - \text{treated GAPDH} \quad (1)$$

$$\Delta Ct (\text{control}) = \text{control AQP3} - \text{control GAPDH} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated}) - \Delta Ct (\text{control}) \quad (3)$$

ระดับการแสดงออกของยีน (relative expression) คำนวณเป็นค่า fold change =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ตาราง 6 แสดง primer ที่ใช้สำหรับ Real time PCR

Target	Forward primer (5'→3')	Tm (°C)
	Reverse primer (5'→3')	
AQP3	forward; ACC CTC ATC CTG GTG ATG TTT	62.1
	reverse; TCT GCT CCT TGT GCT TCA CAT	59.4
GAPDH	forward; AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	59.5
	reverse; GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	57.3

ตาราง 7 แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย Real time PCR

Component	Volume for 20 $\mu$ L/reaction	Final concentration
PerfeCTa SYBR Green	4 $\mu$ L	1X
FastMix (2x) (MgCl <sub>2</sub> , dNATPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), AccuFast Taq Polymerase, SYBR Green I dye, and stabilizers)		
Forward primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Nuclease-free water	7 $\mu$ L	
Template (cDNA)	1 $\mu$ L	
Final Volume ( $\mu$ L)	20 $\mu$ L	

ตาราง 8 แสดงสถานะในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย Real time PCR

PCR cycling	Temperature	Time
PCR cycling (40cycles)	95°C	2 min
1. Denature	95°C	15 s
2. Annealing	60°C	30 s
Melt Curve	95°C	15 s
	60°C	2 min
	95°C	15 s

### 3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี Student's t-test เพื่อเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม (control DMSO) และกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กำหนดค่า  $*P < 0.05$  จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

## บทที่ 4

### ผลการดำเนินงานวิจัย

#### 4.1 ผลการกำหนดความเข้มข้นของสารเพื่อใช้ในการศึกษา

##### 4.1.1 การทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมต่อการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ด้วยเทคนิค WST-1 assay

ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค WST-1 assay เพื่อทดสอบหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และสารทรานแคริโอฟิลลิน (trans-caryophyllene) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยผลการทดสอบนี้แสดงช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร ได้แก่ ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (non-toxic doses) จำแนกได้เป็น ความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (non-proliferative dose) และความเข้มข้นที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferative dose) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (สรุปผลในตาราง 9) (แผนการทดลองแสดงในบทที่ 3)

จากการทดสอบความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และสารทรานแคริโอฟิลลิน ในช่วงความเข้มข้น 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  – 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  กับเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่มี 10%FBS ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (กำหนดให้ความเข้มข้นของตัวทำละลาย DMSO เท่ากันทุกความเข้มข้นคือ 0.8%) พบว่า

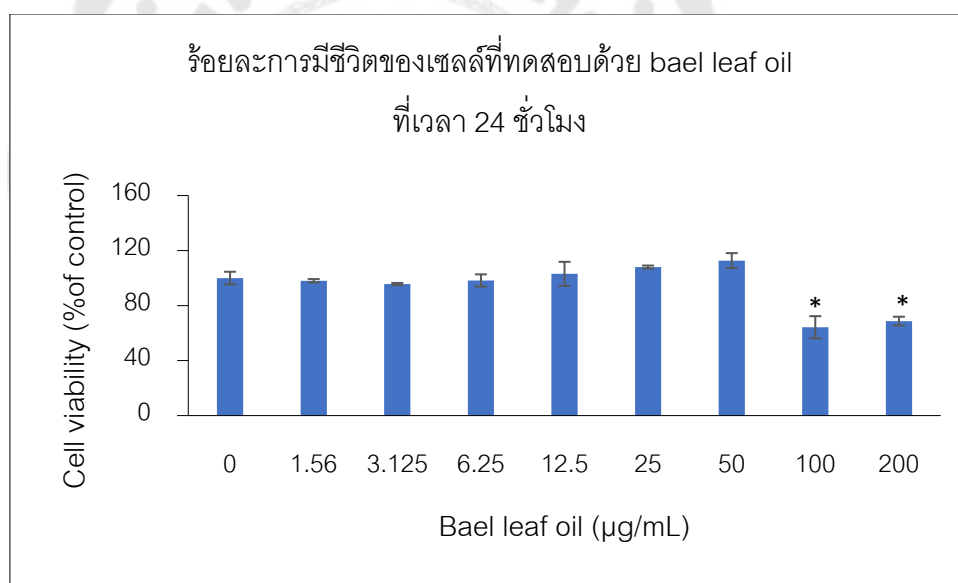
น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นในช่วง 1.56 – 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (control, 0.8% DMSO) แต่ที่ความเข้มข้น 100 และ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ทำให้ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P < 0.05$ ) (64.22% และ 68.71% ตามลำดับ) และที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1.56 – 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนที่ความเข้มข้นในช่วง 6.25 – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P < 0.05$ ) (159.98%, 159.06%, 154.95%, 162.84% และ 155.12% ตามลำดับ) และ ที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P < 0.05$ ) (66.61%) (แผนภูมิที่ 1-2)

สารลิโมนีน ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นในช่วง 1.56 – 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.8% DMSO) ที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นในช่วง 1.56 – 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนที่ความเข้มข้น

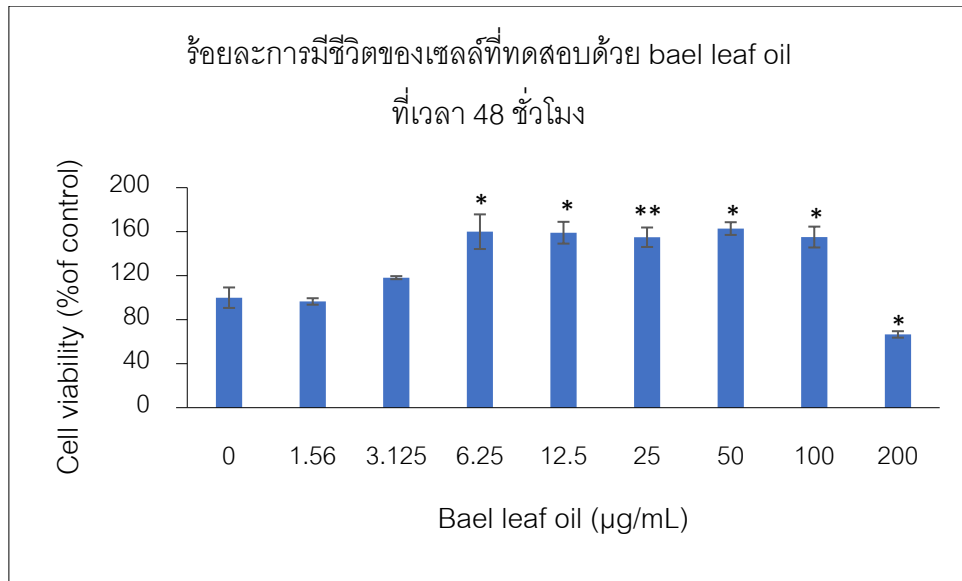


ในช่วง 6.25 – 200  $\mu\text{g/mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P<0.05$ ) (แผนภูมิที่ 3-4)

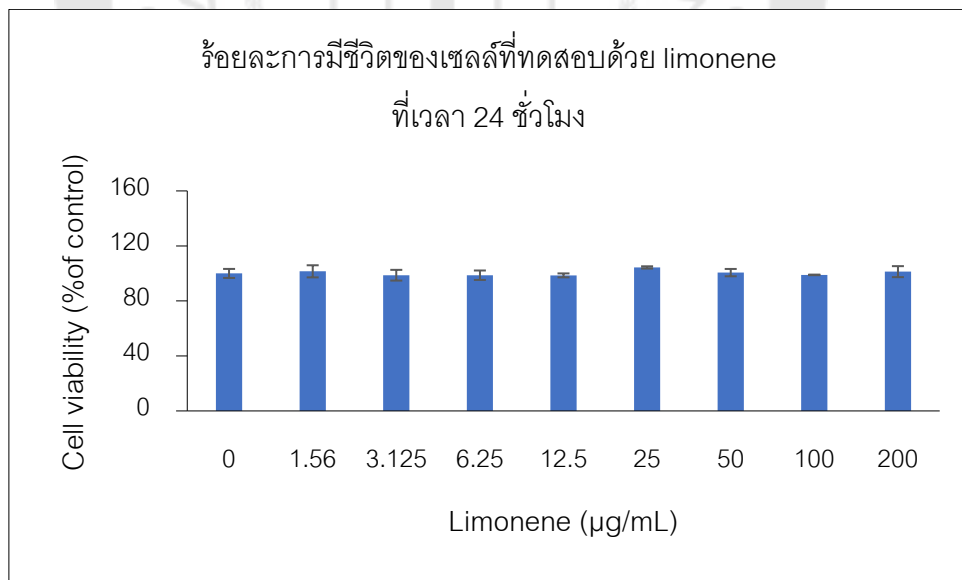
สารทรานแคโรโพลีดีน ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นในช่วง 1.56 – 50  $\mu\text{g/mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.8%DMSO) ส่วนความเข้มข้นที่ 100 และ 200  $\mu\text{g/mL}$  ทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P<0.05$ ) (69.96% และ 59.70% ตามลำดับ) ที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นในช่วง 1.56 – 3.125  $\mu\text{g/mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนที่ความเข้มข้นในช่วง 6.25 – 100  $\mu\text{g/mL}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P<0.05$ ) (140.29%, 164.56%, 166.43%, 185.47% และ 157.24% ตามลำดับ) (แผนภูมิที่ 5-6)



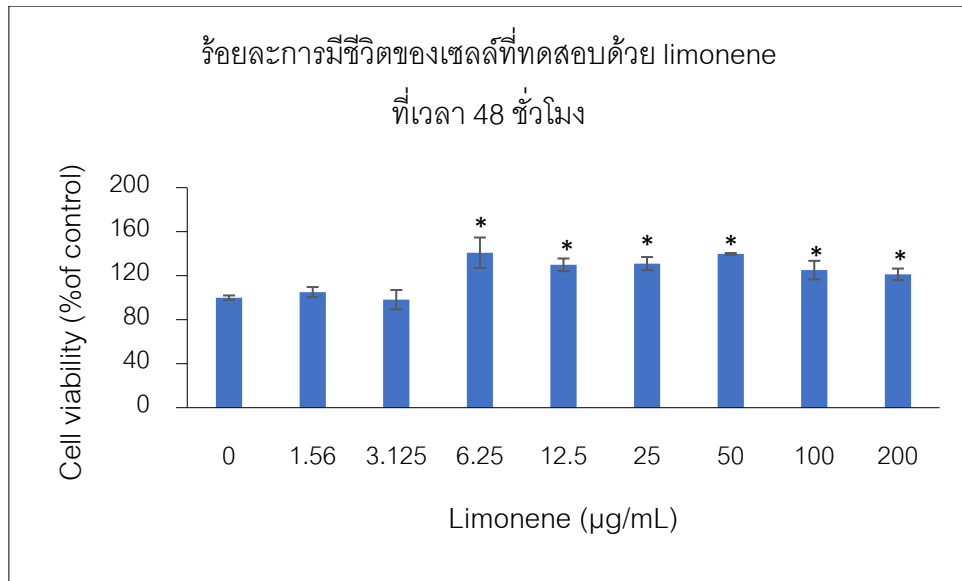
แผนภูมิที่ 1 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราตินไนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย bael leaf oil ที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $*P<0.05$ ) (3 wells)



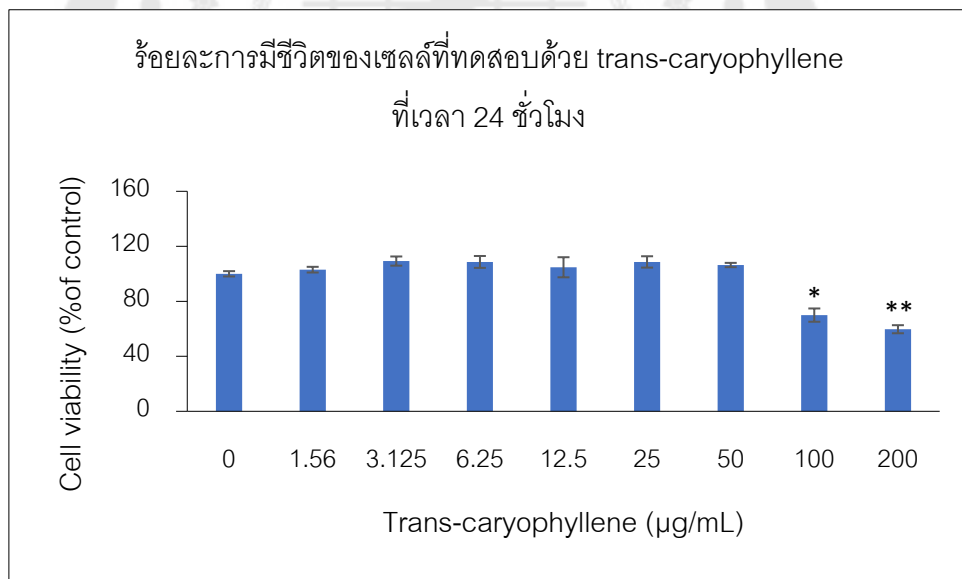
แผนภูมิที่ 2 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย bael leaf oil ที่เวลา 48 ชั่วโมง (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ) (3 wells)



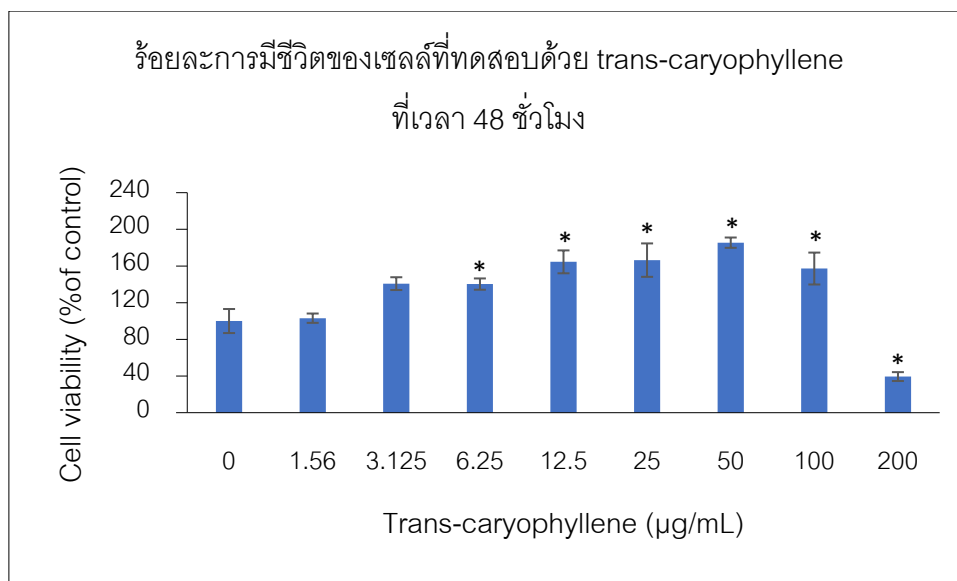
แผนภูมิที่ 3 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย limonene ที่เวลา 24 ชั่วโมง (3 wells)



แผนภูมิที่ 4 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย limonene ที่เวลา 48 ชั่วโมง (\* $P < 0.05$ ) (3 wells)



แผนภูมิที่ 5 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย trans-caryophyllene ที่เวลา 24 ชั่วโมง (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ) (3 wells)



แผนภูมิที่ 6 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย trans-caryophyllene ที่เวลา 48 ชั่วโมง (\* $P < 0.05$ ) (3 wells)

ผลการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารต่อการมีชีวิตของเซลล์ ด้วยเทคนิค WST-1 assay สรุปผลในตาราง 9 ช่วงความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม สารลิโมนีน และสารทรานแคริโอฟิลลีน ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ถูกนำไปกำหนดความเข้มข้นเพื่อใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องต่อไป

ตาราง 9 แสดงช่วงความเข้มข้นของ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และ สารทรานแคริโอฟิลลีน (trans-caryophyllene) ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เคราตินोไซต์ (HaCaT) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง โดยจำแนกได้เป็นความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (non-proliferative dose) และ ความเข้มข้นที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferative dose) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Sample	Incubation time (h)	Non-toxic dose	
		Non-proliferative dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	Proliferative dose ( $\mu\text{g/mL}$ )
Bael leaf oil	24	0-50	-
	48	0-3.125	6.25-100
Limonene	24	0-200	-
	48	0-3.125	6.25-200
Trans-caryophyllene	24	0-50	-
	48	0-3.125	6.25-100

#### 4.1.2 การกำหนดความเข้มข้นเพื่อนำไปทดสอบผลของสารต่อการสมานแผล

ช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์จากตาราง 9 นำมาคำนวณเปรียบเทียบกับอัตราส่วนของสารที่เป็นองค์ประกอบใน น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS เพื่อกำหนดความเข้มข้น ดังแสดงใน ตาราง 10

ผลจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ร้อยละ 100 จะประกอบด้วยสารหลัก สารลิโมนีน ร้อยละ 0.321 และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ร้อยละ 14.863 (ตาราง 3 ในบทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม)

เมื่อกำหนดร้อยละของ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมร้อยละ 100 เท่ากับความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ  $50 \mu\text{g/mL}$  (ตาราง 10) จะคำนวณ สารลิโมนีนที่มีอยู่ร้อยละ 0.321 ของ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมได้เป็นความเข้มข้นสูงสุดคือ  $0.2 \mu\text{g/mL}$  ส่วนสารทรานแคริโอฟิลลีนที่มีอยู่ร้อยละ 14.863 ของ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมคำนวณได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ  $8 \mu\text{g/mL}$

ตาราง 10 ตารางแสดงการคำนวณจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

Sample	(%) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS	Dose ที่เลือกจากการทำ WST-1
Bael leaf oil	100	50 µg/mL
Limonene	0.321	0.2 µg/mL
Trans-caryophyllene	14.863	8 µg/mL

นำค่าความเข้มข้นสูงสุดของสาร น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และ สารทรานแคโรฟีลลีน จากตาราง 10 ที่คำนวณได้มากำหนดช่วงความเข้มข้นที่จะนำไปทดสอบ wound healing assay แสดงในตาราง 11

ตาราง 11 แสดงการกำหนดช่วงความเข้มข้นของสารที่จะนำไปทดสอบ wound healing assay

Sample	Dose (10x)	Dose (5x)	Dose (1x)
Bael leaf oil	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL
Limonene	0.2 µg/mL	0.1 µg/mL	0.02 µg/mL
Trans-caryophyllene	8 µg/mL	4 µg/mL	0.8 µg/mL

#### 4.2 ผลการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และ สารทรานแคโรฟีลลีน (trans-caryophyllene) ต่อความสามารถในการสมานแผลของเซลล์เคราตินไซต์ (HaCaT) ด้วยวิธี wound healing assay

วิธีการศึกษาผลของสารต่อความสามารถในการสมานแผลของเซลล์เคราตินไซต์ (HaCaT) มีการศึกษากันอย่างหลากหลาย โดยพบว่า มีร้อยละของ fetal bovine serum (FBS) ที่แตกต่างกันออกไป โดยร้อยละของ FBS นั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์ เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างรวดเร็วในเวลาจำกัดอาจส่งผลต่อการสังเกตผลของสารต่อการปิดของบาดแผลได้ยาก หลายการศึกษา มีการออกแบบการทดลองโดยการลดปริมาณของ FBS ลงอยู่ใน

ระหว่าง 0-2% (Ruttanapattanakul et al., 2021);(Dakanda et al., 2017);(Rasanen & Vaheri, 2010); (Tochio et al., 2010);(Chunglok et al., 2015)

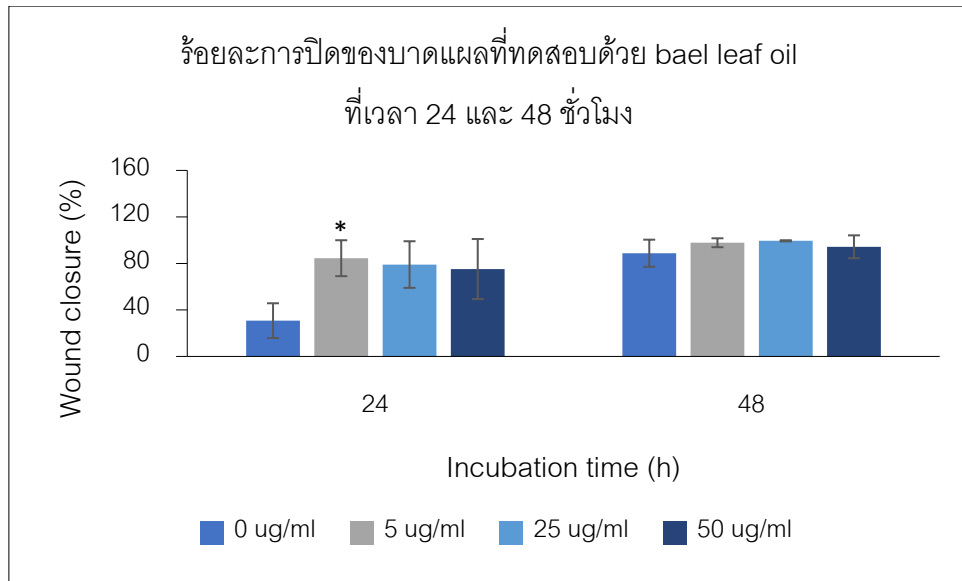
โดยในการศึกษาครั้งนี้ ใช้การลดปริมาณ FBS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 2%

ผลการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ที่ความเข้มข้น 5, 25 และ 50 µg/mL พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมสามารถกระตุ้นการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ความเข้มข้นที่ 5 µg/mL มีร้อยละของการปิดของบาดแผล (% Wound closure) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (84.51%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (30.81%) ( $P < 0.05$ ) แสดงใน (แผนภูมิที่ 7 ก และ ข, ภาพประกอบ 17) แต่ที่เวลา 48 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของร้อยละการปิดของบาดแผลของกลุ่มที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ทุกความเข้มข้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แผนภูมิที่ 7 ก และ ข, ภาพประกอบ 17)

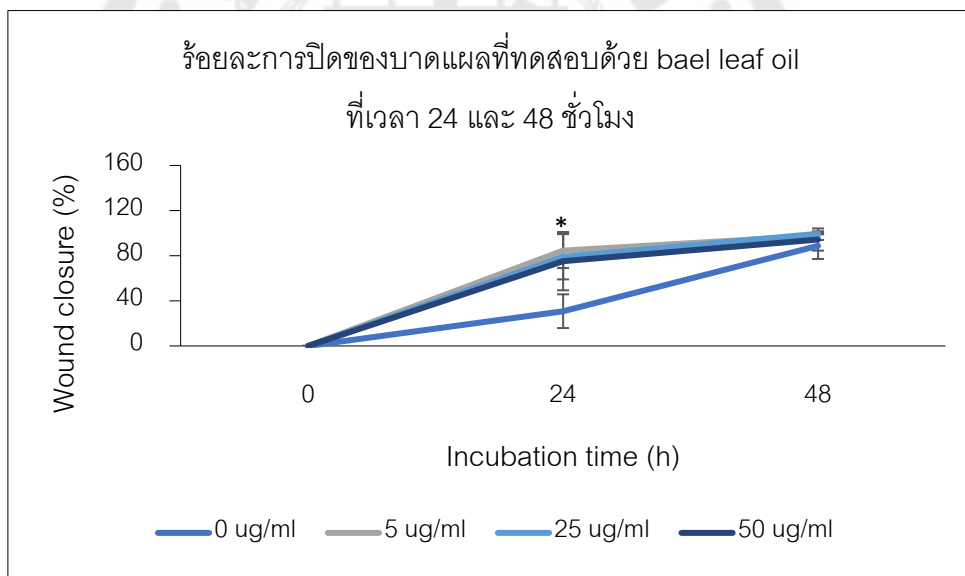
ผลการทดสอบสารลิโมนีนพบว่าที่ความเข้มข้น 0.02, 0.1 และ 0.2 µg/mL ทั้งที่เวลา 24 และที่ 48 ชั่วโมง ร้อยละของการปิดของบาดแผล ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (แผนภูมิที่ 8 ก และ ข, ภาพประกอบ 18)

ผลการทดสอบสารทรานแคริโอฟิลลีน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.8, 4 และ 8 µg/mL พบว่าที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สารทรานแคริโอฟิลลีนสามารถกระตุ้นการเกิดการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย ที่เวลา 24 ชั่วโมง สาร ทรานแคริโอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 4 µg/mL มีร้อยละของการปิดของบาดแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (77.99%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (43.45%) ( $P < 0.05$ ) และที่ 48 ชั่วโมง พบว่าสารทรานแคริโอฟิลลีนที่ความเข้มข้นที่ 0.8 µg/mL มีร้อยละของการปิดของบาดแผล เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (83.99%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (58.82%) ( $P < 0.05$ ) (แผนภูมิที่ 9 ก และ ข, ภาพประกอบ 19)



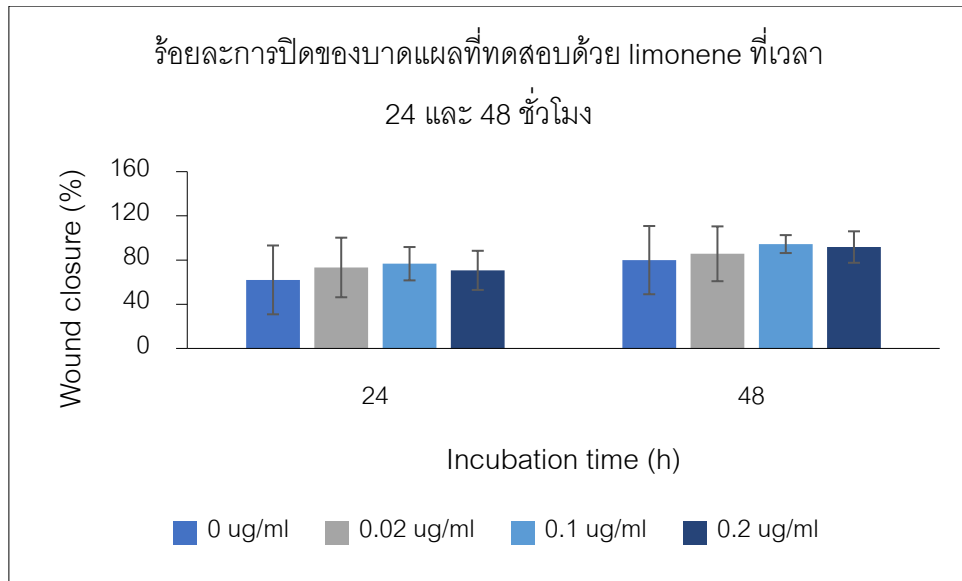


แผนภูมิที่ 7 ก

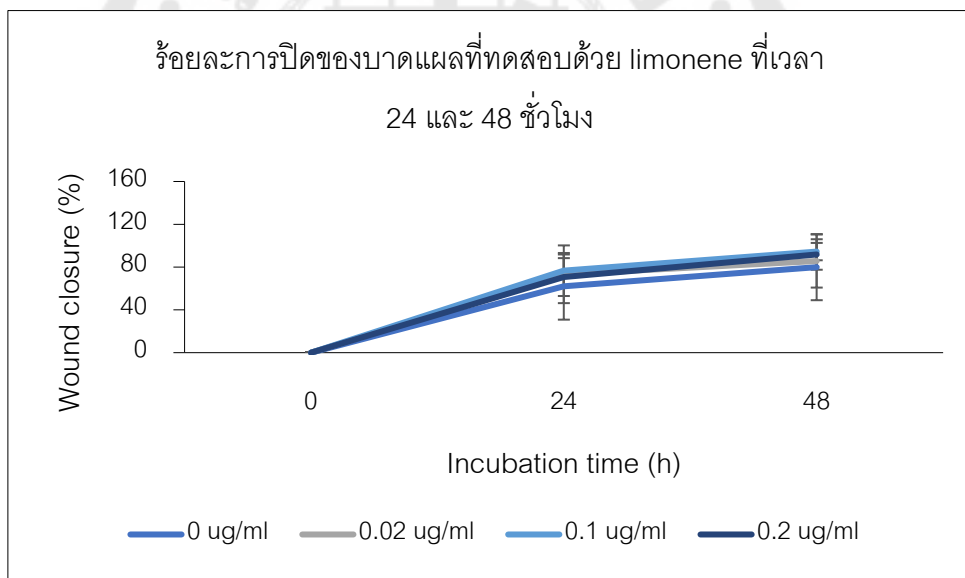


แผนภูมิที่ 7 ข

แผนภูมิที่ 7 ก และ ข แสดงร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราทีโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย bael leaf oil ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (n=3) (\* $P < 0.05$ )

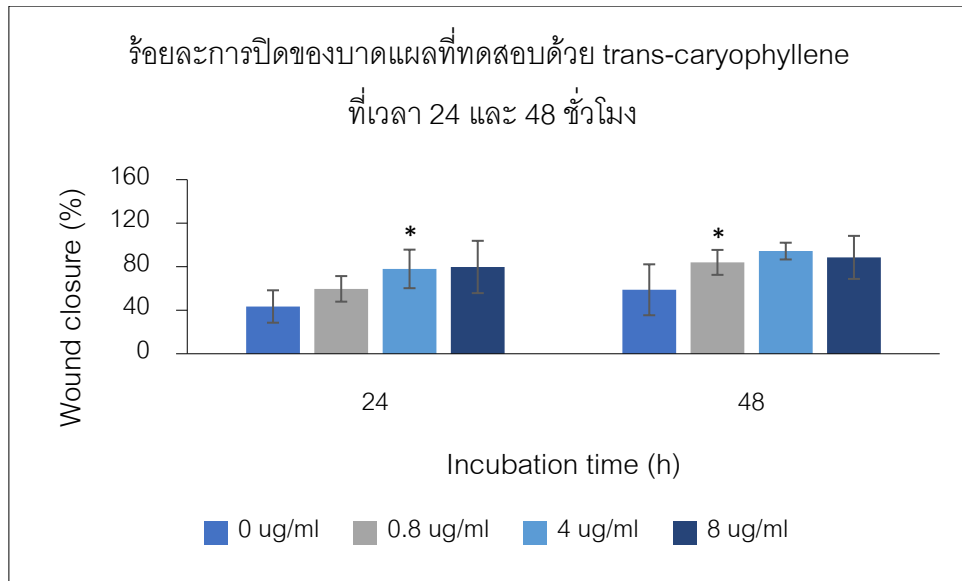


แผนภูมิที่ 8 ก

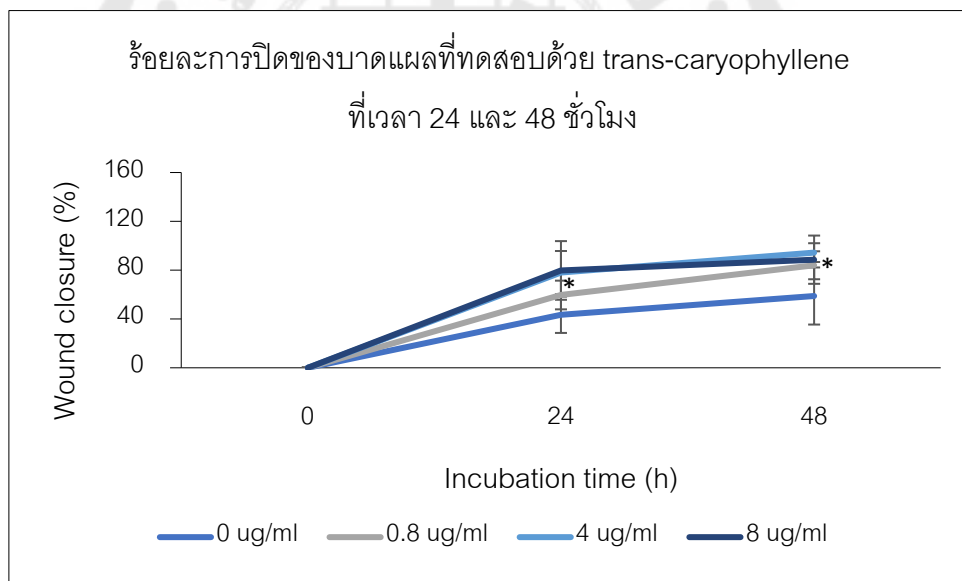


แผนภูมิที่ 8 ข

แผนภูมิที่ 8 ก และ ข แสดงร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราทีโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย limonene ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (n=3)

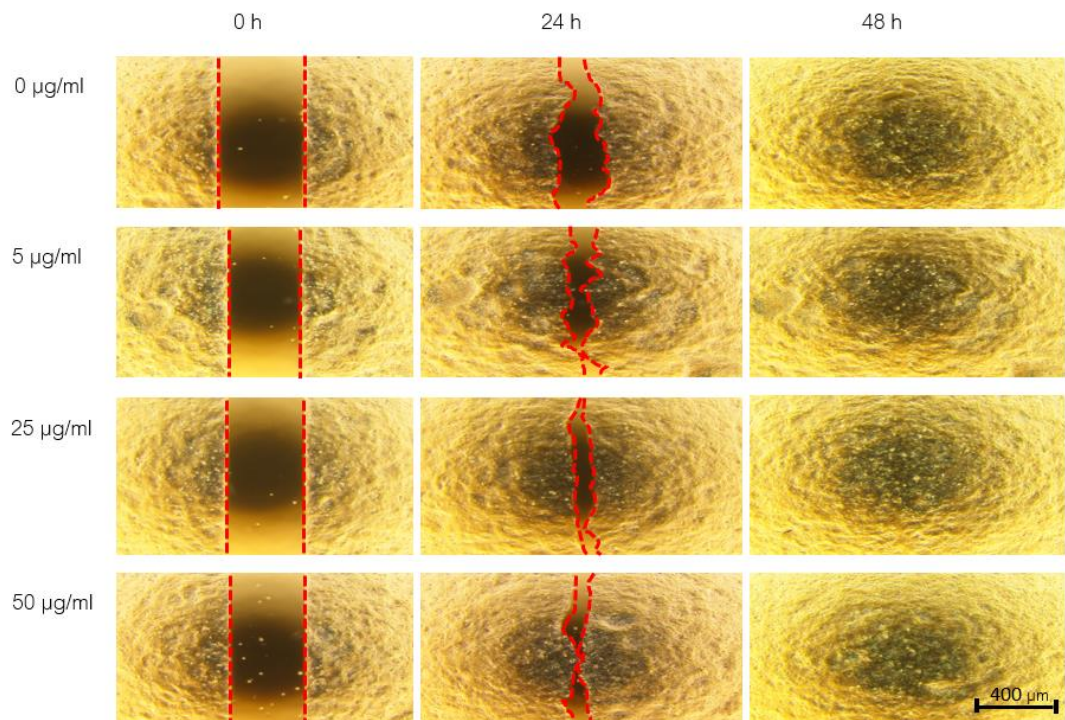


แผนภูมิที่ 9 ก

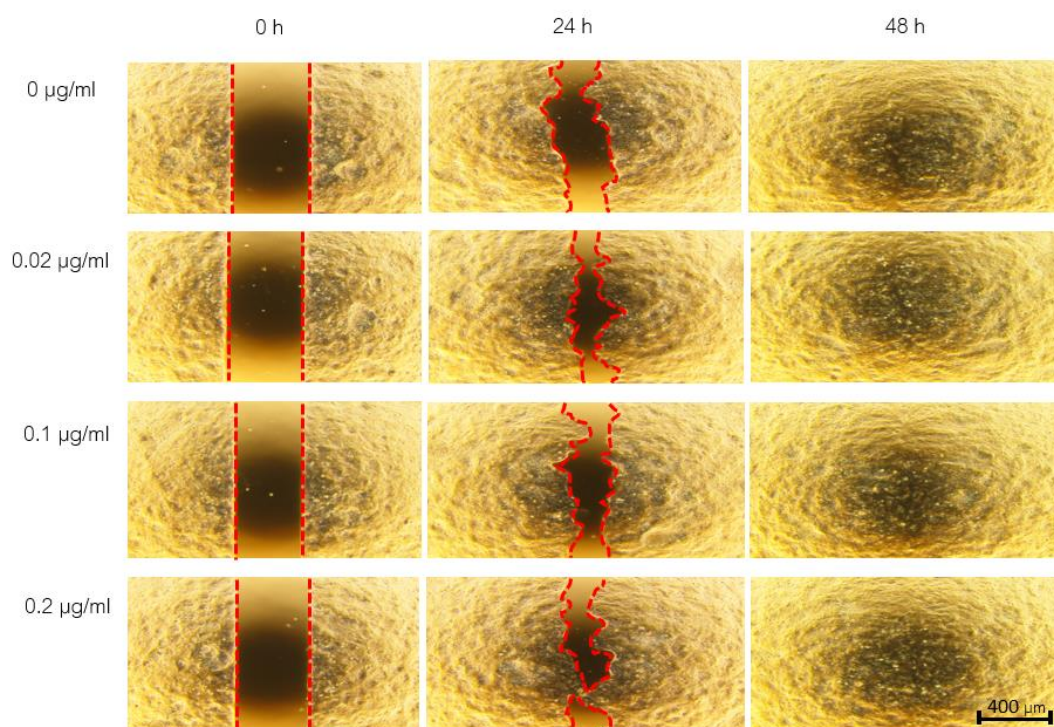


แผนภูมิที่ 9 ข

แผนภูมิที่ 9 ก และ ข แสดงร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราทีโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย trans-caryophyllene ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (n=3)  
(\* $P < 0.05$ )

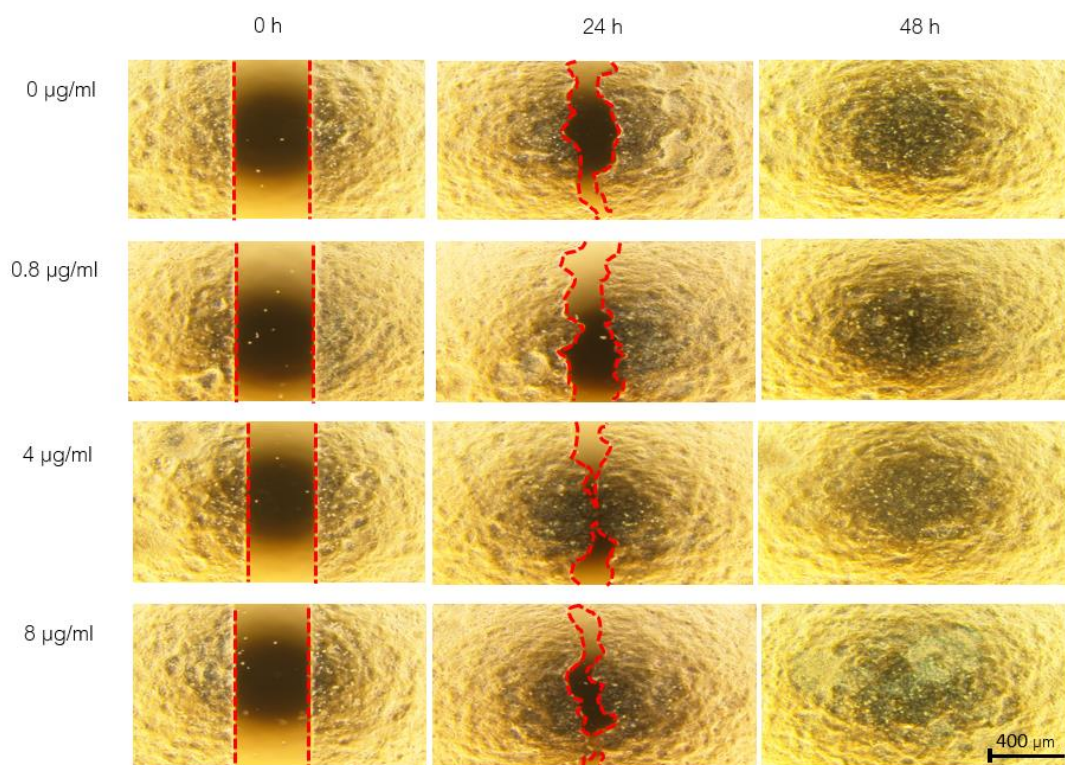


ภาพประกอบ 17 ภาพถ่ายแสดงลักษณะการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย bael leaf oil ความเข้มข้น 0, 5, 25 และ 50 µg/mL (กำลังขยาย 40 เท่า)



ภาพประกอบ 18 ภาพถ่ายแสดงลักษณะการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราตินโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย limonene ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.1 และ 0.2 µg/mL (กำลังขยาย 40 เท่า)





ภาพประกอบ 19 ภาพถ่ายแสดงลักษณะการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราตินไนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย trans-caryophyllene ความเข้มข้น 0, 0.8, 4 และ 8 µg/mL (กำลังขยาย 40 เท่า)

จากผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมและ สารทรานแคริโอฟิลลิน สามารถกระตุ้นการสมานแผลในระดับเซลล์ได้ โดยวิเคราะห์จากร้อยละการปิดของบาดแผล โดยเซลล์เคราตินไนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผล ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ สารลิโมนีนให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ดีการศึกษานี้พบว่ารูปแบบของการสมานแผลของเซลล์เคราตินไนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลหลังจากที่เซลล์ได้รับสารทั้ง 3 ชนิดรวมถึงกลุ่มควบคุม โดยทั่วไปที่เวลา 48 ชั่วโมง พบแผ่นของเซลล์ (cell monolayers) มีอยู่เต็มพื้นที่ ซึ่งทำให้การวิเคราะห์ผลความแตกต่างของการปิดบาดแผลระหว่างกลุ่มทดลองเป็นไปได้ยาก ซึ่งจากการศึกษาของ (Pavez Lorie et al., 2020) พบว่าระยะเวลา 28 ชั่วโมง ยังมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เคราตินไนไซต์ (HaCaT) เป็นสองเท่า (doubling time) อีกด้วย ดังนั้น การเติมเต็มในช่องว่างของบาดแผลแล้ว

เกือบทั้งหมดที่ 48 ชั่วโมง ของการศึกษาในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ตามปกติ มาเกี่ยวข้องเพิ่มเติมด้วย

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้เลือกผลของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมและ สารทรานแคริโอฟิลลิน ที่มีผลต่อการกระตุ้นการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลเข้าสู่ช่องว่างของบาดแผล จึงเลือกศึกษาเฉพาะที่เวลา 24 ชั่วโมง ในการศึกษาต่อไป

#### 4.3 ผลทดสอบความเกี่ยวข้องของการสมานแผลที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ด้วย ด้วยเทคนิค WST-1 assay

การเกิดการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่เกิดขึ้น มีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ร่วมกับการเพิ่มความสามารถของเซลล์ในการเคลื่อนที่ (cell migration) หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งเป็นกระบวนการของการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (re-epithelialization) ของเซลล์เคราติโนไซต์ (Pastar et al., 2014; Massimo M. Santoro & Giovanni Gaudino, 2005)

การศึกษานี้จึงทำการวิเคราะห์ผลของสารทั้ง 3 ชนิด ต่อการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งหมายถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เพื่อจำแนกกระบวนการที่เกี่ยวข้องดังที่กล่าวมา รวมถึงยืนยันความไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากผลของการลดปริมาณ FBS เป็น 2% ในการทดสอบ wound healing assay

จากการทดสอบสารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และ สารทรานแคริโอฟิลลิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ที่ความเข้มข้น 5, 25 และ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารลิโมนีน ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.1 และ 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และ สารทรานแคริโอฟิลลิน ที่ความเข้มข้น 0.8, 4 และ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (สารเดียวกันกำหนดให้ความเข้มข้นของตัวทำละลาย DMSO และ 2%FBS เท่ากันทุกความเข้มข้น) พบว่า ความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ที่นำมาใช้เพื่อศึกษา wound healing assay จากการลดปริมาณ FBS ไม่มีผลต่อการลดลงของการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เวลา 24 ชั่วโมง (แผนภูมิที่ 10-12)

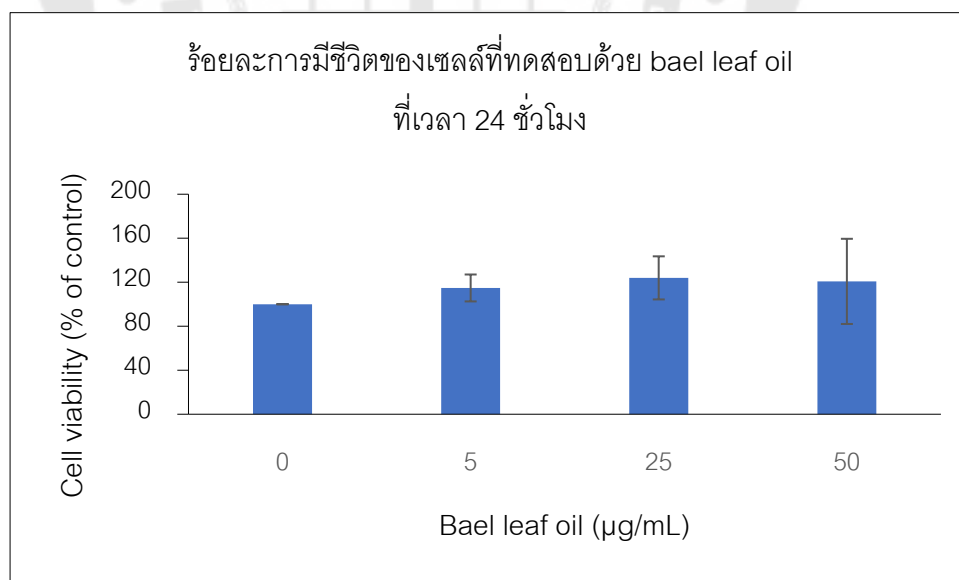
นอกจากนี้ ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ที่เวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (แผนภูมิที่ 10) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (แผนภูมิที่ 7 ก และ ข) ที่ความ



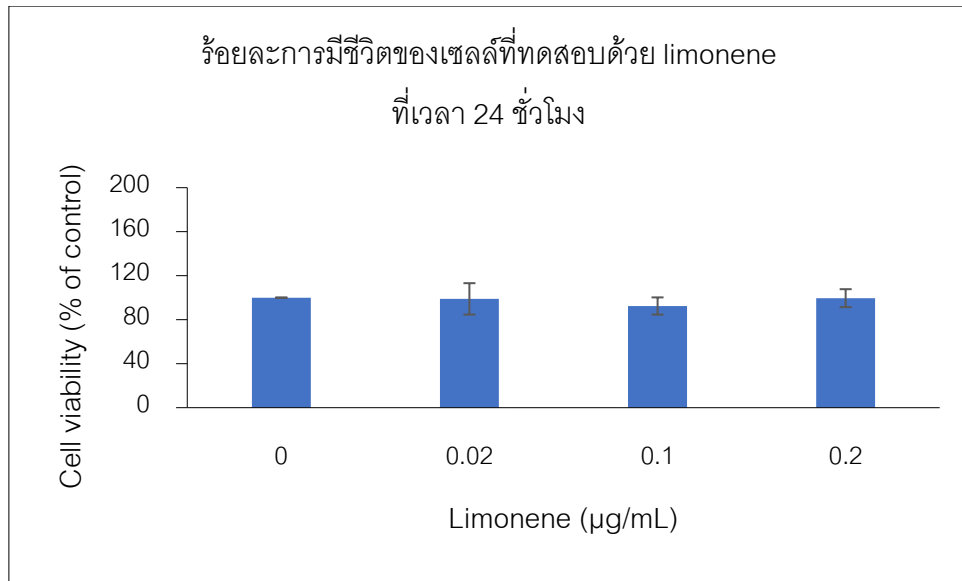
เข้มข้น 5, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง จึงไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้อง (ตาราง 12)

สารลิโมนีน ที่เวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แผนภูมิที่ 11) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย สารลิโมนีน (แผนภูมิที่ 8 ก และ ข) ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.1, 0.2  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้อง (ตาราง 12)

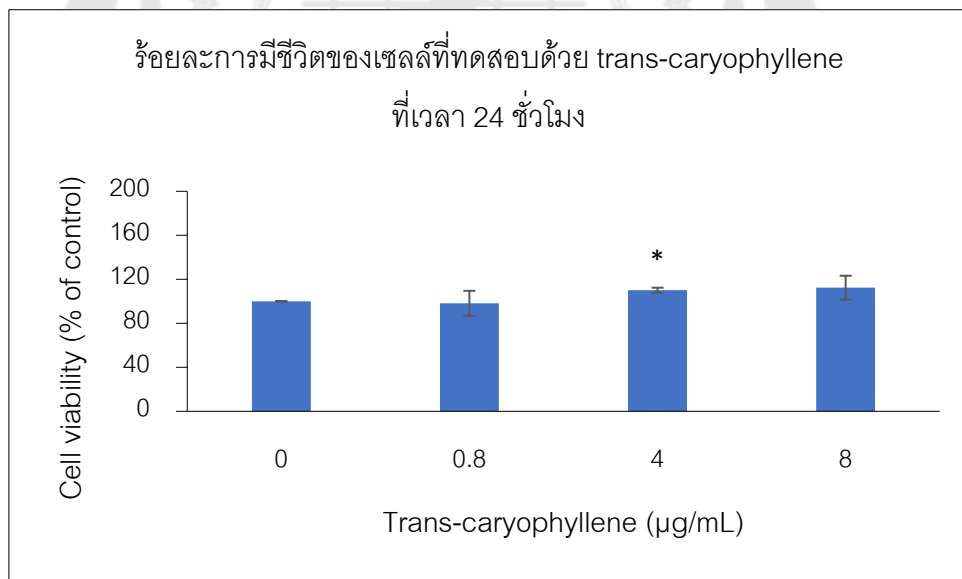
และ สารทรานแคริโอฟิลลิน ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$  (แผนภูมิที่ 12) โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P < 0.05$ ) (เพิ่มขึ้น 110.09%) (แผนภูมิที่ 12) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่ทดสอบด้วย สารทรานแคริโอฟิลลิน (แผนภูมิที่ 9 ก และ ข) ที่ความเข้มข้นที่ 4  $\mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้อง ส่วนความเข้มข้นที่ 0.8 และ 8  $\mu\text{g/mL}$  ที่ 24 ชั่วโมง ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้อง (ตาราง 12)



แผนภูมิที่ 10 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย bael leaf oil ที่เวลา 24 ชั่วโมง (n=3)



แผนภูมิที่ 11 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย limonene ที่เวลา 24 ชั่วโมง (n=3)



แผนภูมิที่ 12 แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ที่ทดสอบด้วย trans-caryophyllene ที่เวลา 24 ชั่วโมง (n=3) (\* $P < 0.05$ )

ตาราง 12 แสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของร้อยละการปิดของบาดแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผล (% wound closure) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) โดยประเมินจากร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) หลังจากได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และ สารทรานแคโรฟิลลีน ใน serum reduced medium (2%FBS) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Wound closure	% Cell viability
Bael leaf oil	5	↑	↔
	25	↔	↔
	50	↔	↔
Limonene	0.02	↔	↔
	0.1	↔	↔
	0.2	↔	↔
Trans-caryophyllene	0.8	↔	↔
	4	↑	↑
	8	↔	↔

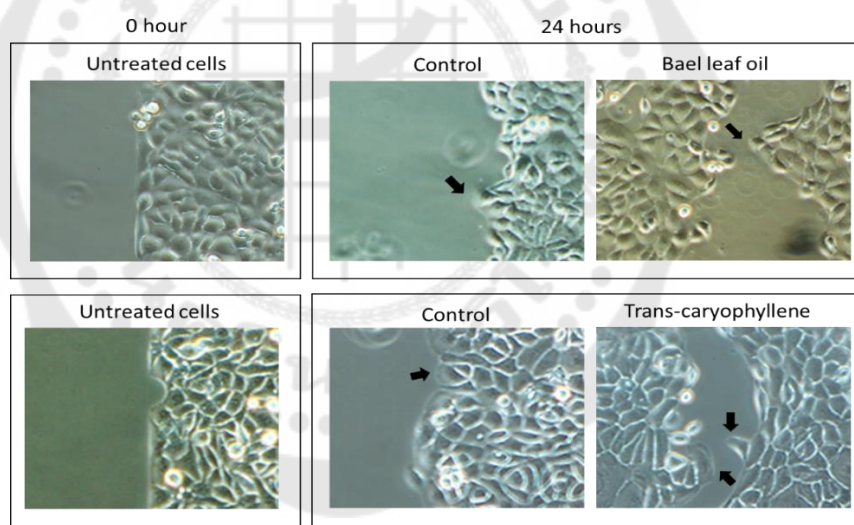
(↔ = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ↑ = เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

การเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นหนึ่งในกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (re-epithelialization) ของเซลล์เคราติโนไซต์ เข้าสู่สู่บริเวณบาดแผล (denuded area) (Pastar et al., 2014; Massimo M. Santoro & Giovanni Gaudino, 2005)

จากตาราง 12 แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการเกิดการสมานแผลหรือการเกิด re-epithelialization ของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลโดย น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (5  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่ 24 ชั่วโมงนั้น ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ส่วนการกระตุ้นการเกิดการเกิดการสมานแผลโดยสารทรานแคโรฟิลลีน (4  $\mu\text{g/mL}$ ) ที่ 24 ชั่วโมง มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วย ในขณะที่สารลิโมนีน ที่ 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเกิดการสมานแผลและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (re-epithelialization) ของเซลล์เคราติโนไซต์เข้ามาสู่บริเวณบาดแผล (denuded area) (Pastar et al., 2014; Massimo M. Santoro & Giovanni Gaudino, 2005)

การวิเคราะห์การเกิดลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) จากกล้องจุลทรรศน์ (Inverted Microscope) พบว่าการเกิดการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลที่เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากที่เซลล์ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม และ สารทรานแคโรฟิลลีน พบการแสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยการยื่นหรือแผ่ส่วนของเซลล์ (filopodia and lamellipodia formation) บริเวณขอบของบาดแผลเข้าสู่ช่องว่างของบาดแผล ตามมาด้วยการขยายพื้นที่ของแผ่นของเซลล์ (monolayer sheet) ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์แบบเป็นกลุ่ม (collecting cell migration) (Singer & Clark, 1999) โดยลักษณะดังกล่าวจะเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมงและไม่พบในกลุ่มที่ยังไม่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิด (ภาพ treated cells) ที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง ภาพประกอบ 20)



ภาพประกอบ 20 แสดงตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยการยื่นหรือแผ่ส่วนของเซลล์ (filopodia and lamellipodia formation) (ลูกศรสีดำ) บริเวณขอบของบาดแผลเข้าสู่ช่องว่างของบาดแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ของกลุ่มที่ยังไม่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง), กลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ กลุ่มที่เซลล์ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม และ สารทรานแคโรฟิลลีน ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 200 เท่า)

แม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่มีการศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง แต่ เนื่องจากการสังเกตลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะที่เด่นชัดในการเกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ เมื่อได้รับ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งสัมพันธ์กับการกระตุ้นการสมานแผล ของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) เข้าสู่ช่องว่างของบาดแผล (ภาพประกอบ 17-19, แผนภูมิที่ 7-9 และภาพประกอบ 20) จึงอาจกล่าวได้ว่า การกระตุ้นกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่หรือการสมานแผลโดย น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่เกี่ยวข้องกับการเกิดการกระตุ้นเคลื่อนที่ของเซลล์ ส่วนการกระตุ้นกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่หรือการสมานแผลโดย สารทรานแคริโอฟิลลีน ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเกี่ยวข้องกับการเกิดการกระตุ้นเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วย

#### 4.4 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) ด้วยเทคนิค RT real-time PCR

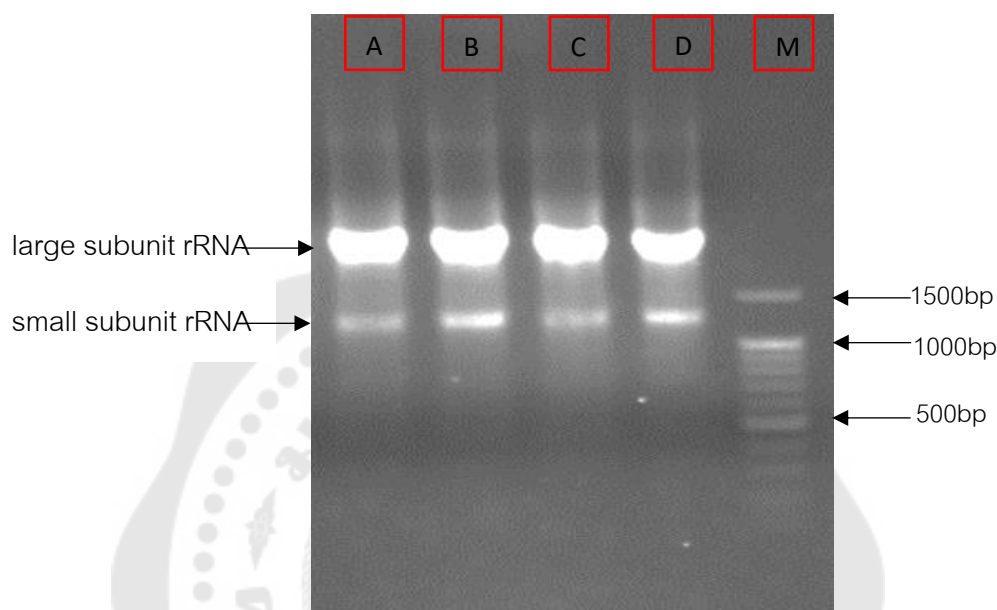
มีรายงานว่า อะควาพอริน-3 มีส่วนเกี่ยวข้องของ ในกระบวนการหายของบาดแผล การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของอะควาพอริน-3 ที่แสดงออกอย่างมากที่เคราติโนไซต์ชั้นหนังกำพร้า ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการขนส่งน้ำและกลีเซอรอลนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ (migration) และการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์เคราติโนไซต์ (Gaelle et al., 2007; M. Hara-Chikuma & A. Verkman, 2008) จากการที่น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และ สารทรานแคริโอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่ 24 ชั่วโมง ส่งผลต่อการหายของบาดแผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ ดังนั้นสารทั้งสองชนิดอาจจะกระตุ้นให้เซลล์สร้างอะควาพอริน-3

การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ด้วยเทคนิค RT real-time PCR เพื่อศึกษาว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมและ สารทรานแคริโอฟิลลีนส่งผลต่อการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์ที่การหายของบาดแผลเกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

##### 4.4.1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของ total RNA ด้วย agarose gel electrophoresis

นำ total RNA ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี spin column มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.2% agarose gel ใน 1x Tris acetate EDTA (TAE) buffer เปรียบเทียบกับ DNA marker (100bp DNA Ladder) ปรากฏแถบสว่างสองแถบของ ribosomal RNA (rRNA) ที่เป็น large subunit และ small subunit ส่วน messenger RNA (mRNA) จะมีขนาดอยู่ระหว่าง large

subunit rRNA และ small subunit rRNA (ภาพประกอบ 21) และพบว่าไม่มีแถบที่คมชัดสว่าง (shape and clear) ไม่มีรอยลากยาว (smear) บนแผ่นเจลแสดงว่า RNA ที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์มีคุณภาพที่ดี



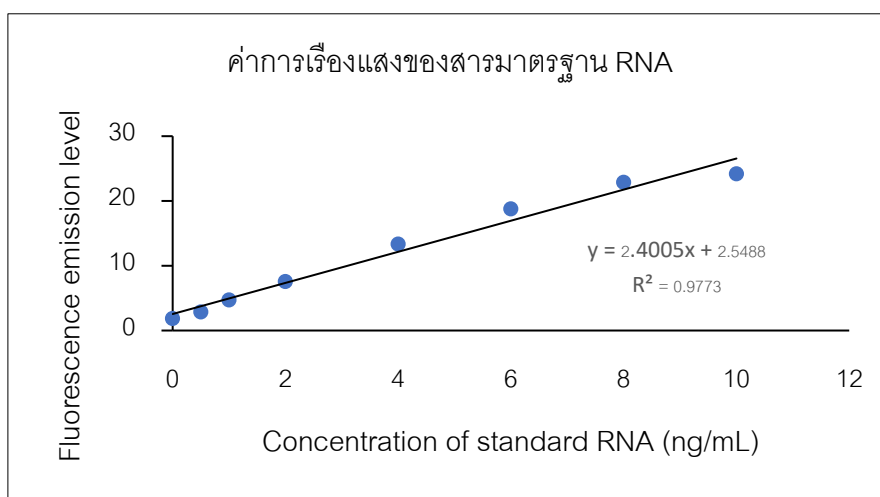
ภาพประกอบ 21 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของ RNA ด้วย agarose gel electrophoresis

(A) และ (C) RNA ที่สกัดจากเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ, (B) และ (D) RNA ที่สกัดจากเซลล์ที่ได้รับ สารทรานสคริปชัน 4  $\mu\text{g/mL}$  และ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม 5  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (M) 100bp DNA Ladder

#### 4.4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA โดยเทคนิค fluorescence spectroscopy ด้วย microplate reader

นำตัวอย่าง total RNA ที่ได้จากการสกัดมาทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ชุดวิเคราะห์ปริมาณของ Quan-iT™ RNA Assay kit ภายในชุดวิเคราะห์จะมีสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนอยู่ในช่วง 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  นำไปวัดค่าการเรืองแสงและนำค่าการเรืองแสงของสารมาตรฐานมาพล็อตกราฟเส้นตรง (ภาพประกอบ 22) ในการวิเคราะห์นี้มีเป้าหมายเพื่อหาปริมาณ total RNA โดยที่สีย้อมเรืองแสง (fluorescence dyes) จะเข้าไปแทรกที่

โมเลกุลของอาร์เอ็นเอ สีย้อมที่แทรกอยู่ในอาร์เอ็นเอจะถูกกระตุ้น (excitation) ด้วยความยาวคลื่น 644 nm และเปล่งแสง (emission) ที่ความยาวคลื่น 673 nm นำค่าการเปล่งแสงมาคำนวณโดยการแทนค่าลงในสมการเส้นตรง (ตาราง 13)



ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงระดับการเรืองแสงของอาร์เอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตาราง 13 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA

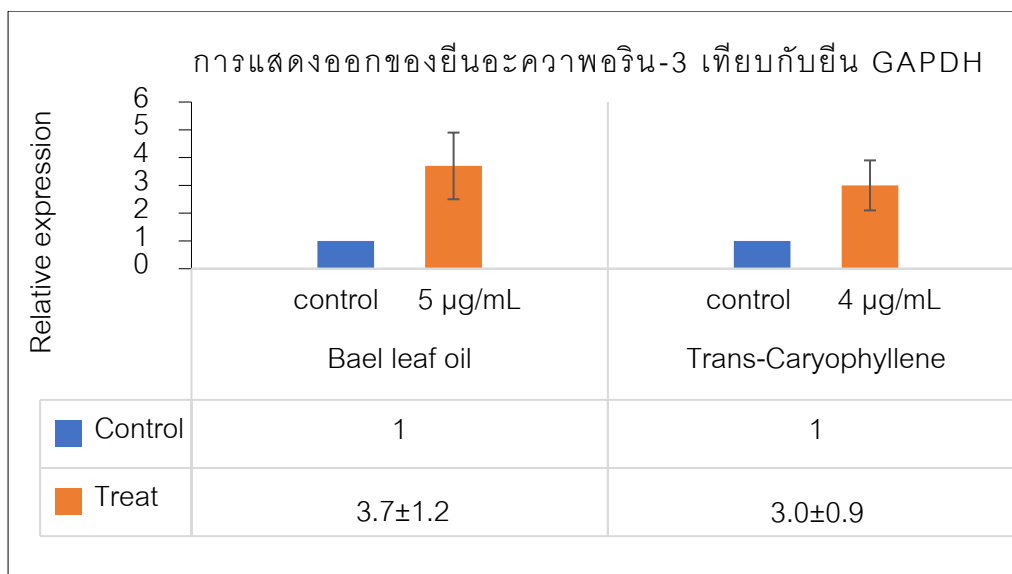
ตัวอย่างที่ศึกษา	ค่าการเรืองแสง	ปริมาณ total RNA (ng/ $\mu$ L)
RNA ที่สกัดจากเซลล์ที่ได้รับ bael leaf oil 5 $\mu$ g/mL	45.415	17.86
RNA ที่สกัดจากเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ bael leaf oil	59.736	23.82
RNA ที่สกัดจากเซลล์ที่ได้รับ trans-caryophyllene 4 $\mu$ g/mL	56.420	22.44
RNA ที่สกัดจากเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ trans-caryophyllene	50.810	20.10



#### 4.4.3 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) เทียบกับ housekeeping gene (GAPDH) ด้วย RT real-time PCR

การวิเคราะห์เริ่มจากการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA ที่สกัดจากแต่ละเซลล์โดยใช้กระบวนการรีเวิร์สทรานสคริปชัน และใช้เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส และองค์ประกอบต่างๆ ในชุดสังเคราะห์ cDNA ของ qScript cDNA SuperMix (5x) ในชุดสังเคราะห์กำหนดให้ปริมาณ total RNA ที่เหมาะสมที่จะสังเคราะห์ cDNA ควรอยู่ในช่วง 10 pg-1 µg และปริมาณ cDNA ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ควรมีปริมาณเริ่มต้นเท่าๆ กันในทุกตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA ในตาราง 13 จึงได้ทำการปรับปริมาณ total RNA ให้มีปริมาณเท่าๆ กันทุกตัวอย่าง (ประมาณ 20 ng/µL)

จากนั้น cDNA ที่ถูกสังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์จะถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบ (template) ในการสังเคราะห์ยีนอะควาพอริน-3 โดยถ้าในเซลล์นั้นมี cDNA ของยีนอะควาพอริน-3 อยู่มาก การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยจำนวนรอบน้อยๆ ก็จะสามารถตรวจจับยีนนั้นได้ แต่ในทางตรงข้ามถ้ามี cDNA อยู่น้อยจะต้องเพิ่มจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ตรวจจับยีนนั้นได้ ในกรณีที่ไม่มียีนนี้เลยก็จะไม่เกิดการสังเคราะห์ยีนนั้นๆ ในปฏิกิริยา PCR ปริมาณการแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR จะแสดงผลเป็นค่า cycle threshold (Ct) ซึ่งค่า Ct หมายถึงจำนวนรอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาซึ่งจะแปรผกผันกับปริมาณของยีน ยิ่งมีค่า Ct น้อย แสดงว่ามียีนนั้นอยู่มาก ไม่จำเป็นต้องทำปฏิกิริยาหลายรอบก็สามารถตรวจพบยีนนั้นได้ นั่นคือยีนนั้นมีระดับการแสดงออกมาก สำหรับจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR คือ 40 รอบ ซึ่งเป็นจำนวนรอบที่ยีนมีการเพิ่มขึ้นเป็น exponential การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ทำการศึกษาทั้งในเซลล์กลุ่มควบคุม และเซลล์ที่ได้รับสารสกัด ระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์แต่ละกลุ่ม จะถูกปรับฐาน (normalized) ด้วยระดับการแสดงออกของ housekeeping gene ในที่นี้คือ GAPDH การแสดงผลเป็นการแสดงว่าการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเป็นกี่เท่าเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในกลุ่มควบคุมโดยคำนวณได้จาก  $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  พบว่าระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์ HaCaT ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้น 5 µg/ml คิดเป็น  $3.7 \pm 1.2$  เท่า ของกลุ่มควบคุมและระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์ HaCaT ที่ได้รับ สารทรานแซริโอฟิลลินที่ความเข้มข้น 4µg/ml คิดเป็น  $3.0 \pm 0.9$  เท่า ของกลุ่มควบคุม (แผนภูมิที่ 13)



แผนภูมิที่ 13 แสดงผลวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 เทียบกับยีน GAPDH ด้วย RT-real-time PCR

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิผลของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และสารทรานแคริโอฟิลลีน (trans-caryophyllene) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมต่อการสมานแผล เหตุผลในการเลือกสารลิโมนีนและสารทรานแคริโอฟิลลีนมาใช้ศึกษา เนื่องจากมีรายงานว่าสารลิโมนีนเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในใบมะตูมซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Yu et al., 2017) นอกจากนี้สารทรานแคริโอฟิลลีนยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งและมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อบนผิวหนังหนูก (Gushiken et al., 2022) โดยทำการทดสอบในเซลล์เคราตินโนไซต์ (HaCaT) สังเกตการปิดบาดแผลของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ และศึกษากลไกการสมานแผลที่เกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) ในขณะที่เกิดการปิดบาดแผลเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนสารสำคัญจากพืชในการนำไปพัฒนาเป็นตำรับเภสัชภัณฑ์ในการสมานแผลในอนาคต

#### 5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

##### 5.1.1 การทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารต่อการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

จากการศึกษาช่วงความเข้มข้นของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยแยกการศึกษาออกเป็นการหาช่วงความเข้มข้นที่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมช่วงความเข้มข้น 1.56 – 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , สารลิโมนีนช่วงความเข้มข้น 1.56 – 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และสารทรานแคริโอฟิลลีนช่วงความเข้มข้น 1.56 – 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมช่วงความเข้มข้น 6.25-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , สารลิโมนีนช่วงความเข้มข้น 6.25 – 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และ สารทรานแคริโอฟิลลีนช่วงความเข้มข้น 6.25 – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ทำให้เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*P<0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมและสารทรานแคริโอฟิลลีนความเข้มข้น 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  การมีชีวิตของเซลล์ลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมงแต่กลับเพิ่มขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*P<0.05$ ) อาจเกิดจากสารทดสอบไปกระตุ้นให้เซลล์เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นแล้ว superoxide ที่เกิดขึ้นไปทำปฏิกิริยากับ WST-1 โดยตรงซึ่งไม่ใช่แอกติวิตีของไมโทคอนเดรียมีผล

ทำให้ค่า OD ที่ได้สูงกว่าความเป็นจริง อย่างไรก็ตามในการทดสอบนี้เป็นการทดสอบเพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสารเพียงครั้งเดียวจึงควรทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง จากผลการทดสอบช่วงความเข้มข้นของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ทำให้สามารถกำหนดช่วงความเข้มข้นสำหรับใช้ในการทดสอบสารต่อกรรมานแผลดังนี้ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ความเข้มข้นที่ 5, 25 และ 50  $\mu\text{g/mL}$ , สารลิโมนีน ความเข้มข้นที่ 0.02, 0.1 และ 0.2  $\mu\text{g/mL}$  และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ความเข้มข้นที่ 0.8, 4 และ 8  $\mu\text{g/mL}$

รายงานว้าซีรัม (fetal bovine serum ,FBS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมในการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ในการทดสอบกรรมานแผล (wound healing assay) มีความจำเป็นต้องชะลอการเพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วงการทดสอบ (Vang Mouritzen & Jenssen, 2018) เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่รวดเร็วเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการสังเกตและการวัดพื้นที่ของบาดแผล โดยมีหลายวิธีถูกนำมาใช้เพื่อชะลอการเพิ่มจำนวนเซลล์ ได้แก่ การไม่ให้ซีรัมแก่เซลล์ (serum starvation) การลดปริมาณซีรัมลง (serum-reduced medium) กล่าวคือเมื่อเซลล์ไม่ได้รับอาหารหรือได้รับอาหารลดลงมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง หรือการเติม mitomycin c เพื่อยับยั้งการแสดงออกของ DNA ไม่ให้ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Guan et al., 2004) อย่างไรก็ตามการใช้ย่น้อยไปอาจนำไปสู่การตายของเซลล์หรือการแยกของเซลล์สำหรับเซลล์บางชนิด ดังนั้นจึงต้องคำนึงถึงปริมาณและประเภทเซลล์ที่ใช้ทดสอบ (Vang Mouritzen & Jenssen, 2018) โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้การลดปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ลง (2% serum-reduced medium) นอกจากนี้ยังมีรายงานในเรื่องของเวลาที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (doubling time) ที่ 28 ชั่วโมง (Pavez Lorie et al., 2020) ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) สอดคล้องกับผลที่ได้ที่เวลา 48 ชั่วโมงของสารทั้ง 3 เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*P<0.05$ ) ตั้งแต่ความเข้มข้น 6.25  $\mu\text{g/mL}$  เพื่อลดปัจจัยเหล่านี้จึงเลือกศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

### 5.1.2 การทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม (bael leaf oil), สารลิโมนีน (limonene) และสารทรานแคริโอฟิลลีน (trans-caryophyllene) ต่อความสามารถในการสมานแผลของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT) ด้วยวิธี wound healing assay

การรักษาบาดแผลเป็นกระบวนการทางเซลล์และชีวเคมีที่ซับซ้อนกันซึ่งช่วยฟื้นฟูความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บโดยทั่วไปการรักษาจะเกิดขึ้นสี่ขั้นตอนที่ซับซ้อนกัน

เกิดขึ้นตั้งแต่นาทีถึงสัปดาห์คือ ขั้นที่ 1 ระยะแข็งตัวของเลือด (hemostasis) ขั้นที่ 2 ระยะอักเสบ (inflammation) ขั้นที่ 3 ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์และเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell proliferation and cell migration) ขั้นที่ 4 ระยะการเปลี่ยนแปลงเกิดรอยแผลเป็น (maturation and scarring) (Koyama et al., 2019) ในการศึกษาทำการทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสมานแผล (*in vitro*) ที่เวลา 24 ชั่วโมงของสารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม พบว่าความเข้มข้นที่ 5  $\mu\text{g/mL}$  มีร้อยละของการปิดของบาดแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (84.51%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (30.81%) ( $P < 0.05$ ) ส่วนสารลิโมนีน พบว่าร้อยละของการปิดของบาดแผล ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และสารทรานแคริโอฟิลลิน พบว่าที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$  มีร้อยละของการปิดของบาดแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (77.99%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (43.45%) ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม และสารลิโมนีน ร้อยละของการปิดของบาดแผล ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนสารทรานแคริโอฟิลลิน ที่ความเข้มข้น 0.8  $\mu\text{g/mL}$  มีร้อยละของการปิดของบาดแผล เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (83.99%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (58.82%) ( $P < 0.05$ ) ซึ่งในการศึกษาการสมานแผลครั้งนี้พบว่าทั้งวิธี scratch และ วิธี culture insert แสดงให้เห็นว่าสารที่ความเข้มข้นที่เลือกมาทดสอบมีแนวโน้มกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่เข้ามาปิดบาดแผลได้เหมือนกัน

การศึกษาในครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่พบว่า ฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ของสารทรานแคริโอฟิลลินในองค์ประกอบ และไม่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารลิโมนีนในองค์ประกอบ

ผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ (Koyama et al., 2019) ที่ทำการทดสอบสาร beta-caryophyllene ในเซลล์ fibroblasts โดยเซลล์ถูกสร้างรอยแผลด้วยวิธี scratch assay พบว่าขอบของบาดแผลมีการเคลื่อนที่เข้ามาชิดกันมากขึ้นทำให้ความกว้างของแผลลดลง 39.1% เทียบกับกลุ่มควบคุมลดลง 6.7% ในเวลา 6 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบกับแผลบนผิวหนังของหนูพบว่าช่วยเพิ่มการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่และเนื้อเยื่อที่ได้รับสารชนิดนี้ มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่ากระบวนการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (re-epithelialization) เกิดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ที่เพิ่มขึ้น

และเพื่อยืนยันผลของสารทั้ง 3 ชนิด ต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (cell proliferation) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในขณะที่เกิดการสมานแผลที่เพิ่มขึ้น รวมถึงความ

ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากผลของการลดปริมาณ FBS เป็น 2% ในการทดสอบ wound healing assay จึงได้ทำการศึกษาความเกี่ยวข้องของการสมานแผลที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ด้วยเทคนิค WST-1 assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากไอบมะตูม, สารลิโมนีน และสารทรานแคริโอฟิลลิน ที่เวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่าสารทรานแคริโอฟิลลิน ที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/ml}$  ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P < 0.05$ ) นอกจากนี้ การสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่เวลาเดียวกันของการทดสอบ (24 ชั่วโมง) พบลักษณะที่เด่นชัดในการเกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากไอบมะตูม และสารทรานแคริโอฟิลลิน ในขณะที่มีการสมานแผลที่เพิ่มขึ้น

จึงสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากไอบมะตูมในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มีฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของเซลล์ ส่วนสารทรานแคริโอฟิลลินในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มีฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์และเคลื่อนที่ของเซลล์

### 5.1.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) ด้วยเทคนิค RT real-time PCR

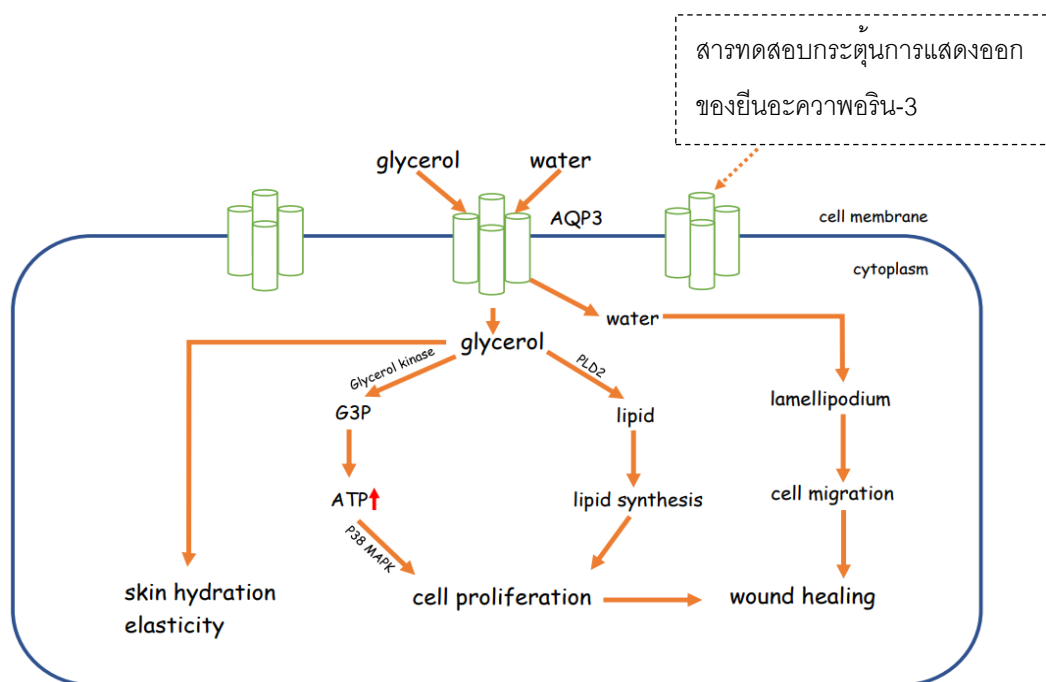
อะควาพอริน-3 เป็นอินทิกรัลโปรตีน (Integral proteins) ฝังอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) (Adeoye et al., 2022) อยู่ในกลุ่มย่อย aquaglyceroporin ทำหน้าที่ในการขนส่งน้ำ (water transport) กลีเซอรอล (glycerol) สารละลายขนาดเล็ก (small solution) รวมถึงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว อะควาพอริน-3 แสดงออกอย่างมากที่ keratinocyte ชั้น epidermis บทบาทหน้าที่ของ อะควาพอริน-3 ที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังช่วยในกระบวนการเพิ่มความชุ่มชื้นกักเก็บน้ำที่ผิว เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นเกาะป้องกันการสูญเสียน้ำผ่านทางผิวหนัง (transepidermal water loss; TEWL) (Bollag et al., 2020)

ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 (Aquaporin-3; AQP3) ที่เกี่ยวข้องในกลไกการสมานแผลในเซลล์ HaCaT ด้วยวิธี RT real-time PCR โดยปรับฐานด้วย GAPDH ซึ่งเป็น housekeeping gene พบว่าระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์ HaCaT ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากไอบมะตูม ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  คิดเป็น  $3.7 \pm 1.2$  เท่าของกลุ่มควบคุม และระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์ HaCaT ที่ได้รับสารทรานแคริโอฟิลลิน ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/ml}$  คิดเป็น  $3.0 \pm 0.9$  เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากไอบมะตูม และสารทรานแคริโอฟิลลิน มีส่วนในการกระตุ้นยีนอะควาพอริน-3



ให้มีการแสดงออกมากขึ้น มีงานวิจัยที่ศึกษาผลของยีนอะควาพอริน-3 ที่ไปส่งเสริมในกระบวนการสมานแผลในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์จะเกี่ยวข้องกับการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ โดยที่ยีน อะควาพอริน-3 ช่วยให้เกิด lamellipodium ซึ่งจำเป็นสำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Milkovic & Cipak Gasparovic, 2021) และเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) โดยที่ยีนอะควาพอริน-3 ช่วยให้เกิดกลีเซอรอล (glycerol) ผ่านเข้าสู่เซลล์ซึ่งกลีเซอรอลเป็นสารคงความชุ่มชื้นโดยธรรมชาติ (humectant) ช่วยในเรื่องรักษาความชุ่มชื้นของเซลล์ (Papadopoulos & Saadoun, 2015) กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมัน (lipid synthesis) เมื่อกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์จะถูกทำปฏิกิริยากับ phospholipase D2 (PLD2) เพื่อผลิต phosphatidylglycerol (PG) จากนั้น PG จะส่งสัญญาณ (lipid signaling) (AQP3/PLD2/PG) กระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง (cell differentiation) และเพิ่มจำนวนเซลล์ ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์และการรักษาบาดแผล (Arun et al., 2013) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อกระบวนการเผาผลาญพลังงานหรือการผลิต adenosine triphosphate (ATP) เมื่อกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็น glycerol-3-phosphate (G3P) ด้วยเอนไซม์ glycerol kinase (GK) ซึ่ง G3P เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการสร้าง ATP เมื่อเซลล์ถูกสร้างพลังงานจะมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intra cellular pathway) ผ่าน p38 MAPK เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ (apoptosis) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) นอกจากนี้ยังพบว่าหากมีการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบ (atopic dermatitis) ในทางตรงกันข้ามหากมีการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ที่ลดลงจะส่งผลให้เกิดโรคสเก็ดเงิน (psoriasis) (Tricarico et al., 2022) และในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มากเกินไปเกี่ยวข้องกับการเกิดเนื้องอก (tumor) อีกด้วย (Mariko Hara-Chikuma and A. S. Verkman., 2008); (Aikman et al., 2018) (ภาพประกอบ 23) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ทดสอบการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 เฉพาะความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการสมานแผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่านั้นเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นที่เลือกมาทดสอบมีผลต่อการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 เพียงความเข้มข้นเดียวหรืออาจมีความเข้มข้นอื่นที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ด้วยหรือไม่ควรทดสอบเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นเพิ่มเติม





ภาพประกอบ 23 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ที่เกี่ยวข้องกับ ยีนอะควาพอริน-3 ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในการ ส่งเสริมการสมานแผล

ที่มา: Mariko Hara-Chikuma and A. S. Verkman. (2008).

นอกจากนี้ในกระบวนการของการสมานแผลยังมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลาย อย่างภายในเซลล์ หนึ่งในปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องคือปัจจัยการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth factors) ได้แก่ platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fibroblast growth factor (FGF) และ epidermal growth factor (EGF) มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ อักเสบให้เข้าสู่บริเวณบาดแผลซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์เคราติโนไซต์และไฟโบร บลาสต์ นำไปสู่การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ในเนื้อเยื่อแกรนูโลส (granulation tissue) การปรับเปลี่ยนของมาตริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) และกระตุ้นการสร้างใหม่ ของเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล (Matsuda et al., 1998)

## 5.2 ข้อสรุป

1. น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (5 µg/mL) มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสมานแผลที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT)
2. สารทรานแคริโอฟิลลินที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (4 µg/mL) มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสมานแผลที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT)
3. กลไกของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมและสารทรานแคริโอฟิลลินที่ความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นการสมานแผลเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ในเซลล์เคราติโนไซต์ (HaCaT)

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการสมานแผลของสารชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมเพิ่มเติม
2. เพื่อพิสูจน์ว่ากระบวนการสมานแผลมีความเกี่ยวข้องกับยีนอะควาพอริน-3 ควรศึกษาต่อยอดโดยการยับยั้งระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ต่อไป
3. ทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการสมานแผลขององค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

## บรรณานุกรม

- Adeoye, A., Odugbemi, A., & Tolulope, A. (2022). Structure and Function of Aquaporins: the Membrane Water Channel Proteins. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12, 690-705. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.690705>
- Aikman, B., de Almeida, A., Meier-Menches, S. M., & Casini, A. (2018). Aquaporins in cancer development: opportunities for bioinorganic chemistry to contribute novel chemical probes and therapeutic agents. *Metallomics*, 10(5), 696-712. <https://doi.org/10.1039/c8mt00072g>
- Arun, S. N., Xie, D., Howard, A. C., Zhong, Q., Zhong, X., McNeil, P. L., & Bollag, W. B. (2013). Cell wounding activates phospholipase D in primary mouse keratinocytes. *Journal of lipid research*, 54(3), 581-591. <https://doi.org/10.1194/jlr.M027060>
- Avola, R., Granata, G., Geraci, C., Napoli, E., Graziano, A. C. E., & Cardile, V. (2020). Oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil provides anti-inflammatory activity and facilitates wound healing in a human keratinocytes cell model. *Food and Chemical Toxicology*, 144, 111586-111586. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111586>
- Bollag, W. B., Aitkens, L., White, J., & Hyndman, K. A. (2020). Aquaporin-3 in the epidermis: more than skin deep. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 318(6), C1144-C1153. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00075.2020>
- Boury-Jamot, M., Daraspe, J., Bonté, F., Perrier, E., Schnebert, S., Dumas, M., & Verbavatz, J. M. (2009). Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handb Exp Pharmacol*(190), 205-217. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_10)
- Boury-Jamot, M., Sougrat, R., Tailhardat, M., Varlet, B. L., Bonté, F., Dumas, M., & Verbavatz, J. M. (2006). Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1758(8), 1034-1042. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.013>
- Bras, M. M., Cruz, T. B., Maia, A. F., Oliveira, M. J., Sousa, S. R., Granja, P. L., &

- Radmacher, M. (2022). Mechanical Properties of Colorectal Cancer Cells Determined by Dynamic Atomic Force Microscopy: A Novel Biomarker. *Cancers*, 14(20).
- Chunglok, W., Sanit, L., Meensan, W., & Lertcanawanichakul, M. (2015). Wound Healing Property and Cytotoxicity against Normal Lymphocytes from Biocompounds Produced by *Brevibacillus laterosporus* SA14. *ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports*. ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports Vol. 17 No. 3 (2014): Special Issue 2014 118-125
- Cucci, L. M., Satriano, C., Marzo, T., & La Mendola, D. (2021). Angiogenin and Copper Crossing in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10704. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10704>
- Dakanda, R., Supita, T., Sawana, S., Wanwimol, K., Pilaiwanwadee, H., Varomyalin, T., & Wanida, S. (2017). Astaxanthin induces migration in human skin keratinocytes via Rac1 activation and RhoA inhibition. *Nutrition research and practice*, 11(4), 275-280.
- Fawzi Mahomoodally, M., Mollica, A., Stefanucci, A., Zakariyyah Aumeeruddy, M., Poorneeka, R., & Zengin, G. (2018). Volatile components, pharmacological profile, and computational studies of essential oil from *Aegle marmelos* (Bael) leaves: A functional approach. *Industrial Crops and Products*, 126, 13-21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.054>
- Fidyt, K., Fiedorowicz, A., Strzadata, L., & Szumny, A. (2016).  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer medicine (Malden, MA)*, 5(10), 3007-3017. <https://doi.org/10.1002/cam4.816>
- Gaëlle, B., Otto Von, S., & Thierry, O. (2007). Retinoic Acid Increases Aquaporin 3 Expression in Normal Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(3), 542. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701047>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research

Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

Guan, J.-L., Rodriguez, L., & Wu, X. (2004). Wound-Healing Assay. In.

<https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>

Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Hussni, M. F., Gonzaga, M. T., Ribeiro, V. P., de Souza, P. F., Campos, J. C. L., Massaro, T. N. C., Hussni, C. A., Takahira, R. K., Marcato, P. D., Bastos, J. K., & Pellizzon, C. H. (2022). Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 9004014.

<https://doi.org/10.1155/2022/9004014>

Hara-Chikuma, M., & Verkman, A. (2008). Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *Journal of Molecular Medicine*, 86(2), 221-231. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0272-4>

K, K., G, A., Neeraja, K., G, H., & Chakrapani, C. (2017). Analgesic and anti-inflammatory activity of ethanolic extracts of leaf and fruit pulp of *Aegle marmelos* in albino rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*.

<https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20172634>

Karimian, P., Kavooosi, G., & Amirghofran, Z. (2014). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(3), 219-227. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60235-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60235-5)

Karumaran, S., Nethaji, S., & Rajakumar, R. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of leaf extracts of *Aegle marmelos*. *Advances in Applied Science Research*, 7.

Khan, S., Ricciardelli, C., & Yool, A. J. (2021). Targeting Aquaporins in Novel Therapies for Male and Female Breast and Reproductive Cancers. *Cells*, 10(2).

Ko, Y.-J., Ahn, G., Ham, Y.-M., Song, S.-M., Ko, E.-Y., Cho, S.-H., Yoon, W.-J., & Kim, K.-N. (2017). Anti-inflammatory effect and mechanism of action of *Lindera erythrocarpa* essential oil in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. 16.

<https://doi.org/10.17179/excli2017-596>

- Koyama, S., Purk, A., Kaur, M., Soini, H. A., Novotny, M. V., Davis, K., Kao, C. C., Matsunami, H., & Mescher, A. (2019). Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. *PloS one*, *14*(12), e0216104-e0216104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216104>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, T., Hara, M., Sougrat, R., Verbavatz, J.-M., & Verkman, A. S. (2002). Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *The Journal of biological chemistry*, *277*(19), 17147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200925200>
- Matsuda, H., Koyama, H., Sato, H., Sawada, J., Itakura, A., Tanaka, A., Matsumoto, M., Konno, K., Ushio, H., & Matsuda, K. (1998). Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *The Journal of experimental medicine*, *187*(3), 297-306. <https://doi.org/10.1084/jem.187.3.297>
- Milkovic, L., & Cipak Gasparovic, A. (2021). AQP3 and AQP5-Potential Regulators of Redox Status in Breast Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(9), 2613. <https://doi.org/10.3390/molecules26092613>
- Nabaweya A. Ibrahim, Fatma S. El-Sakhawy, Magdy M. D. Mohammed, Mohamed A. Farid, Nayera A.M. Abdel-Wahed, & Deabes, D. A. H. (2015). Chemical composition, antimicrobial and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Aegle marmelos* (L.) Correa growing in Egypt. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *5*(02), 001-005. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50201>
- Nakahigashi, K., Kabashima, K., Ikoma, A., Verkman, A. S., Miyachi, Y., & Hara-Chikuma, M. (2011). Upregulation of Aquaporin-3 Is Involved in Keratinocyte Proliferation and Epidermal Hyperplasia. *Journal of Investigative Dermatology*, *131*(4), 865-873. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2010.395>

- Olsson, M., Broberg, A., Jernås, M., Carlsson, L., Rudemo, M., Suurkula, M., Svensson, P. A., & Benson, M. (2006). Increased expression of aquaporin 3 in atopic eczema. *Allergy*, 61(9), 1132-1137. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01151.x>
- Papadopoulos, M. C., & Saadoun, S. (2015). Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10, Part B), 2576-2583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.09.001>
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in wound care*, 3(7), 445. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>
- Patel, R., Kevin Heard, L., Chen, X., & Bollag, W. B. (2017). Aquaporins in the Skin. *Adv Exp Med Biol*, 969, 173-191. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_11)
- Pavez Lorie, E., Stricker, N., Plitta-Michalak, B., Chen, I. P., Volkmer, B., Greinert, R., Jauch, A., Boukamp, P., & Rapp, A. (2020). Characterisation of the novel spontaneously immortalized and invasively growing human skin keratinocyte line HaSKpw. *Scientific reports*, 10(1), 15196. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71315-0>
- Portincasa, P., & Calamita, G. (2019). Phytochemicals modulating Aquaporins: Clinical benefits are anticipated. *Food chemistry*, 274, 642-650. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.029>
- Rahman, S., Eva, E. O., Quader, R., Tasrin, M., & Khan, M. I. (2016). Effects of aqueous and ethanolic extracts of Aegle marmelos (BAEL) leaves on chronic inflammation in rats. *Ibrahim Medical College journal*, 9(2), 52-54. <https://doi.org/10.3329/imcj.v9i2.28854>
- Rahman, S., & Parvin, R. (2014). Therapeutic potential of Aegle marmelos (L.)-An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(1), 71-77. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60318-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60318-2)
- Rahman, S., Quader, M. R., Sharmin, R., Momtaz, A., Sharmin, K., Eva, E. O., & Mosaddek, A. S. M. (2016). Evaluation of Anti Ulcer Activity of Ethanolic Extract of Aegle



Marmelos Leaves on Rats.

- Rasanen, K., & Vaheri, A. (2010). TGF-beta1 causes epithelial-mesenchymal transition in HaCaT derivatives, but induces expression of COX-2 and migration only in benign, not in malignant keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 58(2), 97-104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.03.002>
- Rathee, D., Kamboj, A., & Sidhu, S. (2017). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile oil obtained from Aegle marmelos leaves collected from foothills of Shivalik range. *International Journal of Green Pharmacy*, 11, 206-210.
- Reboucas, E., Costa, J., Passos, M., Passos, J., Hurk, R., & Silva, J. (2013). Real Time PCR and Importance of Housekeeping Genes for Normalization and Quantification of mRNA Expression in Different Tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 143-154. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019>
- Ruttanapattanakul, J., Wikan, N., Okonogi, S., Na Takuathung, M., Buacheen, P., Pitchakarn, P., Potikanond, S., & Nimlamool, W. (2021). Boesenbergia rotunda extract accelerates human keratinocyte proliferation through activating ERK1/2 and PI3K/Akt kinases. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 133, 111002-111002. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111002>
- Santoro, M. M., & Gaudino, G. (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*, 304(1), 274-286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.10.033>
- Satyral, P., Katherine E. Woods, Noura S. Dosoky, Sanjaya Neupane, & Setzer, W. N. (2012). Biological Activities and Volatile Constituents of Aegle marmelos (L.) Corrêa from Nepal. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(3), 114-122. <https://doi.org/10.7275/R5Q23X59>
- Saw, T. B., Jain, S., Ladoux, B., & Lim, C. T. (2015). Mechanobiology of Collective Cell Migration. *Cellular and molecular bioengineering*, 8(1), 3-13. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0366-3>
- Shellard, A., & Mayor, R. (2020). Rules of collective migration: from the wildebeest to the neural crest. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B.*

*Biological sciences*, 375(1807), 20190387-20190387.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0387>

Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341(10), 738-746. <https://doi.org/10.1056/nejm199909023411006>

Sougrat, R., Gobin, R., Verbavatz, J.-M., Morand, M., Gondran, C., Barré, P., Bonté, F., & Dumas, M. (2002). Functional Expression of AQP3 in Human Skin Epidermis and Reconstructed Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(4), 678-685. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01710.x>

Tochio, T., Tanaka, H., Nakata, S., & Hosoya, H. (2010). Fructose-1,6-bisphosphate aldolase A is involved in HaCaT cell migration by inducing lamellipodia formation. *Journal of Dermatological Science*, 58, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.02.012>

Tosun, A., Chun, J., Jerković, I., Marijanović, Z., Fenu, M. A., Aslan, S. S., Tuberoso, C. I. G., & Kim, Y. S. (2016). Chemical Profiles and Anti-inflammatory Activity of the Essential Oils from *Seseli gummiferum* and *Seseli corymbosum* subsp. *corymbosum*. *Nat Prod Commun*, 11(10), 1523-1526.

Tricarico, P. M., Mentino, D., De Marco, A., Del Vecchio, C., Garra, S., Cazzato, G., Foti, C., Crovella, S., & Calamita, G. (2022). Aquaporins Are One of the Critical Factors in the Disruption of the Skin Barrier in Inflammatory Skin Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7).

Vang Mouritzen, M., & Jenssen, H. (2018). Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *Journal of visualized experiments*(138). <https://doi.org/10.3791/57691>

Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. A. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances [Review]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>

Verma, R. S., Padalia, R. C., & Chauhan, A. (2014). Essential oil composition of *Aegle marmelos* (L.) Correa: chemotypic and seasonal variations. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(9), 1904-1913. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6510>

- Woollard, A. C., Tatham, K. C., & Barker, S. (2007). The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. *J Wound Care*, 16(6), 255-257. <https://doi.org/10.12968/jowc.2007.16.6.27064>
- Y Sugiyama , Y Ota, M Hara, & Inoue, S. (2001). Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1522(2), 82-88. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(01\)00320-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(01)00320-7)
- Yu, L., Yan, J., & Sun, Z. (2017). D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. *Molecular medicine reports*, 15. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6241>
- นนุช หอมเนียม. (2557). บทบาทพยาบาลในการใช้หลักโภชนาการที่ส่งเสริมการหายของแผล. *วารสารพยาบาลตำรวจ*, 6(2).
- ราชพร, ส. (2558). การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรพญาสัตตอการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์. *วิทยาสารทันตแพทยศาสตร์มหิดล Vol. 35, No. 3 (Sep.-Dec. 2015)*, หน้า 299-310.
- วรพรรณ สิทธิถาวร. (2564). เอกสารประกอบการเรียนวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สุภาวดี งามเหรียญ. (2563). เอกสารประกอบการอบรมเรื่อง การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.



## ภาคผนวก ก

## วิธีการเตรียมสาร

## 1. วิธีการเตรียม Stock solution

1.1 เตรียม Stock solution ความเข้มข้น 50 mg/mL ของสารทดสอบ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม, สารลิโมนีน และ สารทรานแคริโอฟิลลีน ละลายด้วย 100% DMSO จำนวนโดยการเทียบบัญญัติตารางค์

1.1.1 เตรียม stock solution น้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม ความเข้มข้น 50 mg/mL ต้องการเตรียม 50 mg ใน 1000  $\mu$ L

มี 8.6 mg ดังนั้นต้องเติม 100% DMSO ลงไป  $(8.6\text{mg} \times 1000 \mu\text{L}) / 50\text{mg} = 172 \mu\text{L}$

1.1.2 เตรียม stock solution สารลิโมนีน ความเข้มข้น 50 mg/mL

มี 10.6 mL ดังนั้นต้องเติม 100% DMSO ลงไป = 212  $\mu$ L

1.1.3 เตรียม stock solution สารทรานแคริโอฟิลลีน ความเข้มข้น 50 mg/mL

มี 7.6 mg ดังนั้นต้องเติม 100% DMSO ลงไป = 152  $\mu$ L

## 2. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

2.1 เตรียม Normal medium (10%FBS) ประกอบด้วย Culture medium 89.26 mL + 100%FBS 10 mL + 0.75% Penicillin-Streptomycin 0.75 mL

2.2 เตรียม Serum reduced medium (2%FBS) ประกอบด้วย Culture medium 97.25 mL + 100%FBS 2 mL + 0.75% Penicillin-Streptomycin 0.75 mL

### 3. วิธีการเตรียมสารสำหรับใช้ทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมต่อการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค WST-1 assay

3.1 การเตรียมสารจาก stock 50 mg/mL ที่ความเข้มข้นสูงสุด 400 µg/mL (ความเข้มข้นสุดท้ายใน well) ดังนั้นต้องเตรียมสารที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดลองครั้งนี้เป็น (2x) คือ 800 µg/mL จำนวน 1200 µL (โดยที่ 600 µL สำหรับใช้ทดสอบและอีก 600 µL สำหรับใช้เจือจางในความเข้มข้นถัดไป)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$50 \text{ mg/mL} \times V_1 = 0.8 \text{ mg/mL} \times 1200 \text{ µL}$$

$$V_1 = (0.8 \text{ mg/mL} \times 1200 \text{ µL}) / 50 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 19.2 \text{ µL} + 1180.8 \text{ µL}$$

$$= 1200 \text{ µL}$$

ดังนั้น ต้องปิเปตสารจาก stock 50 mg/mL ปริมาตร 19.2 µL แล้วเติม normal medium ปริมาตร 1180.8 µL

(หากปิเปตสารที่เตรียมไว้ความเข้มข้น 2x จำนวน 50 µL ใส่ใน well ที่มีเซลล์จำนวน 50 µL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายจะเป็น 1x จาก 800 จะเป็น 400 µg/mL)

3.2 การคำนวณความเข้มข้นของ %DMSO เมื่อเตรียมความเข้มข้นสารสูงสุดที่ 2x

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100\% \times 19.2 \text{ µL} = C_2 \times 1200 \text{ µL}$$

$$V_1 = (100\% \times 19.2 \text{ µL}) / 1200 \text{ µL}$$

$$V_1 = 1.6\%$$

ดังนั้น ต้องปิเปต 100% DMSO จาก stock สารจำนวน 19.2 µL แล้วเติม normal medium 1180.8 µL ความเข้มข้นสุดท้ายจะมี % DMSO เท่ากับ 1.6 %

(หากปีเปิดสารที่เตรียมไว้ความเข้มข้น 2x จำนวน 50  $\mu\text{L}$  ใส่ใน well ที่มีเซลล์จำนวน 50  $\mu\text{L}$  จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x จาก 1.6%DMSO จะเป็น 0.8%DMSO)

3.3 เตรียมสารทดสอบทั้ง 3 ชนิดจาก stock solution ด้วยการทำให้ serial dilution แล้วเจือจางด้วย normal medium เพื่อใช้ในขั้นตอนการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยวิธี WST-1 assay

การเตรียมความเข้มข้นที่ 2X						
Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Stock (mg/mL)	Conc. 2x ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume sample ( $\mu\text{L}$ )	%DMSO in medium before dilution	Volume medium ( $\mu\text{L}$ )	Final %DMSO
400	50	800	19.2	0	1180.8	1.6
200		400	600	1.6	600	1.6
100		200	600	1.6	600	1.6
50		100	600	1.6	600	1.6
25		50	600	1.6	600	1.6
12.5		25	600	1.6	600	1.6
6.25		12.5	600	1.6	600	1.6
3.125		6.25	600	1.6	600	1.6
1.56		3.125	600	1.6	600	1.6

สารที่ความเข้มข้น 2X จะถูกนำไปผสมกับ medium และเซลล์ในหลุมที่มีปริมาตรเท่ากัน เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้าย 1X ก่อนเริ่มทำการทดสอบตามเวลาที่กำหนด

#### 4. วิธีเตรียมสารสำหรับใช้ทดสอบการสมานแผลด้วยวิธี wound healing assay และทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ WST-1 assay

4.1 แสดงวิธีคำนวณการเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมจาก stock 50 mg/mL ให้มีความเข้มข้น 50, 25, 5  $\mu\text{g/mL}$  โดยให้มี %DMSO เท่ากับ 0.1% เท่ากันทุกความเข้มข้น



Tube.1 เตรียมสารความเข้มข้น 50 µg/mL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$50 \text{ mg/mL} \times V_1 = 0.05 \text{ mg/mL} \times 7000 \text{ µL}$$

$$V_1 = (0.05 \text{ mg/mL} \times 7000 \text{ µL}) / 50 \text{ mg/mL}$$

$V_1 = 7 \text{ µL}$  แล้วเติม 0% DMSO in serum reduced medium 2%FBS ปริมาตร 6993 µL ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% DMSO)

วิธีคำนวณความเข้มข้น DMSO จากการปิเปตสาร 50 mg/mL ที่มี 100%DMSO มา 7 µL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100\% \times 7 \text{ µL} = C_2 \times 7000 \text{ µL}$$

$$C_2 = (100\% \times 7 \text{ µL}) / 7000 \text{ µL}$$

$$C_2 = 0.1\%$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายจะมี %DMSO ของสารที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่จะทดสอบ (50 mg/mL) เท่ากับ 0.1%

Tube.2 เตรียมสารความเข้มข้น 25 µg/mL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$50 \text{ µg/mL} \times V_1 = 25 \text{ µg} \times 6000 \text{ µL}$$

$$V_1 = (25 \text{ µg/mL} \times 6000 \text{ µL}) / 50 \text{ µg/mL}$$

$V_1 = 3000 \text{ µL}$  แล้วเติม 0.1% DMSO in serum reduced medium 2%FBS ปริมาตร 3000 µL (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% DMSO)

Tube.3 เตรียมสารความเข้มข้น 5 µg/mL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$25 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 5 \mu\text{g/mL} \times 3000 \mu\text{L}$$

$$V_1 = (5 \mu\text{g/mL} \times 3000 \mu\text{L}) / 25 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 600 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0.1\% \text{ DMSO in serum reduced medium } 2\% \text{FBS}$$

ปริมาตร 2400 µL (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% DMSO)

4.2 วิธีคำนวณการเตรียม 0.1% DMSO จาก 100% DMSO

Tube. 1 เตรียม 0.1% DMSO จำนวน 10 mL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100\% \times V_2 = 0.1\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_2 = (0.1\% \times 10 \text{ mL}) / 100\%$$

$$V_2 = 0.01 \text{ mL หรือ } 10 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0\% \text{ DMSO in serum reduced medium}$$

2%FBS ปริมาตร 9990 µL

ดังนั้น ต้องปิเปต 100%DMSO มา 10 µL

4.3 แสดงวิธีคำนวณการเตรียมสารลิโมเนนจาก stock 50 mg/mL ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.1, 0.02 µg/mL โดยให้มี %DMSO เท่ากับ 0.0004% เท่ากันทุกความเข้มข้น

Tube.1 เตรียมสารความเข้มข้น 200 µg/mL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$50 \text{ mg/mL} \times V_1 = 0.2 \text{ mg/mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = (0.2 \text{ mg/mL} \times 500 \mu\text{L}) / 50 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 2 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0\% \text{ DMSO in serum reduced medium } 2\% \text{FBS ปริมาตร}$$

498 µL (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4% DMSO)

คำนวณความเข้มข้นของ %DMSO จากการบีบอัดสารความเข้มข้น 50 mg/mL ที่มี 100%DMSO มา 2  $\mu$ L

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100\% \times 2 \mu\text{L} = C_2 \times 500 \mu\text{L}$$

$$C_2 = (100\% \times 2 \mu\text{L}) / 500 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0.4\%$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายจะมี %DMSO ของสารที่ความเข้มข้นสูงสุด 200  $\mu$ g/mL เท่ากับ 0.4%

Tube.2 เตรียมสารความเข้มข้น 0.2  $\mu$ g/mL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$200 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 0.2 \mu\text{g/mL} \times 7000 \mu\text{L}$$

$$V_1 = (0.2 \mu\text{g/mL} \times 7000 \mu\text{L}) / 200 \mu\text{g/mL}$$

$V_1 = 7 \mu\text{L}$  แล้วเติม 0% DMSO in serum reduced medium 2%FBS ปริมาตร

6993  $\mu$ L (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0004% DMSO)

คำนวณความเข้มข้นของ %DMSO จากการบีบอัดสารความเข้มข้น 0.2  $\mu$ g/mL ที่มี 100%DMSO มา 7  $\mu$ L

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$0.4\% \times 7 \mu\text{L} = C_2 \times 7000 \mu\text{L}$$

$$C_2 = (0.4\% \times 7 \mu\text{L}) / 7000 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0.0004\%$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายจะมี %DMSO ของสารที่ความเข้มข้นสูงสุด 0.2  $\mu$ g/mL เท่ากับ

0.0004%

Tube.3 เตรียมสารความเข้มข้น 0.1 µg/mL

$$C1V1 = C2V2$$

$$0.2 \mu\text{g/mL} \times V1 = 0.1 \mu\text{g/mL} \times 6000 \mu\text{L}$$

$$V1 = (0.1 \mu\text{g/mL} \times 6000 \mu\text{L}) / 0.2 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 3000 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0.0004\% \text{ DMSO serum reduced medium } 2\% \text{ FBS}$$

ปริมาตร 3000 µL (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0004% DMSO)

Tube.4 เตรียมสารความเข้มข้น 0.02 µg/mL

$$C1V1 = C2V2$$

$$0.1 \mu\text{g/mL} \times V1 = 0.02 \mu\text{g/mL} \times 3000 \mu\text{L}$$

$$V1 = (0.02 \mu\text{g/mL} \times 3000 \mu\text{L}) / 0.1 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 600 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0.0004\% \text{ DMSO serum reduce medium (} 2\% \text{ FBS)}$$

ปริมาตร 2400 µL (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0004% DMSO)

4.4 วิธีคำนวณการเตรียม 0.4% DMSO จาก 100% DMSO

Tube.1 เตรียม 0.4% DMSO จำนวน 500 µL

$$C1V1 = C2V2$$

$$100\% \times V2 = 0.4\% \times 500 \mu\text{L}$$

$$V2 = (0.4\% \times 500 \mu\text{L}) / 100\%$$

$$V2 = 2 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0\% \text{ DMSO in serum reduced medium } 2\% \text{ FBS ปริมาตร}$$

498 µL

ดังนั้น ต้องเปิด 100% DMSO มา 2 µL

วิธีคำนวณการเตรียม 0.0004% DMSO จาก 0.4% DMSO

Tube.2 เตรียม 0.0004% DMSO จาก 0.4% DMSO จำนวน 10 mL ดังนั้นต้องเตรียม

$$C1V1=C2V2$$

$$0.4\% \times V1 = 0.0004\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = (0.0004\% \times 10 \text{ mL}) / 0.4\%$$

$$V1 = 0.01 \text{ mL หรือ } 10 \text{ }\mu\text{L แล้วเติม } 0\% \text{ DMSO in serum reduced medium}$$

2%FBS ปริมาตร 9990  $\mu\text{L}$

ดังนั้น ต้องปิเปต 0.4%DMSO มา 10  $\mu\text{L}$

4.5 แสดงวิธีคำนวณการเตรียมสารทรานเคริโอฟิลลินจาก stock 50 mg/mL ให้มีความเข้มข้น 8, 4, 0.8  $\mu\text{g/mL}$  โดยให้มี %DMSO เท่ากับ 0.016% เท่ากันทุกความเข้มข้น

Tube.1 เตรียมสารความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/mL}$

$$C1V1=C2V2$$

$$50 \text{ mg/mL} \times V1 = 0.008 \text{ mg/mL} \times 7000 \text{ }\mu\text{L}$$

$$V1 = (0.008 \text{ mg/mL} \times 7000 \text{ }\mu\text{L}) / 50 \text{ mg/mL}$$

$$V1 = 1.12 \text{ }\mu\text{L แล้วเติม } 0\% \text{ DMSO in serum reduced medium } 2\% \text{FBS}$$

ปริมาตร 6998.88  $\mu\text{L}$  (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.016% DMSO)

คำนวณความเข้มข้นของ % DMSO จากการปิเปตสารความเข้มข้น 50 mg/mL ที่มี 100%DMSO มา 1.12  $\mu\text{L}$

$$C1V1=C2V2$$

$$100\% \times 1.12 \text{ }\mu\text{L} = C2 \times 7000 \text{ }\mu\text{L}$$

$$C2 = (100\% \times 1.12 \text{ }\mu\text{L}) / 7000 \text{ }\mu\text{L}$$

$$C2 = 0.016\%$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายจะมี %DMSO ของสารที่ความเข้มข้นสูงสุด 8 µg/mL เท่ากับ 0.016%

Tube.2 เตรียมสารความเข้มข้น 4 µg/mL

$$C1V1 = C2V2$$

$$8 \mu\text{g/mL} \times V1 = 4 \mu\text{g/mL} \times 6000 \mu\text{L}$$

$$V1 = (4 \mu\text{g/mL} \times 6000 \mu\text{L}) / 8 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 3000 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0.016\% \text{ DMSO in serum reduce medium } 2\% \text{ FBS}$$

ปริมาตร 3000 µL (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.016% DMSO)

Tube.3 เตรียมสารความเข้มข้น 0.8 µg/mL

$$C1V1 = C2V2$$

$$4 \mu\text{g/mL} \times V1 = 0.8 \mu\text{g/mL} \times 3000 \mu\text{L}$$

$$V1 = (0.8 \mu\text{g/mL} \times 3000 \mu\text{L}) / 4 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 600 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 2400 \mu\text{L } 0.016\% \text{ DMSO in serum reduced medium}$$

ปริมาตร 2%FBS (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.016% DMSO)

4.6 วิธีคำนวณการเตรียม 0.016% DMSO จาก 100% DMSO

Tube.1 เตรียม 0.016% DMSO จำนวน 10 mL ดังนั้นต้องเตรียม

$$C1V1 = C2V2$$

$$100\% \times V2 = 0.016\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V2 = (0.016\% \times 10 \text{ mL}) / 100\%$$

$$V2 = 0.0016 \text{ mL หรือ } 1.6 \mu\text{L} \text{ แล้วเติม } 0\% \text{ DMSO in serum reduced medium}$$

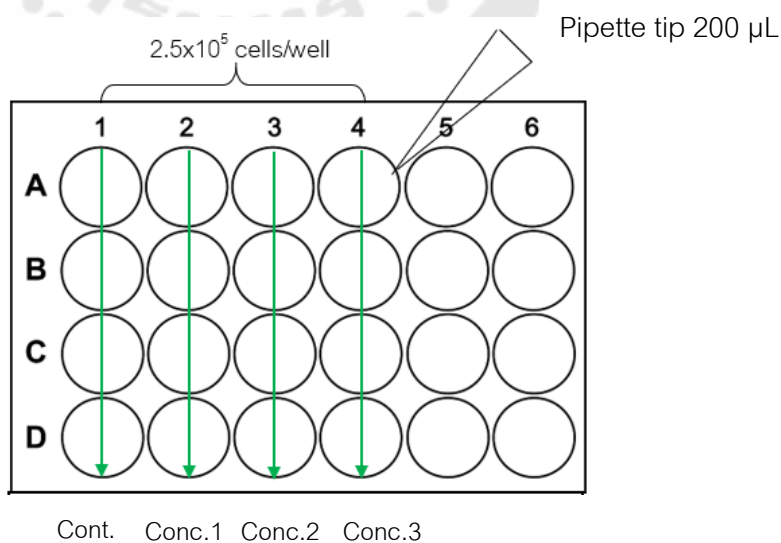
2%FBS ปริมาตร 9998.4 µL

ดังนั้น ต้องปิเปต 100%DMSO มา 1.6 µL

4.7 การเตรียมสารทดสอบทั้ง 3 ชนิดจาก stock solution ด้วยการทำให้ serial dilution แล้วเจือจางด้วย serum reduced medium (2%FBS) เพื่อใช้ในการศึกษาผลการปิดของบาดแผล (wound healing assay) และการมีชีวิตของเซลล์ (WST-1 assay)

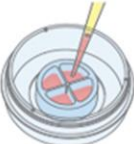
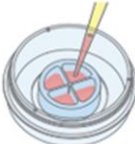
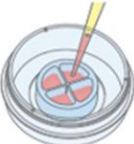
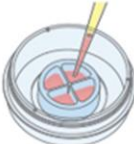





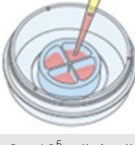

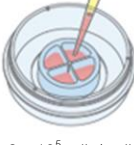
Stock (mg/mL)	Sample	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume sample ( $\mu\text{L}$ )	%DMSO in medium before dilute	Volume medium ( $\mu\text{L}$ )	Final %DMSO
50	Bael leaf oil	50	7	0	6993	0.1
		25	3000	0.1	300	0.1
		5	600	0.1	2400	0.1
50	Limonene	0.2	7	0	6993	0.0004
		0.1	3000	0.0004	300	0.0004
		0.02	600	0.0004	2400	0.0004
50	Trans-caryophyllene	8	1.13	0	6998.88	0.016
		4	3000	0.016	3000	0.016
		8.0	600	0.016	2400	0.016













5. แสดงภาพตัวอย่างแผนผังการใส่เซลล์และสารทดสอบในการศึกษาฤทธิ์การสมานแผล ด้วยวิธี Wound healing assay ใน 24 well plate ด้วยวิธี scratch





6. แสดงภาพตัวอย่างรูปแบบการใส่เซลล์และสารทดสอบในการศึกษาฤทธิ์การสมานแผล  
ด้วยวิธี Wound healing assay ด้วยวิธี culture insert 4 well

สารทดสอบ	Control	Conc.1	Conc.2	Conc.3
Bael leaf oil	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well
Limonene	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well
Trans-caryophyllene	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well	 2 x 10 <sup>5</sup> cells/well 8 x 10 <sup>5</sup> cells/4well

สารทดสอบ	Control	Conc.1	Conc.2	Conc.3
Bael leaf oil	 0.1%	 50 µg/ml	 25 µg /ml	 5 µg /ml
Limonene	 0.0004%	 0.2 µg /ml	 0.1 µg /ml	 0.02 µg /ml
Trans-caryophyllene	 0.016%	 8 µg /ml	 4 µg /ml	 0.8 µg /ml

## 7. วิธีเตรียมสารสำหรับศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

7.1 การเตรียม 70% ethanol 100 mL จาก 96% ethanol

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$96\% \times V_1 = 70\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 70\% \times 10 \text{ mL} / 96\%$$

$$= 73$$

ดังนั้นต้องใส่ 96% ethanol 73 mL แล้วเติมน้ำกลั่น 27 mL

7.2 การเตรียม 1.2% Agarose gel ปริมาตร 15 mL

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$100\% \times V_1 = 1.2\% \times 15 \text{ mL}$$

$$V_1 = (1.2\% \times 15 \text{ mL}) / 100\%$$

$$= 0.18 \text{ g}$$

ดังนั้นต้องชั่ง Agarose powder 0.18 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 15 mL

7.3 การเตรียม 1xTAE จาก Stock 50xTAE ปริมาตร 1000 mL

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$5X \times V_1 = 1X \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = (1X \times 1000 \text{ mL}) / 50X$$

$$= 20 \text{ mL}$$

ดังนั้นต้องใส่ 50xTAE 20 mL แล้วเติมน้ำกลั่น 980 mL

7.4 การเตรียม 100bp DNA ladder marker ปริมาตร 100  $\mu$ L

Stock 100bp DNA ladder marker	10 $\mu$ L
น้ำกลั่น	80 $\mu$ L
loading dye	10 $\mu$ L

7.5 การเตรียม primer 10  $\mu$ M จาก stock primer 100  $\mu$ M ปริมาตร 100  $\mu$ L

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$100 \mu\text{M} \times V_1 = 10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L}$$

$$V_1 = (10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L}) / 100 \mu\text{M}$$

$$= 10 \mu\text{L}$$

ดังนั้นต้องใช้ stock primer 10  $\mu$ L แล้วเติมน้ำกลั่น 90  $\mu$ L

7.6 ความเข้มข้น primer ที่ใช้ใน 20  $\mu$ L/ reaction

จาก primer 10  $\mu$ M ดึงไปใช้ 1  $\mu$ L

$$C_1V_1=C_2V_2$$

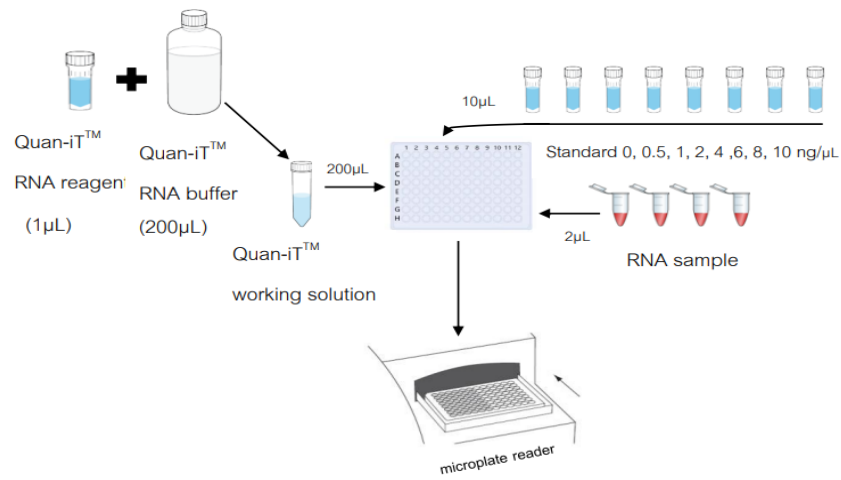
$$10 \mu\text{M} \times 1 \mu\text{L} = C_2 \times 20 \mu\text{L}$$

$$C_2 = (1 \mu\text{L} \times 10 \mu\text{M}) / 20 \mu\text{L}$$

$$= 0.5 \mu\text{M}$$

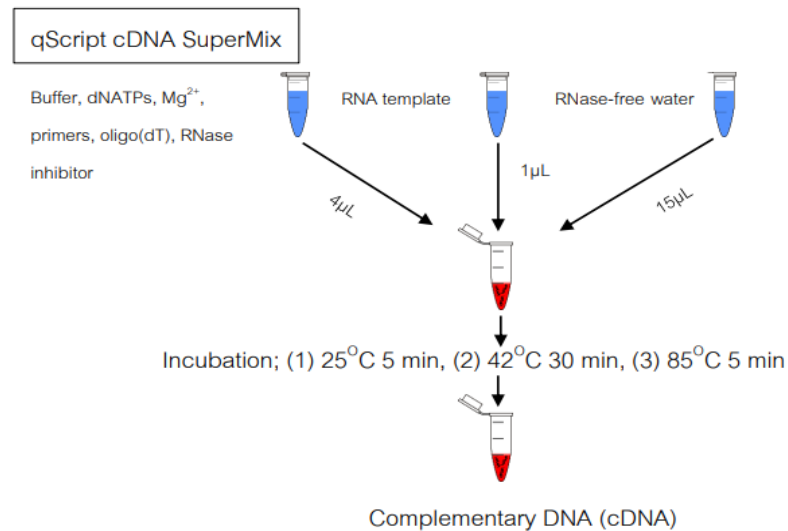
ดังนั้นความเข้มข้นของ primer ในปริมาตร 20  $\mu$ L เท่ากับ 0.5  $\mu$ M

### 7.7 แสดงส่วนประกอบในการเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ total RNA



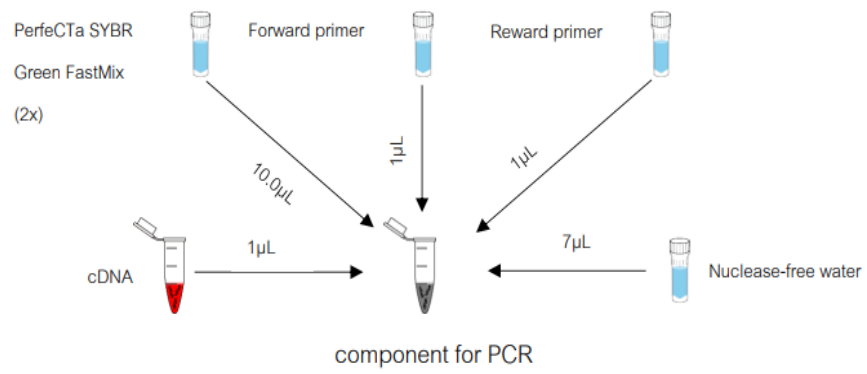
ที่มา : ดัดแปลงจาก Quant-iT<sup>™</sup> RNA assay kit protocol, Invitrogen ,USA

### 7.8 แสดงส่วนประกอบในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)



ที่มา : ดัดแปลงจาก qScript<sup>®</sup> cDNA SuperMix บริษัท Quantabio, USA

## 7.9 แสดงส่วนประกอบในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ



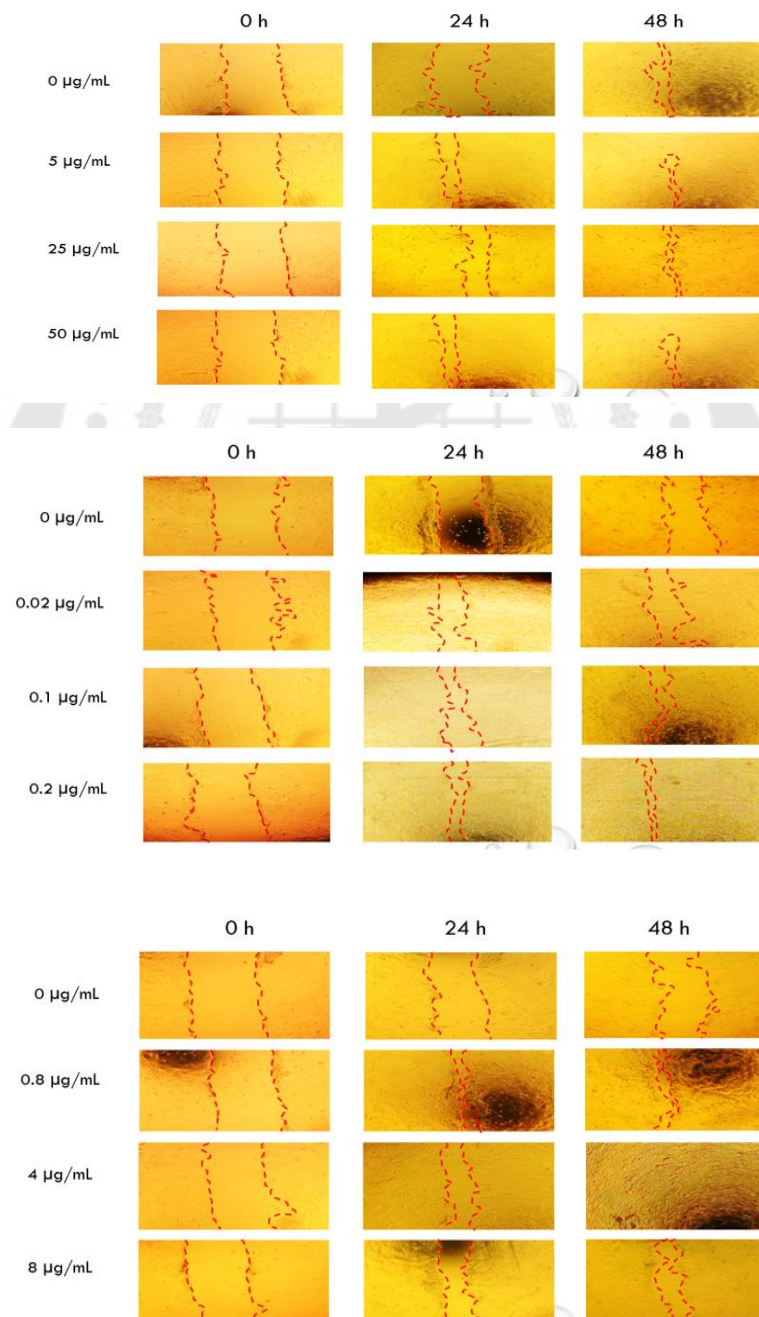
ที่มา : PerfeCTa SYBR Green FastMix บริษัท Quantabio, USA



## ภาคผนวก ข

## ข้อมูลการวิจัย

1. ภาพการปิดของบาดแผลจากการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลของน้ำมันหอยเหาะจากใบมะตูม สารลิโมนีน และสารทรานแคโรโอฟิลดินด้วยวิธี scratch assay



2. พื้นที่การปิดบาดแผลทดสอบวิธี scratch และ culture insert ที่ทดสอบด้วย น้ำมันหอมระเหย จากใบมะตูม สารลิโมนีนและ สารทรานแคโรโอฟิลลีน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ตาราง 14 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่เวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (µg/mL)	วิธี Scratch		วิธี Culture insert		Mean (*)	SD	P-value * <i>p</i> <0.05
	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3			
0	35.04790	43.16868	14.20989	53.82335	30.80882	14.93	
5	69.09578	84.43204	100	24.58049	84.50928	15.45	0.04*
25	60.05000	77.09877	100	8.441902	79.04960	20.04	0.06
50	48.44215	77.06311	100	69.98793	75.16842	25.83	0.08

ตาราง 15 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่เวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (µg/mL)	วิธี Scratch		วิธี Culture insert		Mean (*)	SD	P-value * <i>p</i> <0.05
	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3			
0	76.69700	89.63227	100	99.99718	88.77642	11.67	
5	93.34249	100	100	50.16589	97.78083	3.84	0.10
25	99.24297	99.09371	100	21.72391	99.44556	0.48	0.12
50	82.96070	100	100	73.82248	94.32023	9.83	0.10



ตาราง 16 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารลิโมเนนที่เวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	วิธี Scratch		วิธี Culture insert		Mean (*)	SD	P-value * $p < 0.05$
	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3			
0	35.76771	53.88678	96.44754	96.70267	62.03401	31.14	
0.02	44.79253	76.65922	98.42801	72.95960	73.29325	26.97	0.10
0.1	61.39617	77.14628	91.55694	98.88896	76.69980	15.08	0.13
0.2	58.91576	62.06612	91.03467	76.22274	70.67218	17.70	0.20

ตาราง 17 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารลิโมเนนที่เวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	วิธี Scratch		วิธี Culture insert		Mean (*)	SD	P-value * $p < 0.05$
	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3			
0	44.36762	95.44896	100	100	79.93886	30.88	
0.02	57.01601	100	100	99.55062	85.67200	24.81	0.13
0.1	85.16772	98.24305	100	100	94.47026	8.10	0.19
0.2	75.31890	100	100	100	91.77297	14.24	0.17

ตาราง 18 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารทรานแคโรโอฟิลลีนที่เวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	วิธี Scratch		วิธี Culture insert		Mean (*)	SD	P-value * $p < 0.05$
	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3			
0	42.97017	28.80171	58.56896	64.97059	43.44694	14.88	
0.8	68.34227	46.27351	64.34819	46.06624	59.65466	11.75	0.05
4	66.02153	69.61303	98.33556	74.29526	77.99004	17.71	0.01*
8	52.17845	96.19394	90.93613	77.64581	79.76951	24.03	0.08

ตาราง 19 ผลการวัดพื้นที่การปิดบาดแผลที่ทดสอบด้วยสารทรานแคโรโพลิซีนที่เวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	วิธี Scratch		วิธี Culture insert		Mean (*)	SD	P-value * $p < 0.05$
	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3			
0	52.06616	39.53719	84.84211	99.06302	58.81515	23.39	
0.8	83.05959	73.03008	95.88565	94.69676	83.99177	11.45	0.03*
4	85.60681	97.54364	100	100	94.38348	7.69	0.05
8	65.74088	100	100	100	88.58029	19.77	0.09

## 3. ผลการทดสอบสารต่อการเพิ่มชีวิตของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผลที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตาราง 20 ผลการทดสอบการเพิ่มชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	Bael leaf oil			Mean	SD	P-value * $p < 0.05$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0	100	100	100	100	0	
5	101.4085	117.5305	125.4090	114.7826	12.23	0.09
25	145.2465	106.7073	119.8875	123.9471	19.59	0.08
50	165.3609	95.8841	101.0225	120.7559	38.71	0.23

ตาราง 21 ผลการทดสอบการเพิ่มชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารลิโมนีน

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	Limonene			Mean	SD	P-value * $p < 0.05$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0	100	100	100	100	0	
0.02	102.1924	83.2839	111.2765	98.9176	14.28	0.45
0.1	89.0987	86.8387	101.3738	92.4371	7.82	0.12
0.2	107.9172	91.6208	99.1986	99.5789	8.15	0.47

ตาราง 22 ผลการทดสอบการเพิ่มชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารทรานแคโรไฟลลิน

ความเข้มข้น (µg/mL)	Trans-caryophyllene			Mean	SD	P-value *p<0.05
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0	100	100	100	100	0	
0.8	108.8793	99.3761	86.3256	98.1937	11.32	0.40
4	112.4955	107.9323	109.8541	110.0940	2.29	0.00*
8	123.3083	101.5152	112.3135	112.3790	10.90	0.09

4. ผล Cycle Threshold (Ct) จากการศึกษาการระดับการแสดงออกของยีนอะควอริน-3 ด้วยวิธี real time PCR และวิธีการคำนวณระดับการแสดงออกของยีน (relative expression)

ตาราง 23 ผล Cycle Threshold (Ct) ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่มีความเข้มข้น 5 µg/mL และกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร

Gene	Control		Mean	Bael leaf oil 5 µg/mL		Mean
		bael leaf oil				
GAPDH	17.45053	17.36684	17.40869	17.06164	16.89375	16.97770
AQP3	33.87977	33.54812	33.71395	30.72488	31.14347	30.93418
GAPDH	17.13772	-	17.13772	16.59779	-	16.59779
AQP3	33.63812	-	33.63812	31.55804	-	31.55804
GAPDH	17.23722	17.28136	17.25929	16.28449	16.00611	16.14530
AQP3	35.70056	34.27852	34.98954	32.56015	31.84115	32.20065

ตัวอย่าง การคำนวณระดับการแสดงออกของยีน (Relative expression) ตามสมการดังนี้

$$\Delta Ct (\text{treated}) = \text{treated gene of interest} - \text{treated housekeeping gene} \quad (1)$$

$$\Delta Ct (\text{control}) = \text{control gene of interest} - \text{control housekeeping gene} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated}) - \Delta Ct (\text{control}) \quad (3)$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

แทนค่าสมการ กลุ่มเซลล์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/mL}$

$$\Delta Ct (\text{treated}) = 30.93418 - 16.97770 = 13.95648$$

$$\Delta Ct (\text{control}) = 33.71395 - 17.40869 = 16.30526$$

$$\Delta\Delta Ct = 13.95648 - 16.30526 = -2.34878$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 5.09393$$

และกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร

$$\Delta Ct (\text{control}) = 33.71395 - 17.40869 = 16.30526$$

$$\Delta Ct (\text{control}) = 33.71395 - 17.40869 = 16.30526$$

$$\Delta\Delta Ct = 16.30526 - 16.30526 = 0$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$$

ตาราง 24 ผลการคำนวณระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูมที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/mL}$  และกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร

$\Delta Ct$ (treated)	$\Delta Ct$ (control)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Mean	Relative expression	$\pm SD$
13.95648	16.30526	-2.34878	5.09393			
	16.30526	0	1			
14.96025	16.50040	-1.54015	2.90825	3.73172	3.7	1.2
	16.50040	0	1			
16.05535	17.73025	-1.6749	3.19297			
	17.73025	0	1			

ตาราง 25 ผล Cycle Threshold (Ct) ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทรานแคริโอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$  และกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร

Gene	Control		Mean	Trans-caryophyllene 4 $\mu\text{g/mL}$		Mean
	trans-caryophyllene					
GAPDH	17.07877	17.03018	17.054475	16.56568	16.40537	16.48553
AQP3	32.31168	32.10602	32.20885	29.72044	29.62506	29.67275
GAPDH	16.18525	15.98682	16.08604	16.43958	16.28579	16.36269
AQP3	37.31560	34.04358	35.67959	34.85588	33.91941	34.38765
GAPDH	16.13674	16.04823	16.09249	15.23322	15.11621	15.17472
AQP3	32.06896	32.33722	32.20309	30.33157	30.08161	30.20659

ตาราง 26 ผลการคำนวณระดับการแสดงออกของยีนอะควาพอริน-3 ของกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารทรานแคริโอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$  และกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสาร

$\Delta\text{Ct}$ (treated)	$\Delta\text{Ct}$ (control)	$\Delta\Delta\text{Ct}$	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	Mean	Relative expression	$\pm\text{SD}$
13.18723	15.15438	-1.96715	3.90995			
	15.15438	0	1			
18.02496	19.59356	-1.56860	2.96616	2.99609	3.0	0.9
	19.59356	0	1			
15.03188	16.11061	-1.07873	2.11218			
	16.11061	0	1			

ประวัติผู้เขียน

