



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

ผลของสารสกัดจากบัวหลวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์

Effects of crude of *Nelumbo nucifera* on Mesenchymal stem cells proliferation

โดย

ศุภเดช โรงไฟศาล

โครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประเภทวิจัยประยุกต์
ประจำปีงบประมาณ 2555

ขอขอบคุณนักวิจัย ห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์ วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
ราชมงคลธัญบุรี

ขอขอบคุณอาจารย์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ที่ให้คำแนะนำในการสกัดสารจากเกสรบัวหลวง

ขอขอบคุณนักวิจัย หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด Greater Pharma Stem Cell For Life
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ กระทรวงวิทยาศาสตร์
ที่ให้การสนับสนุนเซลล์ต้นกำเนิดและห้องปฏิบัติการในการทดสอบเซลล์ต้นกำเนิด

ผู้วิจัย

27 กันยายน 2556

บทคัดย่อ

บัวหลวงเป็นพืชน้ำที่มีความสำคัญยิ่ง โดยถือว่าเป็นพืชน้ำที่มีความงามและประโยชน์มากมาย จากการศึกษาพบว่าส่วนต่างๆ ของบัวหลวงมีสารสำคัญทางยา โดยพบว่าส่วนของเกสรบัวมีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย และยังพบว่ามีความสัมพันธ์ช่วยในการหายของแผล ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการศึกษาว่าสารสกัดจากบัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเกสรบัวว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรือไม่ โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell เป็นตัวแทนของเซลล์ร่างกาย เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีหน้าที่สำคัญในการซ่อมแซม และทดแทนเซลล์ที่เสื่อมสภาพของร่างกาย ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงได้เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell จากสายสะดือ เนื่องจากพบว่าสายสะดือมีเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้อยู่เป็นจำนวนมาก มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell ที่ได้จากไขกระดูก และจากการสกัดสารจากเกสรบัวพบว่าสารสกัดเกสรบัวในสารละลาย Methanol และ Ethyl acetate มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้จึงใช้สารสกัดเกสรบัวในสารละลายดังกล่าวมาทำการทดลองนี้ เนื่องจากการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ต้องเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายที่เป็นน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก นำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin โดยใช้สารสกัดเกสรบัวในสารละลาย Methanol และ Ethyl acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.0001 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml และ 1 mg/ml ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^5 เซลล์/well ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5%CO₂ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell ในสารสกัดเกสรใน methanol ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 98.90 ± 7.08 % และพบว่าสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate ความเข้มข้น 0.0001 mg/ml มีการเจริญเติบโตได้ดีคือ 89.51 ± 12.73 % จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าสารสกัดจากเกสรบัวสามารถช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด Mesenchymal stem cell ซึ่งเป็นเซลล์ของร่างกายที่ใช้ในการซ่อมแซมและทดแทนเซลล์ที่เสื่อมสภาพได้ ดังนั้นผลการวิจัยในครั้งนี้จึงจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาสารสกัดจากเกสรบัวหลวงเพื่อใช้ในทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

Abstract

The *Nelumbo nucifera* are the aquatic plant which are significant extremely , which have the beauty and a lot of advantage. The previous study found that the part of the *Nelumbo nucifera* have phytonutrient for drug. The part of lotus pollen have a chemical for anti-bacteria and the wound healing. The study researches were study in lotus extract particularly from lotus pollen. The lotus pollen extract have an effect for cell proliferation. This study I use the mesenchymal stem cell (MSC) for experiment because the MSC were stem cell for rejuvenate. Thus we culture MSC from umbilical cord because MSC from umbilical cord as well as MSC from the bone marrow. The extraction of lotus pollen were extracted by Methanol solvent and Ethyl acetate. Those solvent were water soluble so that I lotus pollen extract for experiment because the culture of stem cell must feed in media that are water soluble. We add lotus pollen extract in Methanol , and , Ethyl acetate solution 0.0001 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml and 1 mg/ml with DMEM in 2mM L-glutamine 10% FBS 100 U/ml penicillin 100 mg/ml streptomycin at the density of the 1×10^5 cell /well 37°C 5%CO₂ in incubator. Mesenchymal stem cell in the lotus pollen extract in methanol at 1 mg/ml concentration have well differentiation 98.90- 7.08 % and the lotus pollen extract in Ethyl acetate 0.0001 mg/ml concentration have differentiation 89.51-12.73 %. This study suggest that the lotus pollen extract were help mesenchymal stem cell proliferation. Thus the result of this research will be useful for development the pharmacology for the lotus pollen extract in the near future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	38
บรรณานุกรม	40
ประวัติ	43

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงชนิดตัวทำละลาย	14
2. เปรียบเทียบการ colony formation ของ MSC ที่ได้จากไขกระดูกและสายสะดือ	32
3. แสดงการเจริญเติบโตของ mesenchymal stem cell ในสารสกัดบวชนิคต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน	37

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1.แสดงดอกและเกสรของบัวหลวง	2
2. แสดงเกสรบัวหลวง	11
3.แสดง Embryonic stem cell	17
4.แสดง Adult stem cell ที่ได้จากไขกระดูก	18
5. การเจริญเติบโตของเซลล์	20
6.แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตกับเวลา (Growth Kinetics)	21
7.แสดงขบวนการสกัดสารจากเกสรบัวหลวง	25
8.แสดงการสกัดสารจากเกสรบัว	26
9.แสดงขบวนการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell จากสายสะดือ	27
10.แสดงการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell โดยการย้อม Cell surface marker ที่จำเพาะ	28
11.แสดงวิธีการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ MSCs ในสารสกัดบัว	30
12.แสดงลักษณะของ MSCs สายสะดือที่เพาะเลี้ยงไว้ในวันที่ 3 (A) และ วันที่ 7 (B)	31
13.แผนภูมิเปรียบเทียบความสามารถในการเกิด colony ของ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูกและสายสะดือ	32
14.แสดงผลการตรวจหาลักษณะเฉพาะบนผิวเซลล์ของ UC-MSC (passage 2) ด้วยเครื่อง Flow cytometer	33
15.แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ด้วย Flow Cytometry	34
16.แสดงการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์กระดูก	35
17.แสดงการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์ไขมัน	35
18.แสดงเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell ในสารสกัดเกสรบัวในสารละลาย methanol (บัว-MeOH) และสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate (บัว-EtOAc)	37