Original Article (Thai Article)

pISSN, eISSN 0125-5614
M Dent J 2017; 37 (1) : 113-122

Cytotoxicity and Biomineralized Nodule Formation Induced by *Tinospora crispa* Crude Extract in Human Bone Cells

Tatchaporn Nasingkan[1], Prapan Suppakpatana[1], Pakkarada Phusudsawang[2], Wanida Sripairojthikoon[1]

[1] *Department of Anatomy, Faculty of Dentisty, Mahidol University*
[2] *Omnoi Municipality, Kratumban, Samutsakorn.*

Objective: To determine the properties of *Tinospora crispa* crude extract on the cell toxicity and biomineralized nodule formation in human bone cells in vitro.

Materials and Methods: To test the cytotoxicity of *Tinospora crispa* crude extract, human bone cells were cultured in 96-well plates and divided into 3 separated groups including 1)the control in alpha-MEM, 2) the control in media plus dimethyl sulfoxide, and 3) the experimental group in media supplemented with different concentrations of *Tinospora crispa*. Cells were treated for 24 hours before investigating the cell viability by MTT assay.

To examine the induction of biomineralized nodule formation of *Tinospora crispa* crude extract, human bone cells were cultured in 24-well plates and divided into 3 groups as follows; 1) the negative control cultured in alpha-MEM, 2) the positive control cultured in media plus beta-glycerophosphate and ascorbic acid, 3) the experimental group cultured in media plus *Tinospora crispa* extract. Cells were treated for 5 weeks before examining by Alizarin Red S staining to observe the orange-red positive stain of biomineralized nodules.

Results: MTT assay showed that human bone cells cultured in *Tinospora crispa* crude extract with the concentration less than 0.35% (w/v) survived more than 80%. After cells were treated with the *Tinospora crispa* crude extract for 5 weeks cells were induced to generate biominerlized nodules. Cells in both positive control and *Tinospora crispa* treated groups were able to form the nodules which were positively stained for Alizarin Red S.

Conclusion: *Tinospora crispa* crude extract which is less than 0.25% (w/v) is non-toxic to human bone cells. The extract at 0.025% (w/v) can enhance the human bone cells to form biomineralized nodules.

Keywords: *Tinospora crispa*, cytotoxicity, cultured human bone cells, biomineralized nodules, Alizarin Red S, MTT assay

How to cite: Nasingkan T, Suppakpatana P, Phusudsawang P, Sripairojthikoon W. Cytotoxicity and biomineralized nodule formation induced by tinospora crispa crude extract in human bone cells. M Dent J 2017; 37: 113-122.

Correspondence author: Prapan Suppakpatana, Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Mahidol University, 6 Yothi Road, Rajthevi Bangkok 10400 Thailand
Tel: 02-200-7801-2 e-mail: prapan.sup@mahidol.ac.th
Received : 16 September 2016 Accepted : 28 February 2017

Original Article (Thai Article)
pISSN, eISSN 0125-5614
M Dent J 2017; 37 (1) : 113-122

ความเป็นพิษและการเหนี่ยวนำเซลล์กระดูกสร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพของสารสกัดบอระเพ็ดในเซลล์กระดูกมนุษย์

ทัชชภร นาสิงคาร[1], ประพันธ์ ศุภภัคพัฒนา[1], ภัครดา ภู่สุดแสวง[2], วนิดา ศรีไพโรจน์ธิกูล[1]

[1] *ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*

[2] *เทศบาลนครอ้อมน้อย อ.กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร*

วัตถุประสงค์: เพื่อทดสอบสารสกัดหยาบบอระเพ็ดต่อการรอดชีวิตและการเหนี่ยวนำให้เซลล์กระดูกมนุษย์สร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา: ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบบอระเพ็ดต่อเซลล์ วิเคราะห์โดยเลี้ยงเซลล์กระดูกมนุษย์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดแอลฟาเอ็มอีเอ็ม แบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมปกติ กลุ่มควบคุมที่เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดหยาบบอระเพ็ดความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที

ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เซลล์กระดูกสร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพ โดยเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม แบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมเชิงลบ กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่มีบีต้ากลีเซอโรฟอสเฟตและกรดแอสคอร์บิก และกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดหยาบบอระเพ็ด เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แล้วย้อมเซลล์ด้วยอะลิซารีนเรดเอส เพื่อตรวจดูการติดสีส้มแดงของก้อนแร่สะสมชีวภาพ

ผลการศึกษา: ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบบอระเพ็ดด้วยวิธีเอ็มทีที พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์มีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ในสารสกัดหยาบบอระเพ็ดที่เข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 0.35 โดยมวลต่อปริมาตร

เมื่อทดสอบเป็นเวลา 5 สัปดาห์และย้อมด้วยอะลิซารีนเรดเอส พบว่าสารสกัดหยาบบอระเพ็ดสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์สร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพได้ บริเวณที่เซลล์รวมตัวเป็นก้อนหรือปุ่มในกลุ่มควบคุมเชิงบวกและในกลุ่มที่มีสารสกัดบอระเพ็ดจะติดสีแดงของอะลิซารีนเรดเอส

บทสรุป: ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบบอระเพ็ดที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 0.25 โดยมวลต่อปริมาตร ไม่มีอันตรายต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 โดยมวลต่อปริมาตรสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์สร้างก้อนแร่สะสมได้

รหัสคำ: บอระเพ็ด, ทดสอบความเป็นพิษ, เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์, ก้อนแร่สะสมทางชีวภาพ, อะลิซารีนเรดเอส, วิธีเอ็มทีที

การอ้างอิง: Nasingkan T, Suppakpatana P, Phusudsawang P, Sripairojthikoon W. Cytotoxicity and biomineralized nodule formation induced by tinospora crispa crude extract in human bone cells. M Dent J 2017; 37: 113-122.

บทนำ

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคติดเชื้อที่ก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรัง และการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue) โดยมีสาเหตุทั้งจากพิษของจุลชีพ (microbial toxin) และจากการตอบสนองของร่างกาย (host defense mechanism) ส่งผลให้สูญเสียฟันในที่สุด [1,2] ดังนั้นโรคปริทันต์จึงเป็นหนึ่งในปัญหาทางทันตสุขภาพที่สำคัญของประเทศไทย [3]

การรักษาโรคปริทันต์ในปัจจุบัน อาศัยการขูดหินน้ำลาย (scaling) และการเกลารากฟัน (root planning) เพื่อกำจัดสาเหตุของโรค ร่วมกับการให้ความรู้ในการรักษาสุขอนามัยช่องปากในเบื้องต้นและมุ่งหวังให้เกิด

Correspondence author: Prapan Suppakpatana, Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Mahidol University, 6 Yothi Road, Rajthevi Bangkok 10400 Thailand
Tel: 02-200-7801-2 e-mail: prapan.sup@mahidol.ac.th
Received : 16 กันยายน 2559 Accepted : 28 กุมภาพันธ์ 2560

การคืนสภาพ (regeneration) ของเนื้อเยื่อปริทันต์ขึ้นใหม่ แต่การศึกษาทางคลินิกพบว่าการคืนสภาพของเอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันนั้น เกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อยหรือไม่เกิดขึ้นเลย [4,5] จึงมีการพัฒนาการรักษาที่ซับซ้อนขึ้นโดยอาศัยศัลยกรรมปริทันต์ (periodontal surgery) ร่วมกับการชักนำให้เนื้อเยื่อคืนสภาพ (guided tissue regeneration) หรือ ร่วมกับวัสดุปลูกถ่ายกระดูก (bone graft materials) ซึ่งแม้จะก่อให้เกิดการคืนสภาพมากขึ้น แต่ก็ยังเกิดได้ไม่สมบูรณ์ รวมทั้งการรักษามีขั้นตอนยุ่งยากและราคาแพง [6-8] จึงได้มุ่งหาเทคโนโลยีใหม่ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอ็นยึดติดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันขึ้นใหม่ มาประยุกต์ใช้ร่วมกับงานศัลยกรรมปริทันต์ของกระดูกเบ้าฟัน การค้นหาสารที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดการคืนสภาพของเนื้อเยื่อปริทันต์จึงเป็นเรื่องสำคัญและได้รับความสนใจศึกษาเป็นอย่างมาก เพื่อช่วยแก้ไขปัญหาในผู้ป่วยโรคปริทันต์

บอระเพ็ดเป็นพืชในวงศ์ Menispermaceae มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Tinospora Crispa* (L.) Hook f. & Thompson หรือ *Tinospora rumphii Boerl* หรือ *Tinospora tuberculate Beaumee* เป็นไม้เลื้อยที่รู้จักกันทั่วไปในประเทศไทยและหลายพื้นที่ในทวีปเอเชีย ใช้ได้ทั้งราก เถา และ ใบ ในการประกอบอาหารและเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน ช่วยต้านการอักเสบ ลดอาการปวด ช่วยขับพยาธิ มีสรรพคุณระงับความร้อนลดไข้ ช่วยเจริญอาหาร รักษาโรคเบาหวานและโรครูมาตอยด์ [9-11] ยังพบว่ากลุ่มชุมชนชาวเย้า (Yao communities) ในประเทศจีน ใช้บอระเพ็ดในการรักษากระดูกหักด้วย [12] สรรพคุณพื้นบ้านของบอระเพ็ดหลายประการดังกล่าว ยังได้รับการยืนยันประสิทธิภาพทางเภสัชวิทยาและทางคลินิก [13] เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ปรับระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory effect) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) รักษาโรคมาลาเรียและสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาประสิทธิภาพของบอระเพ็ดต่อการสร้างและซ่อมแซมกระดูก

แม้บอระเพ็ดมีประโยชน์หลายประการ แต่อาจก่ออันตรายได้ มีรายงานอาการปวดใต้ชายโครง (hypochondriac pain) ด้านขวาร่วมกับการทำงานผิดปกติของตับหลังจากรับประทานบอระเพ็ด [14] และบอระเพ็ดยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์สายพันธุ์ 3ที3 (3T3 fibroblast cell line) [15] การนำบอระเพ็ดมาใช้เพื่อการรักษาจึงต้องระมัดระวังความเป็นพิษของมันต่อเซลล์ร่างกาย เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาและป้องกันโอกาสเกิดผลข้างเคียงให้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานความเป็นพิษของบอระเพ็ดต่อเซลล์กระดูก ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากบอระเพ็ดต่อเซลล์กระดูก รวมถึงการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้เซลล์กระดูกเกิดการสร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพ

วัสดุและการศึกษาการวิจัย

1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากกระดูก

การศึกษานี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยมหิดล ตามหนังสือรับรอง เลขที่ MU2007-087 โดยนำชิ้นส่วนกระดูกจากผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีอายุไม่เกิน 23 ปี (เข้ารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) มาวางเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (complete medium) ชนิดแอลฟาเอ็มอีเอ็ม (α-MEM culture medium, Gibco™, USA) ที่ผสมกับฟีทัลโบวันซีรัม (fetal bovine serum, HyClone®, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 10, เพนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิตร และสเตรปโตมัยซิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (penicillin and streptomycin, Gibco™, USA) ในตู้ปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นร้อยละ 95 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนในวันรุ่งขึ้นเพื่อล้างเอาเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงออก และเปลี่ยน

อาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน การทดลองนี้จะทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกรุ่นที่ 4-8 (4th-8th passage)

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากบอระเพ็ด

สารสกัดหยาบจากบอระเพ็ดถูกเตรียมโดยวิธีสกัดมาตรฐานด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เถาของบอระเพ็ดถูกนำมาล้างให้สะอาด หั่นและปั่นให้ละเอียด ในเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 80 (80% ethyl alcohol) หมักไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองด้วยผ้าก็อซและสำลี จากนั้นกรองอีกครั้งผ่านกระดาษกรอง (Whatman filter paper No.1, Whatman®, England) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำของเหลวใสเหนือตะกอน (supernatant) ไปผ่านเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator Buchi R-200/S, Switzerland) เพื่อระเหยแอลกอฮอล์ จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องสกัดน้ำออกจากเซลล์ (lyophylizer, Labconco®, LYPH-LOCK-6,USA) และเก็บในขวดปราศจากความชื้น เมื่อจะทำการทดลองนำผงสารสกัดหยาบจากบอระเพ็ดไปละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองปราศจากเชื้อ (syringe filter, Sartorius, Germany) ขนาด 0.2-0.4 ไมโครเมตร

3. การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที

หว่านเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96 culture plate, Cellstar®, Germany) ที่ความหนาแน่น $1.5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่เติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO, Merck, Germany) ความเข้มข้นร้อยละ 1 และกลุ่มทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดหยาบบอระเพ็ดความเข้มข้นร้อยละ 0.60, 0.55, 0.50, 0.45, 0.40, 0.35, 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.1 และ 0.05 โดยมวลต่อปริมาตร และเติมสารละลายเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 1 เพื่อละลายสารสกัดในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและใส่สารละลายเอ็มทีที (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) ที่ความเข้มข้น 0.05 โดยมวลต่อปริมาตร นำเข้าตู้ปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffered saline, PBS) 1 รอบ แล้วเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, CERES UV 900 HDi, Germany) ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยความสัมพันธ์ตามสมการ ดังนี้ ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) = (T-BL/C-BL) x 100 เมื่อ T คือ ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ใส่สารทดสอบหรือกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่เติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์, C คือ ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ, BL คือ ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่ม blank ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ปราศจากเซลล์

แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหยาบบอระเพ็ดจะทดสอบกับเซลล์จำนวน 4 หลุม และการทดลองจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งเป็นอิสระต่อกัน

4. การเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์สร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพ

หว่านเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม หลุมละ $5x10^3$ เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดอัลฟาเอ็มอีเอ็ม ที่ผสมกับฟีทัลโบวีนซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10, เพนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นร้อยละ

95 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมบีต้ากลีเซอโรฟอสเฟต (β-glycerophosphate) 10 มิลลิโมลาร์ และกรดแอสคอร์บิก 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มทดลองเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดหยาบบอระเพ็ดความเข้มข้นร้อยละ 0.025 โดยมวลต่อปริมาตร เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน และเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 5 ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ ตรึงเซลล์ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่น 5 นาที ย้อมเซลล์ด้วยอะลิซาลีนเรดเอส (Alizarin Red S, SIGMA®, Switzerland) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาตรวจดูการติดสีส้มแดงของก้อนแร่สะสมชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ถ่ายภาพกลุ่มเซลล์และก้อนแร่สะสมชีวภาพ

ผลการศึกษา

1. การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบบอระเพ็ดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีเอ็มทีทีเมื่อเทียบให้เซลล์กลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100 พบว่าในกลุ่มควบคุมที่เติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ร้อยละ 1 มีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์ในสารสกัดหยาบบอระเพ็ดที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 0.35 โดยมวลต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 แสดงไว้ในรูปที่ 1 (Figure 1.)

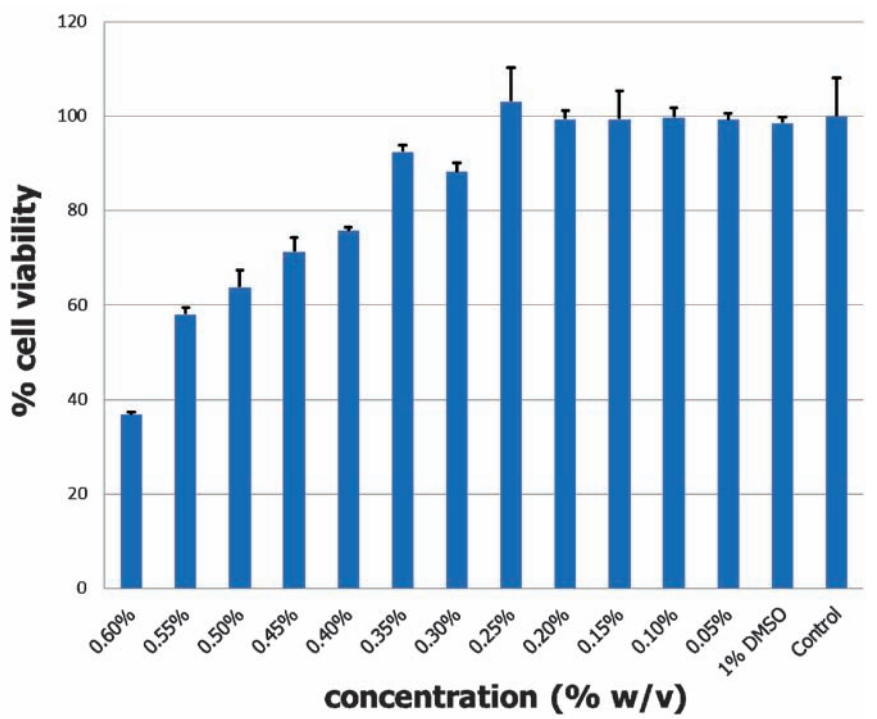

Figure. 1 The graph demonstrated the cell viability of human bone cells treated with different concentrations (w/v) of *Tinospora crispa* using MTT assay. The cell viability in the control group was represented as 100 percent. (1% DMSO Which is complete medium plus 1% DMSO is also used as the control group.) The % cell viability were represented as mean ± SD. Different concentrations of *Tinospora crispa* tested with cells and controlled cells was as n = 4 in each group. Three experiments were independently repeated.

2. การเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์สร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพ

หลังหว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์และเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่างๆ กันใน 1 วัน พบเซลล์สามารถเกาะติดกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ดี และมีรูปร่างเป็นกระสวย (รูปที่ 2A-2C) (Figure 2A-2C.)

ในสัปดาห์ที่ 3 (รูปที่ 2D-2F) (Figure 2D-2F.) เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์เจริญดี และเพิ่มจำนวนตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยยังคงมีรูปร่างเป็นกระสวย กลุ่มทดลองที่มีสารสกัดหยาบบอระเพ็ดพบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นมีการเรียงตัวในทิศทางเดียวกันและเริ่มรวมกลุ่มกันแต่เห็นไม่ชัดเจน (รูปที่ 2F) (Figure 2F.) ในกลุ่มควบคุมทั้งสองเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) ในทิศทางเดียวกันโดยไม่รวมเป็นกลุ่ม (รูปที่ 2D และ 2E) (Figure 2D and 2E.)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 5 และย้อมด้วยอะลิซารีนเรดเอส (รูปที่ 2G- 2I) (Figure 2G- 2I.) พบว่าเซลล์ในกลุ่มทดลองที่มีสารสกัดหยาบบอระเพ็ดจะรวมกันเป็นกลุ่มเซลล์ มีลักษณะคล้ายปุ่ม (nodule) กระจายอยู่ทั่วไปในหลุมเลี้ยงเซลล์ ลักษณะกลุ่มเซลล์ดังกล่าวนี้มีขนาดใหญ่ขึ้นและเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 2I) (Figure 2I.) กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่มีบีต้ากลีเซอโรฟอสเฟตและกรดแอสคอร์บิกในอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเริ่มรวมกลุ่มกัน (รูปที่ 2H) (Figure 2H.) โดยบริเวณที่กลุ่มเซลล์มีการรวมตัวขึ้นเป็นก้อนหรือปุ่มนั้นติดสีแดงของอะลิซารีนเรดเอสทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมเชิงบวก ในกลุ่มควบคุมเชิงลบเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเรียงตัวเป็นชั้นเดียวในทิศทางเดียวกันโดยเริ่มรวมเป็นกลุ่มแต่ไม่พบการติดสีอะลิซารีนเรดเอสในกลุ่มนี้ (รูปที่ 2G) (Figure 2G.)

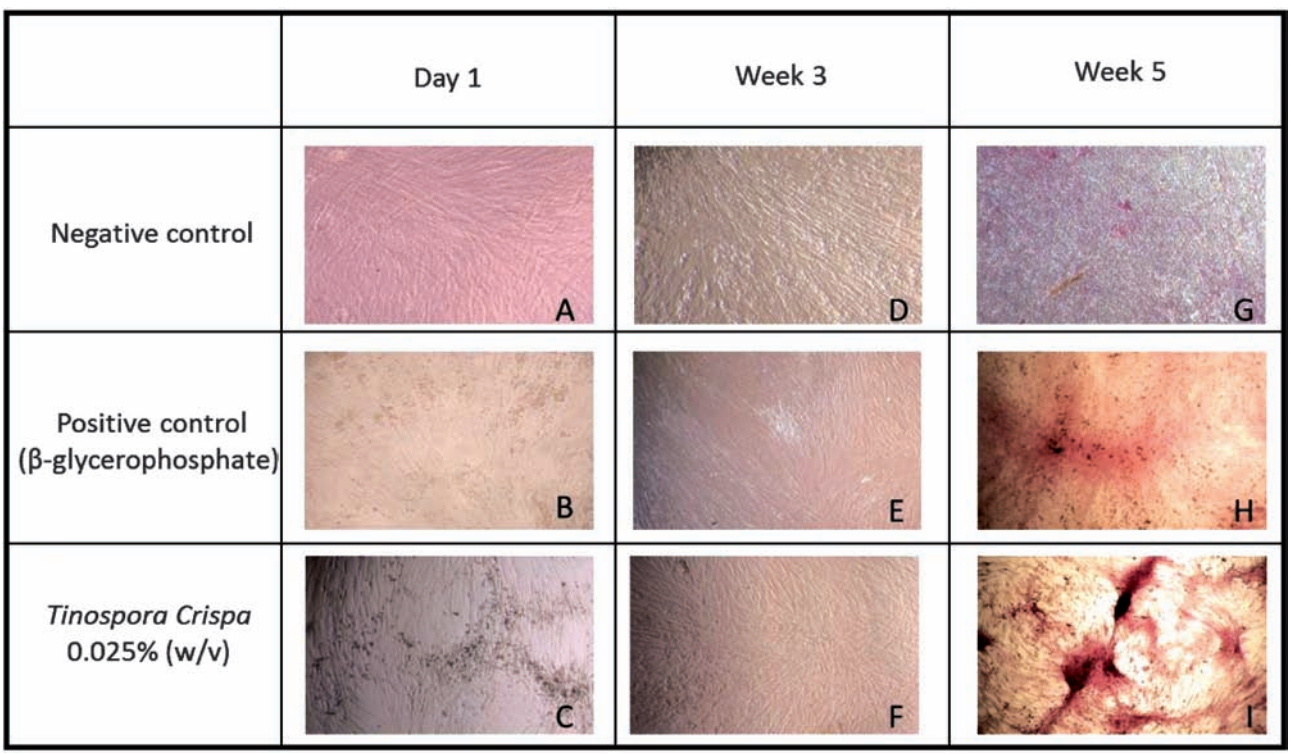

Figure. 2 Photographs showed the morphology of human bone cells at day 1 (2A-C, 20X magnification), week 3 (2D-F, 20X magnification) and week 5 (2G,10X magnification, 2H-I, 4X magnification). The cells are exposed to the complete medium (2A, 2D, 2G), β-glycerophosphate + 50 µg/ml ascorbic acid (2B, 2E, 2H), and the extract *Tinospora crispa* at concentrations of 0.025% (w/v) (2C, 2F, 2I). Mineralization detection was performed by Alizarin Red S Staining (2G, 2H, 2I).

วิจารณ์

การวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังได้รับสารพิษสามารถทำได้หลายวิธี การศึกษานี้เลือกใช้วิธีเอ็มทีที ซึ่งมีความสะดวกรวดเร็วและสามารถวัดได้ครั้งละหลายกลุ่มตัวอย่าง [16] วิธีเอ็มทีทีเป็นวิธีการวัดเซลล์รอดชีวิตด้วยการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายโดยอาศัยเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) หรือสารเอ็มทีทีซึ่งเป็นสารสีเหลืองอ่อน สารนี้จะวัดการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase enzyme) ในไมโตรคอนเดรีย [17,18] โดยเมื่อใส่สารเอ็มทีทีลงในหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะเกิดผลึกฟอร์มาซาน สีน้ำเงินเข้มซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่างสารเอ็มทีทีและเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโตคอนเดรีย [19] โดยที่ปริมาณผลึกฟอร์มาซานนี้จะมากหรือน้อยขึ้นกับระดับการเผาผลาญพลังงานของเซลล์ [17] จากนั้นละลายผลึกฟอร์มาซานด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่มีสีจึงไม่รบกวนการวัดค่าดูดกลืนแสง ได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ซึ่งค่าที่วัดได้จะนำไปแปรผลเป็นปริมาณเซลล์สัมพัทธ์ต่อไป [16,18]

การวัดเซลล์รอดชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีทีจึงเป็นวิธีพื้นฐานที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อทดสอบระดับความเป็นพิษ [20] เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก สารที่ใช้ไม่มีผลต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสง ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีผลต่อสารเอ็มทีที สามารถแสดงปริมาณเซลล์ได้ชัดเจนแม้จะมีปริมาณเซลล์น้อย สีของสารละลายสีน้ำเงินเข้มคงอยู่ได้ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ณ อุณหภูมิห้อง สามารถวัดเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่รอดชีวิตได้ทุกชนิดแม้ในระยะพักของการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยว่า วิธีเอ็มทีทีนี้ให้ผลการวัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตได้เทียบเท่ากับการวัดด้วยสารกัมมันตรังสี จึงช่วยลดการใช้สารกัมมันตรังสี และลดการรับสารกัมมันตรังสีของผู้วิจัยด้วย [16]

อย่างไรก็ตามวิธีเอ็มทีทียังมีข้อจำกัดบางประการ เช่นสามารถวัดปริมาณเซลล์รอดชีวิตแต่ไม่สามารถบอกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ไม่สามารถวัดปริมาณเซลล์ที่ตาย และเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งไม่มีไมโตรคอนเดรียได้ [16] รวมทั้งความจำเพาะ (specificity) ของสารเอ็มทีทียังขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเซลล์ ความเข้มข้นของสารเอ็มทีที และระยะเวลาที่ใช้ในการก่อผลึกฟอร์มาซาน [21] นอกจากนี้สารละลายสีน้ำเงินเข้มที่ได้ยังมีความคงตัวในระยะสั้น [16] ดังนั้น ถ้าช่วงเวลาที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงไม่เหมาะสมก็อาจจะทำให้ข้อมูลมีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นได้

บอระเพ็ดที่สกัดอย่างหยาบด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ไม่สามารถละลายได้สมบูรณ์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงได้ใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ช่วยในการทำละลาย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์บางชนิด [22] ดังนั้นเพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง การศึกษานี้จึงได้เพิ่มกลุ่มควมคุมอีกกลุ่มที่มีสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ร้อยละ 1 ซึ่งเป็นความเข้มข้นมากกว่าที่ใช้สำหรับละลายสารสกัดหยาบบอระเพ็ดในอาหารเลี้ยงเซลล์ และผลการศึกษาพบว่าสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ร้อยละ 1 นี้ไม่ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกที่พบในครั้งนี้เป็นผลจากสารสกัดไม่ใช่จากสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์

ผลการศึกษาการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบบอระเพ็ดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดบอระเพ็ดที่น้อยกว่าร้อยละ 0.35 โดยมวลต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 และที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 0.25 โดยมวลต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายบอระเพ็ดที่น้อยกว่า

ร้อยละ 0.25 โดยมวลต่อปริมาตรเป็นความเข้มข้นของสารสกัดบอระเพ็ดที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูก

สำหรับความเป็นพิษทั่วกาย (systemic toxicology) ของบอระเพ็ด มีรายงานว่าการให้สารสกัดบอระเพ็ดทางปากขนาด 4.0 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แก่หนูถีบจักรเป็นเวลา 7 วัน ไม่พบอาการแสดงของความเป็นพิษใดๆ [23] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหนูถีบจักรพันธุ์เยนเกน เดนเกน โตเกียว (Yenken Denken Tokyo) โดยวิธีการป้อนทางปากด้วยสารสกัดบอระเพ็ด 10 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ประมาณร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร) และการฉีดสารสกัดบอระเพ็ด 10 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเข้าใต้ผิวหนังและเฝ้าสังเกตอย่างใกล้ชิดเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าหนูไม่แสดงอาการเป็นพิษแต่อย่างใด [24] แสดงให้เห็นว่าสารสกัดบอระเพ็ดไม่ก่อความเป็นพิษเฉียบพลัน แต่จากรายงานการให้สารสกัดบอระเพ็ดในระดับความเข้มข้น 0.02, 0.16 และ 1.28 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (Wistar rat) เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดบอระเพ็ดความเข้มข้น 0.02 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวันไม่แสดงอาการเป็นพิษใด ๆ แต่หนูขาวที่ได้รับสารสกัดบอระเพ็ดความเข้มข้น 0.16 และ 1.28 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน มีระดับครีเอตินีน (creatinine) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงว่าอาจมีความผิดปกติในการทำงานของไต และหนูขาวที่ได้รับสารสกัดบอระเพ็ดในระดับความเข้มข้น 1.28 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน กินอาหารน้อยลงจนน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งระดับคลอเรสเตอรอล (cholesterol) ระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) และแอสพาเตต อะมิโนทรานเฟอเรส (aspatate aminotransferase) เพิ่มสูงขึ้น ขณะที่ระดับกลูโคส (glucose) ในเลือดต่ำลง และการศึกษาทางพยาธิวิทยา พบว่าในหนูทดลองเพศผู้มีอุบัติการณ์ที่จะเกิดการเพิ่มทวีของเซลล์ในท่อน้ำดี (bile duct proliferation) และภาวะเซลล์ตับเพิ่มขึ้นมากอย่างผิดปกติ (focal liver hyperplasia) [24] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสารสกัดบอระเพ็ดมีสารที่เป็นพิษต่อตับ (hepatotoxins) อยู่ [25] ผลจากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดบอระเพ็ดสามารถก่อความเป็นพิษเรื้อรังเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน จึงควรพิจารณาประกอบในการนำมาใช้ในการรักษาระยะยาว

ดังนั้นควรเลือกใช้บอระเพ็ดที่ความเข้มข้นต่ำเพื่อป้องกันการเกิดพิษต่อร่างกายทั้งระดับเซลล์และทั่วกาย การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกเกิดการสร้างก้อนแร่สะสมชีวภาพ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของบอระเพ็ดร้อยละ 0.025 ซึ่งต่ำกว่าค่าความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ไม่ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.25) ประมาณ 10 เท่า และผลการทดลองพบว่าบอระเพ็ดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูก แบ่งตัวเพิ่มจำนวน รวมกันเป็นกลุ่มลักษณะคล้ายปุ่มและย้อมติดสีแดงของอะลิซารีนเรดเอส คล้ายคลึงกับผลในกลุ่มควบคุมเชิงบวกในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึง 5

การย้อมติดสีแดงของอะลิซารีนเรดเอส ยืนยันว่ากลุ่มเซลล์ที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับนั้นมีการสะสมแร่ในเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) คล้ายคลึงกับการสะสมแร่ในการสร้างกระดูก โดยกลไกของการย้อมนี้เกิดจากโซเดียมอลิซารีนซัลโฟเนท (sodium alizarin sulfonate) ทำปฏิกิริยาคีเลชัน (chelation) กับแคลเซียมในกลุ่มเซลล์ที่มีการสะสมแร่ [26] ทำให้กลุ่มเซลล์ย้อมติดสีแดงทั้งในกลุ่มทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารสกัดบอระเพ็ด และกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยบีต้ากลีเซอโรฟอสเฟตและกรดแอสคอร์บิก

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างก้อนแร่สะสมของชิงช้าชาลี (*Tinospora cordifolia*) [27] ซึ่งเป็นพืชที่มีสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับบอระเพ็ด และมักใช้ทดแทนกันในตำรับยาอายุรเวท หรือตำรับสมุนไพรพื้นบ้านอื่น [28] จึงสนับสนุนว่า บอระเพ็ดน่าจะช่วยส่งเสริมเซลล์

เพาะเลี้ยงจากกระดูกในการสร้างก้อนแร่สะสมได้ และสอดคล้องกับการนำบอระเพ็ดมาเป็นสมุนไพรช่วยรักษากระดูกหักในบางชุมชน [12] อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเหนี่ยวนำการสร้างก้อนแร่สะสมของสารสกัดบอระเพ็ดได้ รวมทั้งการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงคุณสมบัติของสารสกัดหยาบบอระเพ็ดต่อแนวโน้มเพื่อการสร้างและซ่อมแซมกระดูก จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึกต่อไปเพื่อพัฒนาการนำบอระเพ็ด มาใช้ประโยชน์ในทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้น สารสกัดหยาบบอระเพ็ดที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 0.35 โดยมวลต่อปริมาตร ไม่มีอันตรายต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกมนุษย์ โดยมีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 และไม่พบการตายของเซลล์ในสารสกัดหยาบของบอระเพ็ดที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 0.25 โดยมวลต่อปริมาตร นอกจากนี้ สารสกัดหยาบบอระเพ็ดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 โดยมวลต่อปริมาตรสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูก สร้างก้อนแร่สะสมได้

กิติกรรมประกาศ

ขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับทุนสนับสนุนวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทวีพงศ์ อารยะพิศิษฐ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ขจรเกียรติ เจนบดินทร์ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลืองานวิจัย

Funding: None

Competing interests: None

Ethical approval: None

References

1. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidermiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:132-58.
2. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Peridontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809-20.
3. กองทันตสาธารณสุข, กรมอนามัย, กระทรวงสาธารณสุข. รายงานผลสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2543-2544. ประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์บริษัทสามเจริญพาณิชย์ (กรุงเทพ) จำกัด; 2545.
4. Rosenberg E, Rose LF. Biologic and clinical consideration for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *Dent Clin North Am* 1998;42:467-90.
5. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontal* 2000,1999;19: 40-58.
6. Jepsen S, Eberhard J, Herrera D, Needleman I. A systematic review of guide tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guide tissue regeneration compare with surgical debridement in the treatment of furcation defect? *J Clin Peridontol* 2002;29:103-16.
7. Raynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 38:227-65.
8. Murphy KG, Gunsolley JC. Guide tissue regeneration for treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Peridontol* 2003;8:266-302.
9. นันทวัน บุณยะประภัศร. บอระเพ็ด. จุลสารข้อมูลสมุนไพร. 2540;15:6-8.
10. Kongsaktrakoon B, Temsiririrkkul R, Suvitayavat W, Nakormchai S, Wongkrajang Y. The antipyretic effects of *Tinospora crispa* Mier ex Hook F. & Thoms. *Mahidol J Pharm Sci* 1994;27:1-6.
11. Dweck A C, Cavin J P. Andawali (*Tinospora crispa*): a review. *Pers Care Mag*. 2006;7:33–39.
12. Li S, Long C, Liu F, Lee S, Guo Q, Li R, Liu Y. Herbs for medicinal baths among the traditional Yao communities of China. *J Ethnopharmacol*. 2006;108: 59–67.

13. Ahmad W, Jantan I, Bukhari SN. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson: A Review of Its Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Aspects. Front Pharmacol. 2016;7:59. doi: 10.3389/fphar.2016.00059.
14. Langrand J, Regnault H, Cachet X, Bouzidi C, Villa AF, Serfaty L, Garnier R, Michel S. Toxic hepatitis induced by a herbal medicine: *Tinospora crispa*. ***Phytomedicine***. 2014;21:1120-23.
15. Ibahim M, I'zzah WNW, Narimah A, Asyikin NZ, Shafinas S-NS, Froemming G. Anti-proliperative and antioxidant effects of *Tinospora crispa* (Batawali). ***Biomed Res***. 2011;22:57–62
16. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assay. ***J Immunol Methods***. 1983;65:55-63.
17. Freshney RI. Culture of animal cell, a manual of basic technique. 5th ed. New Jersey: John Wiley& Sons,INC;2005:1-9.
18. Freshney RI. Basic principles of cell culture. In: Vunjak-Novakovic G, Freshney RI, editors. Culture of cells for tissue engineering. New Jersey: John Wiley &Sons,INC;2006:4-9
19. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. A sample *in vitro* cytoxity test using the MTT (3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: Analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A). ***Jpn J Pharmacol***. 1990;52:95-100.
20. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, *et al*. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. ***Cancer Res*** 1988; 48:589-601.
21. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. ***Cancer Res*** 1991;51:2515-20.
22. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. ***Biol Pharm Bull***. 2002;25:1600-03.
23. Chavalittumrong P, Attawish A, Chuthaputti A, Chuntapet P. Toxicological study of crude extract of *Tinospora crispa* Mier ex Hook F. &Thoms. ***Thai J Pharm Sci*** 1997;21:199-210.
24. มงคล โมกขะสมิต, กมล สวัสดีมงคล, ประยุทธ สาตราวาหะ. การศึกษาพิษของสมุนไพรไทย. ว กรมวิทย พ 2513 ;12:36-66.
25. Kadir FA, Othman F, Abdulla MA, Hussan F, Hassandarvish P. Effect of *Tinospora crispa* on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. ***Indian J Pharmacol***. 2011;43:64-68.
26. Humason G. Animal Tissue Technique 3rd ed. San Francisco: WH Freeman and Company; 1972.
27. Abiramasundari G, Sumalatha KR, Sreepriya M. Effects of *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae) on the proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of osteoblast model systems *in vitro*. ***J Ethnopharmacol***. 2012;141:474-80.
28. นิจศิริ เรืองรังษี, พยอม ตันวิวัฒน์. พืชสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์;2534:21-22.