

นิพนธ์ฉบับ

ผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการอยู่รอดและการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกจากไขกระดูกของมนุษย์

นฤพงศ์ ภูนิคม, ภาคภูมิ เขียวละม้าย, ศิริกุล มะโนจันทร์,
ชัยรัตน์ ตัณฑรวัฒน์พันธ์, ดวงรัตน์ ตันติกัลยาภรณ์

บทคัดย่อ

- บทนำ:** การลดลงของ Bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดภาวะกระดูกพร่องบางและภาวะกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ BM-MSCs ได้รับความสนใจศึกษาอย่างกว้างขวางในการฟื้นฟูและซ่อมแซมกระดูก แต่อย่างไรก็ตามศักยภาพของ BM-MSCs จะลดลงตามอายุของผู้บริจาค อีกทั้งปริมาณของ MSCs ที่แยกได้แต่ละครั้งได้จำนวนน้อย การหาวิธีเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากขึ้นจึงจะเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการรักษาทางด้านเวชศาสตร์ฟื้นฟูด้านกระดูก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะหาสารที่มีความปลอดภัยที่สามารถช่วยเพิ่มจำนวน BM-MSCs โดยศึกษาฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) ต่อการอยู่รอดและการแบ่งตัวของ BM-hMSCs
- วิธีการศึกษา:** การวิจัยนี้ใช้ BM-hMSCs ซึ่งแยกสกัดจากไขกระดูกจากอาสาสมัครชายและหญิงที่มีสุขภาพดี และมีการตรวจสอบคุณลักษณะของ BM-hMSCs ก่อนนำมาใช้ศึกษา โดย BM-hMSCs ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดกระตุ้นการเจริญเติบโต ทดสอบความเป็นพิษของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อเซลล์โดยบ่มสารแอนโดรกราโฟไลด์กับ BM-hMSCs ที่ความเข้มข้น 0.01 - 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี MTT assay ทดสอบผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแบ่งจำนวนของ BM-hMSCs โดยบ่มสารแอนโดรกราโฟไลด์กับ BM-hMSCs ที่ความเข้มข้น 0.01 - 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบด้วยวิธี BrdU assay
- ผลการศึกษา:** พบว่า BM-hMSCs ที่คัดแยกได้แสดงคุณสมบัติตรงตามข้อบ่งชี้ที่กำหนดโดย International Society for Cellular Therapy (ISCT) ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาต่อได้ ซึ่งภายหลังที่ BM-hMSCs ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 0.01 - 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง พบว่าสารที่ความเข้มข้น 0.01 - 10 ไมโครโมลาร์ ไม่มีความเป็นพิษต่อ BM-hMSCs ในการทดสอบผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ BM-hMSCs พบว่า สารที่ความเข้มข้น 0.01 - 10 ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มการแบ่งตัวของ BM-hMSCs ในช่วงเวลา 24 - 72 ชั่วโมง
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ BM-hMSCs จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีศักยภาพที่จะพัฒนาต่อไปเป็นสารทางเลือกใหม่ เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกหรือจากแหล่งอื่นได้ อันจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้สำหรับการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกในทางคลินิกต่อไป
- คำสำคัญ:** สารแอนโดรกราโฟไลด์, เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก, การอยู่รอดของเซลล์, การแบ่งตัวของเซลล์

วันที่รับบทความ: ๗ พฤศจิกายน ๒๕๖๐

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๓๐ มกราคม ๒๕๖๑

สาขาวิชาเซลล์ชีววิทยา สถานีวิจัยศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ที่ให้ติดต่อ: อาจารย์ ดร.ดวงรัตน์ ตันติกัลยาภรณ์ สาขาวิชาเซลล์ชีววิทยา สถานีวิจัยศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ๑๒๑๒๐ โทรศัพท์ ๐๒ - ๙๒๖ - ๙๘๐๖ อีเมล dkanlayaporn@gmail.com

บทนำ

ภาวะกระดูกโปร่งบาง (osteopenia) และภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ในผู้สูงอายุเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบได้ทุกประเทศ รวมถึงประเทศไทย ซึ่งถือว่าเป็นภาวะที่เกิดจากความเสื่อม ความรุนแรงของภาวะกระดูกโปร่งบาง และกระดูกพรุน ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อภาวะกระดูกหัก^๑ ซึ่งจะเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่ความพิการอื่นตามมาเป็นปัญหาและภาระต่อผู้ดูแล อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพกิจของประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องตระหนักถึงความสำคัญของโรคกระดูกพรุน โดยเฉพาะหาวิธีการป้องกันแก้ไข เพื่อลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นดังกล่าว ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนคือการลดลงของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีส่วนร่วมในการควบคุมการสร้างและการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast cell) และเซลล์สลายกระดูก (osteoclast cell) เมื่อระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงทำให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการสร้างและสลายกระดูก^๒ กล่าวคือ มีเซลล์ osteoblast น้อยลง ทำให้การสร้างกระดูกลดลง แต่ในทางตรงกันข้ามจะมีเซลล์ osteoclast จำนวนมากขึ้นและทำงานได้เพิ่มขึ้น อันนำไปสู่กระบวนการสลายกระดูกที่มากกว่าการสร้างกระดูก นอกจากนี้ปัจจุบันได้มีรายงานว่า การแบ่งตัวและการเจริญเติบโตที่ลดลงของ Human mesenchymal stem cells (hMSCs) เป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน^๓ เนื่องจากเซลล์ osteoblast พัฒนามาจาก MSCs ที่มีอยู่ใน bone marrow ภายใต้การกระตุ้นที่เหมาะสม เมื่อ MSCs ลดลงย่อมส่งผลโดยตรงให้สร้างเซลล์ osteoblast ลดลง ดังนั้นการลดลงของ BM-hMSCs จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดภาวะกระดูกโปร่งบาง (osteopenia) และภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ในผู้สูงอายุ (Age-related osteoporosis)^๔

การรักษาโรคพรุนในปัจจุบันประกอบด้วยสารที่อยู่ในกลุ่มยับยั้งการสลายของกระดูก (anti-resorptive) และกลุ่มที่กระตุ้นการสร้างกระดูก (anabolic) อย่างไรก็ตามการใช้สารเหล่านี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์^๕ ดังนั้นการมองหาทางเลือกอื่นเพื่อรักษา เช่น การบำบัดทดแทนด้วยเซลล์ผ่านการใช้ MSCs จึงกลายเป็นหนึ่งกลยุทธ์ที่สำคัญที่จะนำไปสู่การรักษาโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ (Human mesenchymal stem cells หรือ hMSCs) จัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด adult stem cells ที่พบในไขกระดูกร่วมกับ hema-

topoietic stem cells (HSCs) hMSCs มีจำนวนประมาณร้อยละ ๐.๐๐๑ - ๐.๑ ของจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียว (mononuclear cell) ทั้งหมด ในไขกระดูก^๖ เซลล์ hMSCs สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนภายนอกในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว และคงความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้หลายชนิด เช่น เซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์ไขมัน^๗ เซลล์ hMSCs มีลักษณะรูปร่างเรียวยาวคล้ายกระสวย (spindle shape) มีรูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะคือ CD73, CD90, และ CD105 แต่ไม่พบการแสดงออกของ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่พบบนผิวเซลล์เฉพาะในกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือด^{๘, ๙} ปัจจุบันการทำวิจัยและการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์ (embryonic stem cell) ยังมีข้อจำกัดอย่างมาก ทำให้เซลล์ MSCs ได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งเซลล์เนื้อเยื่อไขกระดูกเป็นแหล่งที่มาของเซลล์ MSCs (Bone marrow-derived MSCs, BM-MSCs) ที่ใช้กันมากที่สุดใหญ่ ดังนั้น BM-MSCs จึงได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางในการฟื้นฟูและซ่อมแซมกระดูก^{๑๐} แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการใช้ BM-MSCs คือ ศักยภาพของ MSCs จากไขกระดูกจะลดลงตามอายุของผู้บริจาค อีกทั้งปริมาณของ MSCs ที่ได้แต่ละครั้งได้จำนวนน้อย^{๑๑} ดังนั้นการหาวิธีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ BM-MSCs และเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากขึ้น เพื่อให้สามารถพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเพื่อประโยชน์ในการรักษาทางด้านเวชศาสตร์ฟื้นฟูด้านกระดูก (bone regenerative medicine) ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสนใจต่อการเพาะเลี้ยง BM-MSCs โดยมีวัตถุประสงค์หาสารที่มีความปลอดภัยที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ BM-MSCs

สารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) เป็นสารหลักจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees) เป็นสมุนไพรที่ได้รับความนิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลายในเอเชีย รวมทั้งประเทศไทย รายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีฤทธิ์เด่นในการยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory) ด้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) และเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน (immune-modulatory activity)^{๑๒-๑๔} แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ใดได้รายงานเกี่ยวกับผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อ BM-hMSCs มาก่อน ดังนั้นการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการอยู่รอดและการแบ่งตัวของ BM-hMSCs

วิธีการศึกษา

สารเคมี

สารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich, USA อาหารเลี้ยงเพาะเซลล์ (growth medium) ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (low glucose formula), Fetal bovine serum (FBS, US origin grade), L-glutamine, Penicillin-streptomycin ซื้อจากบริษัท Gibco BRL, USA Antibody สำหรับ flow cytometry analysis ประกอบด้วย CD34 (Biolegend, USA), CD45 (BD Pharmingen, USA), CD73 (BD Pharmingen, USA), CD90 (AbD Serotec, USA) และ CD105 (MiltenyiBiotec, Germany) สารอื่นๆ ได้แก่ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), DMSO, phosphate-buffered saline (PBS), Beta-glycerophosphate, L-ascorbic acid, dexamethasone, indomethacin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), human recombinant insulin, Oil red O, Alizarin red staining solution ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich, USA

กลุ่มตัวอย่าง

ระเบียบวิธีวิจัยในงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ ๑ (เลขที่ ๐๗๐/๒๕๖๐) โดยไขกระดูกได้รับบริจาคจากอาสาสมัครที่บริจาคไขกระดูก ณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยกลุ่มตัวอย่างเป็นอาสาสมัครเพศชายหรือหญิงที่ปราศจากปัญหาหรือโรคที่มีผลกระทบต่อการศึกษาวิจัย โดยกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดจะได้รับคำอธิบายรายละเอียดของโครงการวิจัยจากผู้วิจัยโดยละเอียดก่อนทำการลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (consent form)

คัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (BM-hMSCs)

ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน ๓ ราย โดยเนื้อเยื่อไขกระดูกจากอาสาสมัครแต่ละรายจะถูกนำมาคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยนำเนื้อเยื่อไขกระดูกปริมาณ ๑๐ มิลลิลิตร จากอาสาสมัครมาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน ๑ : ๑ และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของ mononuclear cells (MNCs) ด้วย Ficoll-Hypaque (Scientific Corporation, USA) ด้วยแรงหนีศูนย์กลางที่ 100 g ที่อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที หลังจากนั้นนำส่วนของ MNCs ที่แยกได้มาปั่นล้างด้วย PBS ด้วยแรงหนีศูนย์กลางที่ 100 g ที่อุณหภูมิ

๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที จำนวน ๒ ครั้ง ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด T25-Flask (Corning, USA) ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^5 cells/cm² ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM (low glucose), 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin-streptomycin และถูกบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ความชื้น 95% air และ 5% CO₂ โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก ๓ วัน สังเกตเซลล์และบันทึกภาพด้วยกล้อง inverted microscope (Nikon TS100, Japan) จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ ๙๐ - ๑๐๐ จึงทำการย่อยเซลล์เพื่อการขยายเพิ่มจำนวนหรือเก็บเซลล์ด้วย ๐.๐๕% trypsin-EDTA (Gibco BRL, USA) **ศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ ที่จำเพาะต่อ BM-hMSCs ด้วยวิธี flow cytometry**

นำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๖) จำนวน 1×10^4 เซลล์ มาติดฉลากด้วย mouse anti-human antibodies ๕ ชนิด (ชนิดละ ๕ ไมโครลิตร โดยไม่มีการเจือจางในตัวทำละลาย) คือ anti-CD34-PE, anti-CD45-FITC, anti-CD73-PE, anti-CD90-FITC และ anti-CD105-PE ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วย PBS ด้วยแรงหนีศูนย์กลางที่ 100 g ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที และนำเซลล์มาเติม 1% (w/v) paraformaldehyde ใน 1X PBS จำนวน ๕๐๐ ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์คงสภาพ และนำเซลล์มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACS caliber™ flow cytometer flow cytometer (Becton Dickinson, USA) โดยใช้โปรแกรม CellQuest™ software

การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน

นำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๖) จำนวน 1×10^4 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium) ประกอบด้วย DMEM (low glucose), 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin-streptomycin ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6-well plate (Corning Life Science, USA) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ความชื้น 95% air และ 5% CO₂ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ ๗๐ - ๘๐ จะถูกเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงชนิดที่มีสารกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ไขมัน (adipogenic differentiation medium) ซึ่งประกอบด้วย DMEM-High glucose, 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin-streptomycin, 10 µg/ml human recombinant insulin, dexamethasone (๑ ไมโครโมลาร์), indomethacin (๑ ไมโครโมลาร์) และ 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, ๕๐๐ ไมโครโมลาร์)

ซึ่งเซลล์ได้รับการเปลี่ยนอาหารทุก ๓ วัน ไปจนครบ ๒๑ วัน จากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วย PBS และ fix ด้วย 40% formalin เป็นเวลา ๑๐ นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน ๒ ครั้ง และนำไปย้อมด้วย 0.5% oil red O ที่ละลายใน 60% isopropanol เป็นเวลา ๒๐ นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน ๒ ครั้ง ก่อนนำเซลล์ที่ย้อมแล้วไปส่องใต้กล้อง inverted microscope เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ไขมันที่ถูกย้อมติดเป็นสีแดง โดยผลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์กระดูก

นำ BM-hMSCs (passage ที่ ๓ - ๖) จำนวน 1×10^4 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (growth medium) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ ชนิด 6-well plate ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ความชื้น 95% air และ 5% CO₂ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ ๙๐ - ๑๐๐ จะเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์กระดูก (osteogenic differentiation medium) ซึ่งประกอบด้วย DMEM (low glucose), 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% Penicillin-streptomycin, 50 µg/ml ascorbic acid, beta-glycerophosphate (๑๐ มิลลิโมลาร์) และ dexamethasone (๑๐๐ นาโนโมลาร์) โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๓ วัน เพาะเลี้ยงติดต่อกันเป็นระยะเวลา ๒๑ วัน จากนั้นนำเซลล์ไปวัดการเกิด matrix mineralization โดยล้างเซลล์ด้วย PBS และ fix ด้วย 40% formalin เป็นเวลา ๑๐ นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ๒ ครั้ง ก่อนนำไปย้อมด้วย Alizarin red staining solution โดยสีย้อมจะเข้าทำปฏิกิริยากับแคลเซียมทำให้เห็นการย้อมติดสีเป็นสีแดง ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเซลล์ Osteoblast สามารถทำงาน โดยสร้าง matrix เตรียมพร้อมสำหรับจับกับแคลเซียมเพื่อสร้างกระดูก โดยผลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ถูกบ่มเพาะเลี้ยงใน growth medium

ผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการอยู่รอดของ BM-hMSCs (cell viability) โดยวิธี MTT assay

ทำการทดสอบผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการอยู่รอดของ BM-hMSCs (cell viability) โดยเฉพาะเลี้ยง BM-hMSC จำนวน 5×10^3 เซลล์ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ growth medium ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 well plates โดยกลุ่มทดลองประกอบด้วย กลุ่มควบคุม (control, 0.05% DMSO), กลุ่มที่ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตั้งแต่ ๐.๐๑ - ๕๐ ไมโครโมลาร์ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ความชื้น 95% air และ 5% CO₂ เป็นเวลา ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง วัดค่าการอยู่รอด (cell viability) โดยวิธี MTT colorimetric assay^{๔๕} จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๕๗๐ นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Tek, USA) คำนวณค่าที่ได้เป็นร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม ค่าความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์จะนำไปทดสอบในการทดลองในลำดับต่อไป

ผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแบ่งตัวของ BM-hMSCs (cell proliferation) โดยวิธี BrdU assay

ทำการทดสอบผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแบ่งตัว (proliferation) ของ BM-hMSCs โดยเฉพาะเลี้ยง BM-hMSC จำนวน 1×10^4 เซลล์ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ growth medium ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 well plates โดยในกลุ่มทดลองประกอบด้วย กลุ่มควบคุม (control, 0.05% DMSO), กลุ่มที่ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ ๐.๐๑ - ๕๐ ไมโครโมลาร์ โดยบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ความชื้น 95% air และ 5% CO₂ เป็นเวลา ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง จากนั้นวัดการแบ่งจำนวนเซลล์หลังจากได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์เป็นเวลา ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง ด้วยวิธี BrdU Cell Proliferation Assay (Millipore, USA) จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๔๕๐ นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Tek, USA) คำนวณค่าเป็นร้อยละของการแบ่งเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

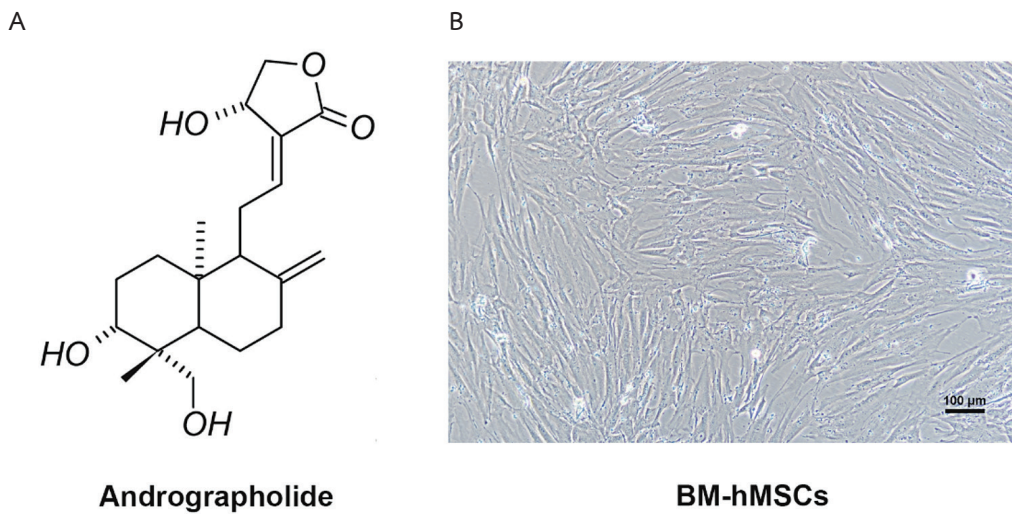
วิเคราะห์ผลทางสถิติ และการแปลผล

ทุกการทดลองจะทำซ้ำ ๓ ครั้ง และนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยข้อมูลแต่ละกลุ่มจะทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วย One-way ANOVA แล้วทำการตรวจสอบระดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มต่อไปด้วยระดับความเชื่อมั่นที่ ๙๕% ผลการวิจัยจะแสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM

ผลการศึกษา

ลักษณะของ BM-hMSCs และการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ BM-hMSCs

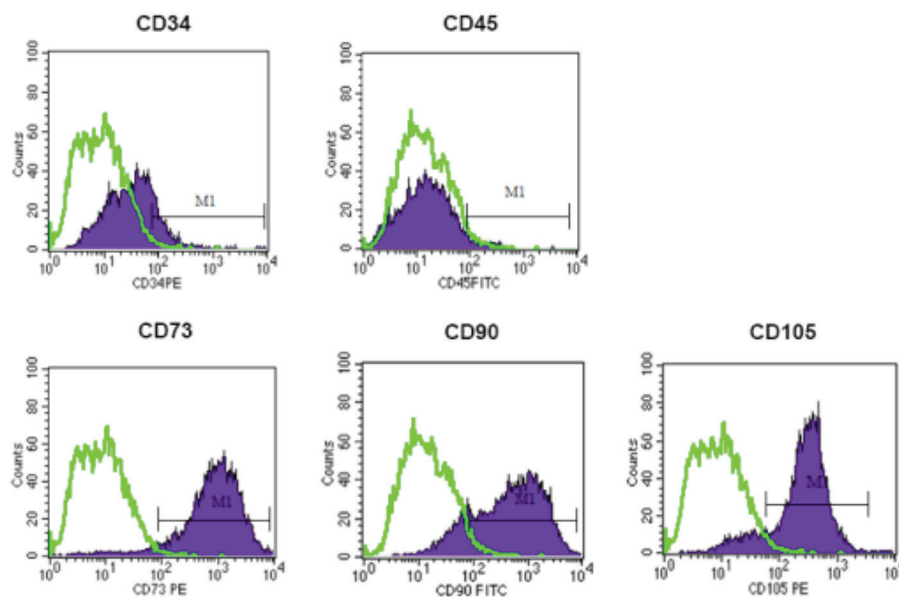
เซลล์ BM-hMSCs ที่คัดแยกได้มีรูปร่างเรียวยาว คล้ายกระสวย (spindle shape) คล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast-like cell) สามารถยึดเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงและสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้จนเต็มพื้นที่ (รูปที่ ๑B)



รูปที่ ๑ A แสดงโครงสร้างของสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) B แสดงลักษณะของเซลล์ BM-hMSCs

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ของ BM-hMSCs ด้วยวิธี flow cytometry พบว่า BM-hMSCs มีการแสดงออกแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs คือ CD73, CD90 และ CD105 แต่

ไม่พบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือด คือ CD34 และ CD45 (รูปที่ ๒) ซึ่งจากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเซลล์ที่แยกมาได้เป็น mesenchymal stem cells ไม่มี hematopoietic stem cells ปนร่วมด้วย



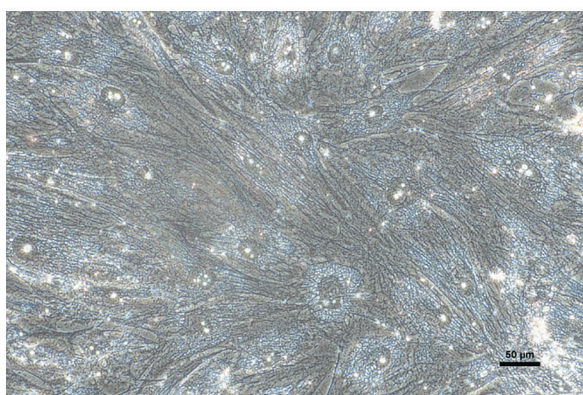
รูปที่ ๒ รูปแบบการแสดงออกของโมเลกุล CD34, CD45, CD73, CD90, และ CD105 บนผิวเซลล์ ของ BM-hMSCs

ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูก

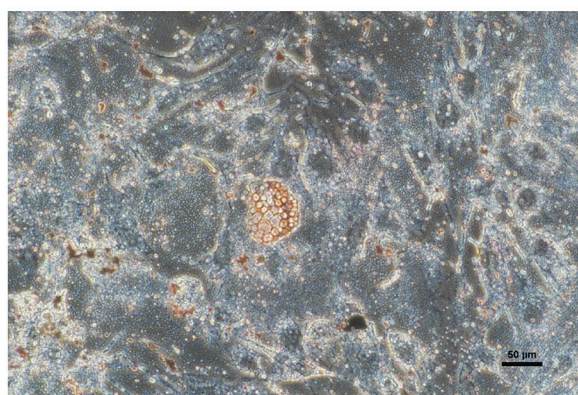
ในการศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน พบว่าเมื่อ BM-MSCs ถูกเพาะเลี้ยงใน adipogenic differentiation medium แล้ว BM-hMSCs สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ไขมัน โดยเซลล์ดังกล่าวมีการสร้าง lipid droplet ซึ่งย้อมติดสีแดงของ Oil Red O (รูปที่ ๓, ขวา) ส่วน BM-hMSCs

ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงใน growth medium นั้น พบว่ามีลักษณะเรียวยาวและไม่พบ lipid droplet ภายในเซลล์ รวมทั้งไม่ติดสีแดงของ Oil Red O (รูปที่ ๓, ซ้าย) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีปัจจัยกระตุ้นที่เหมาะสม BM-hMSCs สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของ MSC

Growth



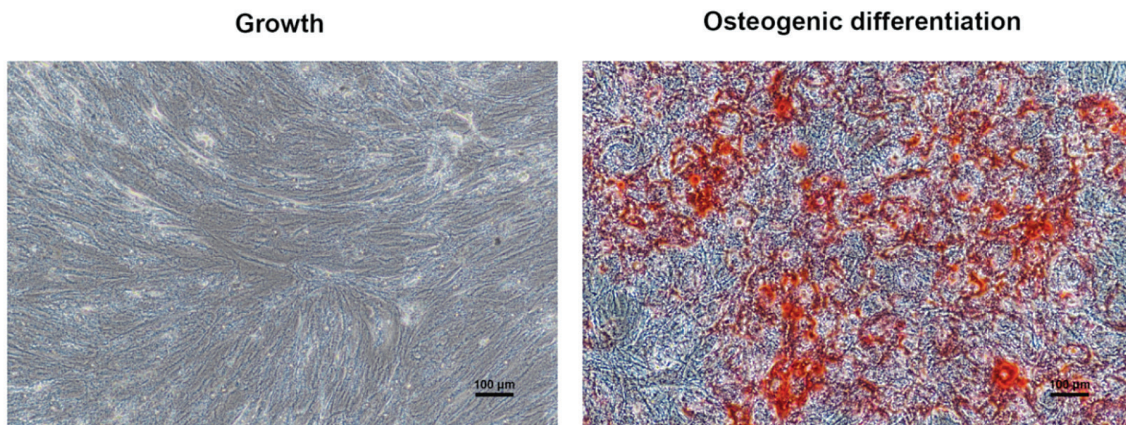
Adipogenic differentiation



รูปที่ ๓ ภาพถ่ายภายใต้กล้อง inverted microscope (20X) แสดงการติดสีของเซลล์ BM-hMSCs หลังจากย้อมด้วย Oil red O เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีสารกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipogenic differentiation medium, ขวา) เป็นเวลา ๒๑ วัน กับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (growth medium, ซ้าย)

จากการศึกษาคุณสมบัติความสามารถในการเจริญพัฒนาของ BM-hMSCs ไปเป็นเซลล์กระดูก พบว่า BM-MSCs ที่ถูกเพาะเลี้ยงใน osteogenic differentiation medium สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast cells) โดยเซลล์ดังกล่าวย้อมติดสีแดงของ Alizarin red Staining solution โดยที่สีย้อมจะเข้าทำปฏิกิริยากับแคลเซียมที่สะสมเป็นสีแดง ซึ่งบ่งบอกได้ว่าการทำงานของเซลล์ Osteoblast โดยสร้าง matrix เตรียมพร้อมสำหรับจับกับ

แคลเซียมเพื่อสร้างกระดูก (รูปที่ ๔, ขวา) ส่วน BM-hMSCs ในกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงใน growth medium นั้น พบว่าย้อมไม่ติดสีแดงของ Alizarin red Staining solution (รูปที่ ๔, ซ้าย) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีปัจจัยกระตุ้นที่เหมาะสมแล้ว BM-hMSCs สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของ MSC



รูปที่ ๔ ภาพถ่ายภายใต้กล้อง inverted microscope (10X) แสดงการติดสีของเซลล์ BM-hMSCs จากการย้อมด้วย Alizarin red staining solution เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีสารกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteogenic differentiation medium, ขาว) เป็นเวลา ๒๑ วัน กับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (growth medium, ขาว)

จากผลการศึกษาในด้านรูปร่าง ความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูก รวมถึงการแสดงออกของโมเลกุลที่จำเพาะบนผิวเซลล์ของ BM-hMSCs ซึ่งให้เห็นว่าผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์จากไขกระดูก (human bone marrow derive mesenchymal stem cells หรือ BM-hMSCs) ซึ่ง BM-hMSCs ที่คัดแยกได้นี้เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในลำดับต่อไป

ผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการอยู่รอด (cell viability) ของ BM-hMSCs

หลังจากบ่มสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ ๐.๐๑ - ๕๐ ไมโครโมลาร์ ใน growth medium กับ BM-hMSCs และทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของ

เซลล์ (cell viability) ที่ช่วงเวลา ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง โดยวิธี MTT colorimetric assay พบว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.05% DMSO) ค่าความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์ตั้งแต่ ๐.๐๑ - ๑๐ ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลทำให้ cell viability มีค่าลดลง ค่าความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่มากกว่า ๒๐ ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้ cell viability มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ร้อยละ ๕๐ (IC_{50}) ที่ ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง คือ > 50 ไมโครโมลาร์, 38.89 ± 3.88 ไมโครโมลาร์ และ 35.90 ± 3.45 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ตารางที่ ๑) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่มีผลลดจำนวนเซลล์ คือ ช่วง ๐.๐๑ - ๑๐ ไมโครโมลาร์ ไปทดสอบในการทดลองลำดับต่อไป

ตารางที่ ๑ แสดงผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ BM-hMSCs (cell viability) ที่เวลา ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง โดยแสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยค่าที่แสดงเป็นเฉลี่ย $\pm$ SEM จาก ๓ การทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สารแอนโดรกราโฟไลด์ (ไมโครโมลาร์)	การอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability)		
	๒๔ ชั่วโมง	๔๘ ชั่วโมง	๗๒ ชั่วโมง
๐.๐๑	๑๑๕.๑๓ $\pm$ ๒.๙๗	๑๑๗.๘๔ $\pm$ ๘.๔๑*	๑๑๙.๒๓ $\pm$ ๔.๖๐**
๐.๑	๑๓๔.๕๙ $\pm$ ๖.๔๑**	๑๒๒.๘๒ $\pm$ ๗.๔๑*	๑๒๐.๗๘ $\pm$ ๔.๕๙*
๑	๑๒๖.๔๑ $\pm$ ๒.๐๘**	๑๓๑.๒๔ $\pm$ ๖.๖๒**	๑๒๒.๖๐ $\pm$ ๑๑.๕๖**
๑๐	๑๒๐.๐๒ $\pm$ ๖.๖๐**	๑๑๗.๗๗ $\pm$ ๖.๖๗*	๙๑.๘๒ $\pm$ ๔.๕๓
๒๐	๘๘.๕๓ $\pm$ ๒.๕๗*	๘๖.๗๗ $\pm$ ๕.๓๗	๗๔.๐๙ $\pm$ ๓.๙๒*
๕๐	๔๔.๑๗ $\pm$ ๒.๓๔**	๔๐.๙๓ $\pm$ ๔.๐๑**	๒๘.๕๑ $\pm$ ๕.๔๙**
ค่า IC ₅₀ (ไมโครโมลาร์)	> ๕๐	๓๘.๘๙ $\pm$ ๓.๘๘	๓๕.๙๐ $\pm$ ๓.๔๕

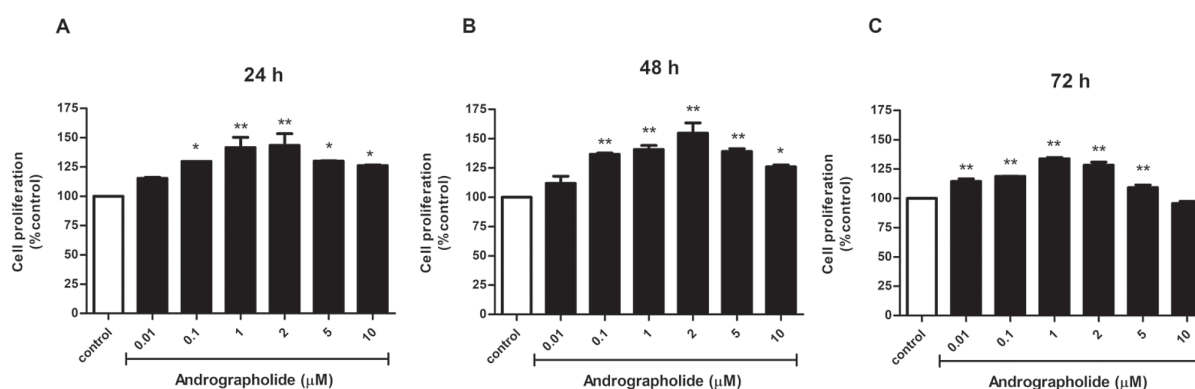
* หมายถึง มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < ๐.๐๕$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

** หมายถึง มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < ๐.๐๑$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแบ่งเซลล์ (proliferation) ของ BM-hMSCs

หลังจากบ่มเซลล์ BM-hMSCs ด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ ๐.๐๑ - ๑๐ ไมโครโมลาร์ ใน growth medium และทดสอบผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแบ่งเซลล์ (proliferation) ที่ช่วงเวลา ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง ด้วยวิธี BrdU assay พบว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.05%

DMSO) ที่ ๒๔ และ ๔๘ ชั่วโมง สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น ๐.๑ - ๑๐ ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ ของ BM-hMSCs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ ๕A และ ๕B) และที่ ๗๒ ชั่วโมงพบว่า สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น ๐.๐๑ - ๕ ไมโครโมลาร์ มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ ของ BM-hMSCs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ ๕C)



รูปที่ ๕ แสดงผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแบ่งเซลล์ (proliferation) ของ BM-hMSCs หลังจากได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง โดยคำนวณเป็นร้อยละของการแบ่งเซลล์และแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM จาก ๓ การทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

* หมายถึง มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < ๐.๐๕$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

** หมายถึง มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < ๐.๐๑$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ (Human mesenchymal stem cells หรือ hMSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด adult stem cells ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้รักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมหลายชนิด เนื่องจาก hMSCs มีศักยภาพในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะหลายชนิด เช่น เซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน^๖ ปัจจุบันการทำวิจัยและการใช้ hMSCs ได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะ BM-hMSCs ได้รับความสนใจศึกษาอย่างมากเกี่ยวกับการใช้ในการฟื้นฟูและซ่อมแซมกระดูก^{๑๐} แต่อย่างไรก็ตามการใช้ BM-MSCs ก็ยังมีข้อจำกัด คือ ศักยภาพในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกของ MSCs จากไขกระดูกจะลดลงตามอายุของผู้บริจาค อีกทั้งปริมาณของ MSCs ที่ได้แต่ละครั้งมีจำนวนน้อย^{๑๑} ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสนใจต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยง BM-MSCs โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะหาสารจากธรรมชาติที่ความปลอดภัยและมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวน BM-MSCs ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการอยู่รอดและการแบ่งตัวของ BM-hMSCs จากการศึกษา พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น ๐.๑ - ๑๐ ไมโครโมลาร์ ไม่มีความเป็นพิษต่อ BM-hMSCs และยังสามารถเพิ่มการแบ่งตัวของ BM-hMSCs ในช่วงเวลา ๒๔ - ๗๒ ชั่วโมง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเติบโตของเซลล์และจำนวนเซลล์ที่ลดลงของ MSC เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ (oxidant) และการเพิ่มขึ้นของ cytokines^{๑๒} และมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบภายในเซลล์^{๑๓, ๑๔} ดังนั้นผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่ทำให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลงและความสามารถในการเพิ่มการแบ่งตัวของ BM-hMSCs นั้น อาจสามารถอธิบายด้วยคุณสมบัติเด่นของสารของสารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งมีฤทธิ์เด่นในการยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant)^{๑๒ - ๑๔} รายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ลดการสร้าง pro-inflammatory mediators ได้หลายชนิด เช่น COX-2, iNOS and cytokines^{๑๕} ผ่านการยับยั้งกลไกที่สำคัญ เช่น NF-KB, AP-1, STAT3, NFAT^{๑๕, ๒๐} นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์กระดูกอ่อน (chondocyte) โดยการกระตุ้นกลไก Wnt/ β -catenin โดยสารแอนโดรกราโฟไลด์เพิ่มการแสดงออกของยีน Wnt4 และ β -catenin แต่ลดการแสดงออกของยีน GSK3 β , Wnt5a, และ Fzd2^{๒๑} แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังไม่ได้มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในเชิงลึกของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อ

BM-hMSCs การศึกษานี้เป็นข้อมูลแรกเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการเพิ่มจำนวนของ BM-hMSCs ส่วนการศึกษาถึงกลไกในเชิงลึกเพื่อให้สามารถอธิบายการออกฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ได้จึงจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ BM-hMSCs จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นสารทางเลือกใหม่สำหรับเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากไขกระดูกหรือจากแหล่งอื่นได้ อันจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้การรักษาโรคที่เกี่ยวกับกระดูกในทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๐ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” และทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (TRG-๕๗๘๐๐๕๕)

เอกสารอ้างอิง

1. Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 5(11):898-907.
2. Roux S, Orcel P. Bone loss: Factors that regulate osteoclast differentiation - an update. *Arthritis Research*. 2000;2(6):451-6.
3. Veronesi F, Torricelli P, Borsari V, Tschon M, Rimondini L, Fini M. Mesenchymal Stem Cells in the Aging and Osteoporotic Population. 2011;21(4):363-77.
4. Liu H, Xia X, Li B. Mesenchymal stem cell aging: Mechanisms and influences on skeletal and non-skeletal tissues. *Experimental Biology and Medicine*. 2015;240(8):1099-106.
5. Becker C. Pathophysiology and clinical manifestations of osteoporosis. *Clin Cornerstone*. 2008;9(2):42-7; discussion 8-50.
6. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *STEM CELLS*. 2001;19(3):180-92.

๗. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Reviews*. 20(3):161-71.
๘. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2004;8(3):301-16.
๙. Dominici M LBK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
๑๐. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, et al. Osteogenic Differentiation of Noncultured Immunoisolated Bone Marrow-Derived CD105+ Cells. *STEM CELLS*. 2006;24(7):1728-37.
๑๑. Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*. 2009;11(2):163-76.
๑๒. Abu-Ghefreh AaA, Canatan H, Ezeamuzie CI. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of andrographolide. *International Immunopharmacology*. 2009;9(3):131-8.
๑๓. Mittal SPK, Khole S, Jagadish N, Ghosh D, Gadgil V, Sinkar V, et al. Andrographolide protects liver cells from H₂O₂ induced cell death by upregulation of Nrf2/HO-1 mediated via adenosine A_{2a} receptor signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2016;1860(11, Part A):2377-90.
๑๔. Guan SP, Tee W, Ng DSW, Chan TK, Peh HY, Ho WE, et al. Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity. *British Journal of Pharmacology*. 2013;168(7):1707-18.
๑๕. Tantikanlayaporn D, Robinson LJ, Suksamrarn A, Piyachaturawat P, Blair HC. A diarylheptanoid phytoestrogen from *Curcuma comosa*, 1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-ol, accelerates human osteoblast proliferation and differentiation. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2013;20(0):676-82.
๑๖. Pacifici R. Editorial: Cytokines, Estrogen, and Postmenopausal Osteoporosis-The Second Decade. *Endocrinology*. 1998;139(6):2659-61.
๑๗. Raisz LG. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry*. 1999;45(8):1353-8.
๑๘. Rajagopal S, Kumar RA, Deevi DS, Satyanarayana C, Rajagopalan R. Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 2003;3(3):147-58.
๑๙. Li Y, He S, Tang J, Ding N, Chu X, Cheng L, et al. Andrographolide Inhibits Inflammatory Cytokines Secretion in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells through Suppression of NF-KB/MAPK Signaling Pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. 2017;2017:8248142.
๒๐. Sani D, Ramli N, Kirby B, Sumon S, Basri H, Stanslas J. Andrographolide downregulates pro-inflammatory cytokines and free radical productions to prevent dopaminergic neurodegeneration induced by lipopolysaccharide (1143.16). *The FASEB Journal*. 2014;28 (1 Supplement).
๒๑. Jiang T, Zhou B, Huang L, Wu H, Huang J, Liang T, et al. Andrographolide Exerts Pro-Osteogenic Effect by Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;36(6):2327-39.

Abstract

Effect of Andrographolide on cell viability and proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Naruphong Phunikom, Pakpoom Kheolamai, Sirikul Manochantr, Chairat Tantrawatpan,
Duangrat Tantikanlayaporn

Division of Cell Biology, Faculty of Medicine, Thammasat University

Corresponding author: Dr.Duangrat Tantikanlayaporn, Division of Cell Biology, Faculty of Medicine, Thammasat University
Praholyothin Road, Khlong Luang, Pathumthani 12120 Tel. 02 - 926 - 9806 E-mail: dkanlayaporn@gmail.com

Introduction: The reduction of Bone marrow-derived MSCs, BM-MSCs, is one factor that promotes osteopenia and osteoporosis in the elderly (Age-related osteoporosis). BM-MSCs have been extensively studied in bone reconstruction and rehabilitation. However, the potential of BM-MSCs is reduced by the donor's age. In addition, the amount of MSCs received was small. Finding ways to increase cell numbers of BM-MSCs to enable bone cell development is an interesting alternative to bone regenerative medicine. Therefore, this study is interested in searching safe agents that enhance the BM-MSCs number. We test the effect of Andrographolide, the major compound of *Andrographis paniculata* (Burm. F) Nees, which there was no report of its effect on BM-hMSCs.

Method: BM-hMSCs isolated from bone marrow of healthy male and women volunteers were used in this study. Characterizations of BM-hMSCs were examined before using. BM-hMSCs were cultured in a growth medium. The effect of Andrographolide on cell viability was performed by incubating BM-hMSCs with 0.01 - 50 μ M of Andrographolide for 24 - 72 hours. Cell viability was examined by MTT assay. The effect of Andrographolide on cell proliferation was further tested by incubating BM-hMSCs with 0.01 - 10 μ M of Andrographolide for 24 - 72 hours. Cell proliferation was determined by BrdU assay.

Result: The isolated BM-hMSCs demonstrated the characteristics of MSCs that can be used for further study. After incubation with Andrographolide at concentrations of 0.01 - 50 μ M for 24 - 72 hours, Andrographolide at 0.01 - 10 μ M had no toxic to BM-hMSCs. Therefore, these concentrations were used for further experiments. In proliferation study, Andrographolide at 0.01 - 10 μ M increased the BM-hMSCs after treatment for 24 - 72 h.

Discussion and conclusion: This study show for the first time on the proliferative effect of Andrographolide on BM-hMSCs. These results suggest that Andrographolide has the potential for further development as an alternative agent for increasing the number of stem cells that are isolated from bone marrow and/or other sources for using in therapeutic application of bone related diseases.

Key words: Andrographolide, Bone marrow-derived MSCs, Cell viability, Cell proliferation