Original Article (Thai Article)

pISSN, eISSN 0125-5614
M Dent J 2017; 37 (1) : 123-134

Effect of schizophyllan on proliferation and migration of human gingival fibroblast

Supaporn Mala[1], Anucha Sacharoen[2], Rudee Surarit[3]

[1] *B.Sc. (Animal Sciences and Agricultural Technology) Research Office, Faculty of Dentistry, Mahidol University*

[2] *B.Sc. (Microbiology) Research Office, Faculty of Dentistry, Mahidol University*

[3] *Ph.D (Oral Biology) Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Mahidol University*

Objective: The purpose of this study was to investigate the effect of schizophyllan on cytotoxicity proliferation and migration of human gingival fibroblast (HGF).

Materials and methods: For cytotoxicity assay : HGF were plated in 96 well-plate with 2×10^4 cells/ml and cultured in DMEM solution containing 10% FBS and antibiotics/antimycotics; treated with schizophyllan at final concentration 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg/ml and incubated for 24 hours in CO_2 incubator at 5% CO_2, 100% humidity. Cell viability was evaluated using MTT assay.

For cell proliferation assay : HGF were inoculated in 96-well plate with 1×10^5 cells/ml for 24 h. Afterward schizophyllan at final concentration of 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg/ml were added and cultured for 13 days under same condition as described above. The media were routinely changed every 2 days. Numbers of viable cells were determined using MTT assay.

For cell migration assay : HGF at concentration of 1×10^5 cells/well were seeded into for 24 well plate and grown for 24 hours in DMEM containing 10% FBS and antibiotics/antimycotics. Cell were scratched by using 1,000 ul steriled pipette tip. The schizophyllan (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg/ml) was added and further incubated under same condition for 24 hours. After 24 hours cells were stained with toluidine blue O and left dried overnight. The migrated cells were counted by using Image Pro Plus program (version 7).

Result: The result suggested that shizophyllan had no toxicity in all concentrations tested. The cell proliferation assay showed that when cells were treated with 10.0 mg/ml schizophyllan, the amount of cell proliferation was 5.7×10^4 cell/well which is higher than control (5.0×10^4 cell/well). There were significant differences when comparing the amount of cell proliferation between schizophyllan at the concentration of 10 mg/ml with the control. The cell migration assay showed that schizophyllan at 5.0 and 10.0 mg/ml can promote the migration of cells into wounded area. The mean of migrated cell was 167, 204 cells/Sq mm respectively. There were significant differences in the mean of migrated cells between the concentration at 5.0 and 10.0 mg/ml with the control

Conclusion: Schizophyllan up to 10 mg/ml has no cytotoxicity to HGF and can promote cell proliferation. Schizophyllan at 5 and 10 mg/ml can induce the migration of cell into the wounded area. This study may be useful for the development of some drugs to promote wound healing in the oral cavity.

Key words: Schizophyllan, Human Gingival Fibroblast, Cell cytotoxicity, Cell proliferation, Cell migration, MTT assay

How to cite: Mala S, Sacharoen A, Surarit R. Effect of schizophyllan on proliferation and migration of human gingival fibroblast. M Dent J 2017; 37: 123-134.

Corresponding author: Anucha Sacharoen, Research Office, Faculty of Dentistry, Mahidol University, 6 Yothi Street, Ratchathewi, Bangkok 10400 Thailand.
Tel: 02-200-7628 Mobile phone: 08-5932-5979 Fax: 02-200-7622 E-mail: anucha.sac@mahidol.ac.th
Received : 20 October 2016 Accepted : 16 January 2017

Original Article (Thai Article)
pISSN, eISSN 0125-5614
M Dent J 2017; 37 (1) : 123-134

ผลของชิโซไฟแลนต่อการเจริญและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

ชื่อผู้แต่งภาษาไทย

ที่ทำงานภาษาไทย

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของสารชิโซไฟแลนต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ การกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์

วิธีการ: การประเมินความเป็นพิษของสารชิโซไฟแลนต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ใส่เซลล์ลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 2×10^4 เซลล์ บ่มในตู้ควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารชิโซไฟแลนความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ นำเซลล์ใส่ลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 1×10^5 เซลล์ หลังจากใส่สารทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 วัน ประเมินผลการทดสอบโดยวิธี MTT สำหรับการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ นำเซลล์ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม หลุมละ 1×10^5 เซลล์ บ่มตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกรีดแผ่นเซลล์ให้เกิดช่องว่างด้วยทิปพลาสติกขนาด 1,000 ไมโครลิตรที่ปราศจากเชื้อ แล้วจึงใส่สารทดสอบแล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมสีด้วยโทลูอิดีนบลูทิ้งไว้ให้แห้ง นับจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ด้วยโปรแกรมอิมเมจโปรพลัส รุ่น 7.0 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มอย่างเดียว

ผลการทดลอง: สารชิโซไฟแลนในทุกความเข้มข้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เมื่อศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์พบว่า ในวันที่ 7 ของการทดสอบ สารชิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือมีจำนวนของเซลล์เท่ากับ 5.7×10^4 เซลล์ ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารชิโซไฟแลนมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5.0×10^4 เซลล์ สำหรับการศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์พบว่าสารชิโซไฟแลนสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ต่อตารางมิลลิเมตรเท่ากับ 167 และ 204 เซลล์ ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารชิโซไฟแลนมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ต่อตารางมิลลิเมตรเท่ากับ 120 เซลล์

สรุปผลการทดลอง: สารชิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์และมีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และที่ความเข้มข้น 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์หรือการสมานแผล (wound healing) การศึกษาในครั้งนี้อาจมีประโยชน์ในการพัฒนาใช้เบต้ากลูแคนชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์รักษาแผลในช่องปากต่อไปในอนาคต

รหัสคำ: ชิโซไฟแลน, เซลล์สร้างใยเหงือก, การทดสอบหาความมีชีวิตของเซลล์, การแบ่งตัวและการเพิ่มจำนวนของเซลล์, การเคลื่อนที่ของเซลล์

การอ้างอิง: Mala S, Sacharoen A, Surarit R. Effect of schizophyllan on proliferation and migration of human gingival fibroblast. M Dent J 2017; 37: 123-134.

Corresponding author: Anucha Sacharoen, Research Office, Faculty of Dentistry, Mahidol University, 6 Yothi Street, Ratchathewi, Bangkok 10400 Thailand.
Tel: 02-200-7628 Mobile phone: 08-5932-5979 Fax: 02-200-7622 E-mail: anucha.sac@mahidol.ac.th
Received : 20 ตุลาคม 2016 Accepted : 16 มกราคม 2017

บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาทางปริทันตวิทยาได้มุ่งเน้นไปสู่การหาวิธีการและวัสดุที่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์หรือทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ของอวัยวะปริทันต์เพื่อให้เกิดการงอกใหม่ ได้แก่ การใช้กระดูกจากบุคคลอื่น (allograft) วัสดุสังเคราะห์ (alloplastic material) และการใช้แผ่นเยื่อกั้นขวาง (membrane or barrier) เช่น คอลลาเจน และเจลาติน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์และโพลิแซคคาไรด์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เนื่องจากวัสดุที่ได้จากเนื้อเยื่อมนุษย์ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (antigenicity) หรือมีโอกาสติดเชื้อได้ ดังนั้น สารในกลุ่มโพลิเมอร์หรือโพลิแซคคาไรด์จากธรรมชาติจึงมีความเหมาะสมกว่าในการนำมาใช้ปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ [1]

กระบวนการสมานแผลเป็นกระบวนการสำคัญในระบบภาวะธำรงดุล (Homeostasis) ของเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย เพื่อป้องกันการบุกรุกของจุลินทรีย์ก่อโรคและเป็นกระบวนการคืนสภาพเนื้อเยื่อให้เหมือนเดิมประกอบไปด้วย 3 ระยะหลักด้วยกันคือ 1. ระยะอักเสบ (inflammatory) 2. ระยะเจริญ (proliferation) และ 3. ระยะปรับรูปร่าง (remodeling) โดยในระยะอักเสบนั้นเกล็ดเลือด (platelets) จะเกิดการเกาะกลุ่มรวมกันกับไฟบริน (fibrin) จากนั้นเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) จะหลั่งสารก่อการอักเสบหรือไซโตไคน์ (cytokines) เช่น IL-6, TNF-α ผ่านจากระยะนี้ไปจะเข้าสู่ระยะเจริญซึ่งเซลล์ไฟโบรบลาสท์จะเคลื่อนที่มายังบริเวณแผลและสร้าง extracellular matrix โดยการผลิตคอลลาเจนออกมา ดังนั้นจึงถือว่าเซลล์ไฟโบรบลาสท์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสมานแผล ระยะสุดท้ายของกระบวนการคือ การปรับรูปร่าง คือเริ่มมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นและเกิดแผลเป็นขึ้น

กลูแคน คือโพลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่ง มีโมโนเมอร์เป็นน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ (1-3)-β เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา สาหร่าย พืชบางชนิดมีการสร้างและขับออกภายนอกเซลล์ ซึ่งกลูแคนนี้อาจจะมีการแตกแขนงในโมเลกุลหรือไม่มีการแตกแขนงเลยก็ได้ งานวิจัยหลายฉบับพบว่า กลูแคนหลายชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ลดการติดเชื้อ ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก [2] โดยส่วนใหญ่เป็นการกระตุ้นในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) เนื่องจาก หมู่คาร์โบไฮเดรท (carbohydrate ligands) เหล่านี้มีความสามารถในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ กระบวนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยผ่านตัวรับการกระตุ้นเฉพาะ (specific receptor) [3]

จากที่กล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาชิโซไฟแลนในด้านความเป็นพิษ การกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการชักนำเซลล์ให้มีการเคลื่อนที่โดยเซลล์ที่เลือกศึกษาคือเซลล์เหงือกไฟโบรบลาสท์ (Human Gingival Fibroblast) เนื่องจาก ชิโซไฟแลนเป็นกลูแคนชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสท์อันเป็นเซลล์สำคัญเซลล์หนึ่งในกระบวนการสมานแผล อีกทั้งยังมีรายงานการนำกลูแคนซึ่งมีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับชิโซไฟแลนมาประยุกต์ใช้เสริมประสิทธิภาพของแผ่นเมมเบรนเพื่อให้เซลล์มีการยึดเกาะที่ดีขึ้น [1] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของชิโซไฟแลนต่อเซลล์เหงือกไฟโบรบลาสท์ ทั้งนี้เพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาหรือประยุกต์ใช้สารดังกล่าวทางด้าน ทันตกรรมต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ คือเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ (Human Gingival Fibroblast ATCC CRL 2014™ American Type Culture Collection, USA)

สารชิโซไฟแลนซื้อจากบริษัท อินวิโวเจน ประเทศสหรัฐอเมริกา (InvivoGen, California USA)

1. วิธีทดสอบ

1.1 การเตรียมสารตัวอย่างทดสอบ

เตรียมตัวอย่างสารชิโซไฟแลน (Schizophyllan) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งผงชิโซไฟแลน 0.1 กรัม ละลายในอาหารดีเอ็มอีเอ็ม ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม

1.2 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ (Human Gingival Fibroblast หรือ HGF ATCC CRL 2014™) นำมาเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagles, Gibco, USA) ที่มีฟีทรัลโบวายซีรัม ร้อยละ 10 (10% Fetal Bovine Serum) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 (Forma 310 Direct Heat CO_2 incubator, USA) จนเซลล์โตเต็มพื้นที่ขวดเลี้ยงเซลล์และมีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) เมื่อนำมาทดสอบให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline) จำนวน 5 มิลลิลิตร ล้าง 1 ครั้ง และดูดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมทริปซินอีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) ร้อยละ 0.25 จำนวน 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นดูดทริปซินอีดีทีเอออกจากขวด นำขวดเลี้ยงเซลล์บ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เมื่อครบเวลานำขวดมาเคาะเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวขวด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีทรัลโบวายซีรัม ร้อยละ 10 จำนวน 10 มิลลิลิตร และทำการแยกเซลล์ออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้ปิเปตต์ดูดและปล่อยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ทั่วพื้นขวด 2-3 ครั้ง ดูดเซลล์จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครทิวบ์ จากนั้นเติมสีทริปแพนบลูร้อยละ 0.4 (0.4% trypan blue stain; Gibco, USA) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยดูดปล่อยขึ้นลงจำนวน 1-2 ครั้ง นำส่วนผสมมาจำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่เครื่องนับเซลล์ (Haemacytometer; Hausser Scientific Horham, USA) ปรับให้ได้เซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นในการทดสอบต่อไป

การทดสอบความเป็นพิษของสารชิโซไฟแลนต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์

ปิเปตต์เซลล์จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม ลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (Costar, Corning Life Science, Acton, MA, USA) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นนำมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารตัวอย่างชิโซไฟแลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม โดยทำความเข้มข้นละ 10 หลุม กลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มอย่างเดียว นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ไปเลี้ยงในตู้อบที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการประเมินฤทธิ์ของสารชิโซไฟแลนด้วยสารละลายเอ็มทีที [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue] ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

1.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารชิโซไฟแลนในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

ปิเปตต์เซลล์จำนวน 3×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มเพาะในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นนำมาทำการทดสอบ โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารตัวอย่างชิโซไฟแลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม โดย

ทำความเข้มข้นละ 10 หลุม กลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มอย่างเดียว นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ไปเลี้ยงในตู้อบที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 10 วัน โดยแต่ละช่วงเวลาจะนำมาทดสอบด้วยสารละลายเอ็มทีที [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue] ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทำกราฟมาตรฐาน

ปิเปตต์เซลล์จำนวน 3×10^3, 5×10^3, 7×10^3, 1×10^4, 1.5×10^4 และ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นเซลล์ 10 หลุม นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มเพาะในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) นำเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่ครบเวลาที่กำหนดออกจากตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วใส่สารละลายเอ็ม ที ที [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue] ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในแต่ละหลุม จำนวน 50 ไมโครลิตร/หลุม นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอ็มทีทีเททิ้งในภาชนะที่จัดเก็บของเสีย แล้วเติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทเทอร์เพลทรีดเดอร์ (Micro titre plate reader, EPOCH, Bio-Tek Instrument Inc, Verment, USA) บันทึกค่า OD แล้วนำมาพล็อตกราฟระหว่างค่า OD และ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวนหาสมการเส้นตรงด้วยโปรแกรม Microsoft Office Excel version 2010 (ข้อมูลไม่แสดง)

1.4 การประเมินฤทธิ์ของสารซิโซไฟแลนด้วยสารละลายเอ็มทีที [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue]

นำเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่ทำการทดสอบด้วยซิโซไฟแลนครบเวลาที่กำหนดออกจากตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วใส่สารละลายเอ็ม ที ที [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue] ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในแต่ละหลุม จำนวน 50 ไมโครลิตร/หลุม นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอ็มทีทีเททิ้งในภาชนะที่จัดเก็บของเสีย แล้วเติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทเทอร์เพลทรีดเดอร์ (Micro titre plate reader, EPOCH, Bio-Tek Instrument Inc, Verment, USA) คำนวณเปอร์เซนต์ความมีชีวิตเซลล์ (% Cell viability) ด้วยสมการ % Cell viability = ODs×100 / ODctrl โดยที่ ODs คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มตัวอย่าง ODctrl คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มควบคุม สำหรับการหาจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Amount of cell proliferation) นำค่า OD ที่วัดได้แทนค่าในสมการเส้นตรงซึ่งได้จากการทำกราฟมาตรฐานซึ่งพล็อตระหว่างค่า OD และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

1.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารตัวอย่างซิโซไฟแลนในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

ปิเปตต์เซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม นำถาดเพาะเลี้ยงบ่มเพาะในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์โตเต็มพื้นที่เพลทมีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นใช้ปลายทิปพลาสติกกรีดตรงแนวเส้นผ่านศูนย์กลางหลุมถาดเพาะเลี้ยง จะเกิดช่องว่างของเซลล์ที่พื้นหลุมจากรอยทิปพลาสติก จากนั้นล้างเซลล์ด้วยพีบีเอสบัฟเฟอร์จำนวน 2 ครั้ง ดูดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1,000 ไมโครลิตรต่อหลุมต่อความเข้มข้น โดย

ทำความเข้มข้นละ 3 หลุม ถ่ายภาพด้วยกล้อง Nikon D5100 camera ส่วนกลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเดียว นำถาดเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม เพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำการทดสอบด้วยสารตัวอย่างครบเวลา 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยพีบีเอสบัฟเฟอร์จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วยเมธานอลร้อยละ 100 และย้อมด้วยสีโทลูอิดีนบลู (toluidine blue) ร้อยละ 0.2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ในพื้นที่หนึ่งตารางมิลลิเมตรด้วยโปรแกรมอิมเมจโปรพลัส รุ่น 7.0 (image pro plus vesion 7.0) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารซิโซไฟแลนในการกระตุ้นการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ จะนำมาทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk Test นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยการทดสอบทางสถิติแบบ One-Way ANOVA จากนั้นแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบ Tukey's Test เปรียบเทียบพหุคูณที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 18.0

ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารซิโซไฟแลนในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ใส่สารซิโซไฟแลน ค่าร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกทดสอบเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 95.69, 97.39, 99.57, 101.17 และ107.85 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบพบว่า สารซิโซไฟแลนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารซิโซไฟแลนในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนในวันที่ 7 ของการทดสอบซึ่งเป็นวันที่ปริมาณเซลล์มีจำนวนสูงที่สุดพบว่า สารซิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2 และ รูปที่ 2

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของซิโซไฟแลนในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์เฉลี่ยที่เคลื่อนที่เท่ากับ 116, 119, 124, 167 และ 204 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารซิโซไฟแลน ซึ่งมีจำนวนเซลล์เฉลี่ยที่เคลื่อนที่เท่ากับ 120 เซลล์ จากผลการทดสอบพบว่าสารซิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 3

บทวิจารณ์

กระบวนการสมานแผลเป็นการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์แมคโครฟาจ เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) และเซลล์ผิวหนัง (keratinocytes) [4] ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้น [5] มีรายงานหลายฉบับที่ศึกษาเกี่ยวกับสารที่ควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีผลในกระบวนการสมานแผล เบต้ากลูแคนเป็นโพลิเมอร์จากธรรมชาติพบในผนังเซลล์ของพืช เชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด มีรายงานว่าเบต้ากลูแคนสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ [2,6-8] และ

สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยได้โดยตรง [9] รายงานฉบับนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารชิโซไฟแลนซึ่งเป็นเบต้ากลูแคนชนิดหนึ่งต่อการเจริญและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์เพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาว่า สารชิโซไฟแลนสามารถนำไปพัฒนาเป็นสารช่วยสมานแผลในช่องปากหรือใช้งานทางด้านทันตกรรมได้หรือไม่

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารชิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เบต้ากลูแคนชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ และเมื่อใช้ความเข้มข้นเดียวกันทดสอบผลต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผล

Table 1 Effect of schizophyllan at various concentrations on percent cells viability of HGF. (P > 0.05)

Concentration (mg/ml)	Percent cell viability ± SD
Non treated	100.00 ± 0.00
0.1	95.69 ± 5.28
0.5	97.39 ± 4.98
1.0	99.57 ± 4.44
5.0	101.17 ± 4.22
10.0	107.85 ± 6.46

The result are reported as a mean ± standard deviation (n=3).

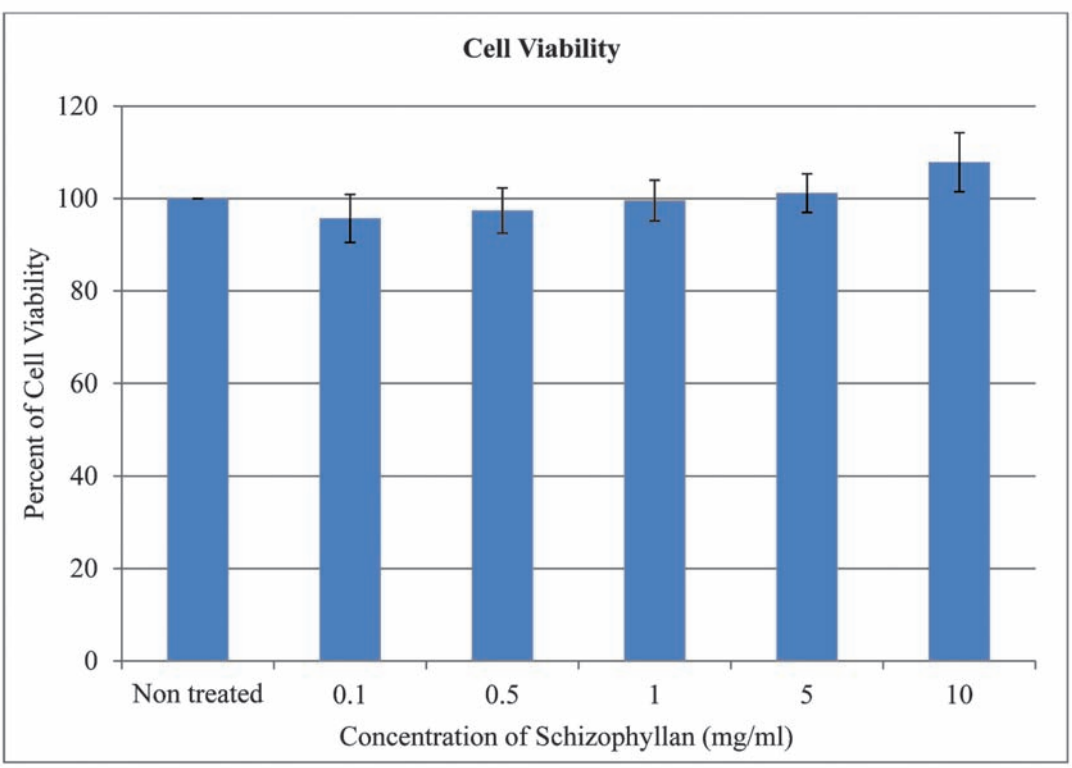

Figure 1 Effect of schizophyllan at various concentrations on percent cells viability of HGF after 24 hours treatment (n=3). (P > 0.05)

Table 2 The amount of cell proliferation at day 7 after exposed to schizophyllan. ($P < 0.05$)

Concentration (mg/ml)	Amount of Cell proliferation (cells/well) ± SD
Non treated	$5.0\times10^4\pm1.3\times10^3$ (a)
0.1	$5.0\times10^4\pm2.0\times10^3$ (a)
0.5	$4.9\times10^4\pm0.8\times10^3$ (a)
1.0	$5.1\times10^4\pm 2.8\times10^3$(a,b)
5.0	$5.4\times10^4\pm1.9\times10^3$ (a,b)
10.0	$5.7\times10^4\pm3.1\times10^3$ (b)

The result are reported as a mean ± standard deviation (n=3).
The values with the same letters at the right-side of the standard deviation are not significant different at P>0.05.

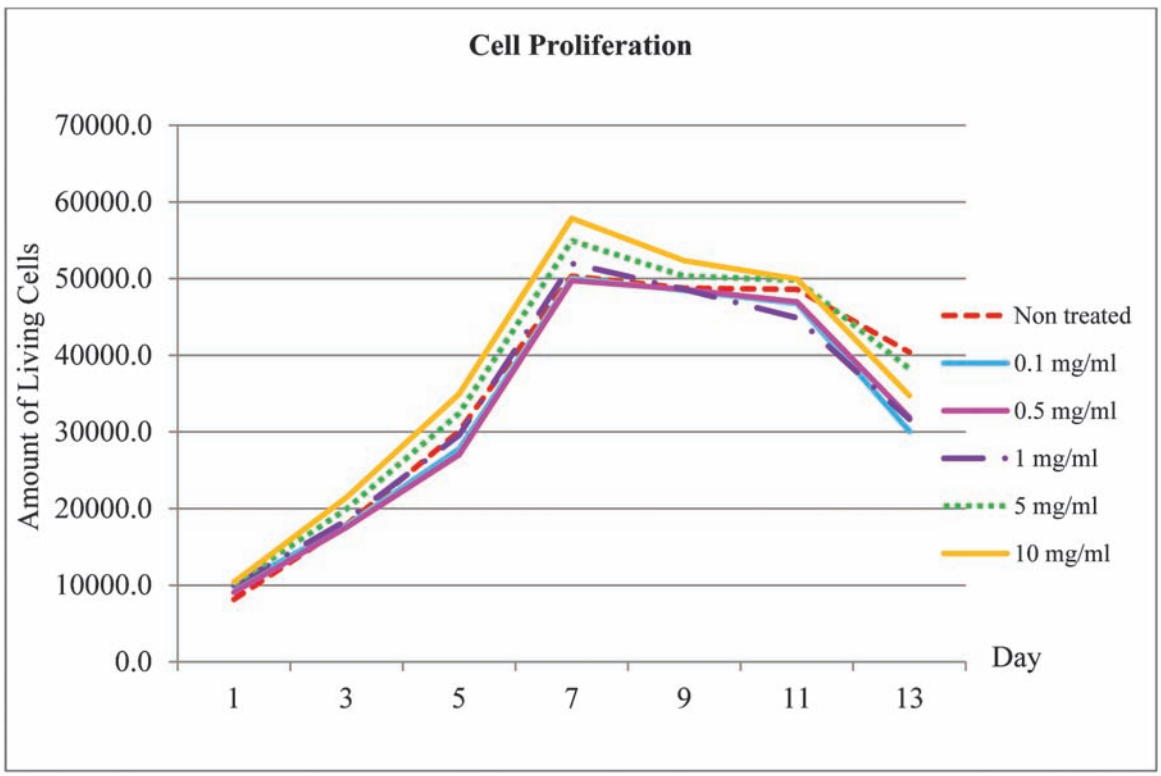

Figure 2 The cell proliferation assay at various concentration of schizophyllan.
The result are shown as a mean (n=3).

Table 3 Mean of migrated cells in the scratched area after 24 hours of incubation. ($P < 0.05$)

Concentration (mg/ml)	Mean of migrated cells/Sq mm^2 ± SD
Non treated	120 ± 5 (a)
0.1	116 ± 6 (a)
0.5	119 ± 5 (a)
1.0	124 ± 4 (a)
5.0	167 ± 7 (b)
10.0	204 ± 7 (c)

The result are reported as a mean ± standard deviation (n=3).
Mean values with the same letters at the right-side of the standard deviation are not significant different at P>0.05.

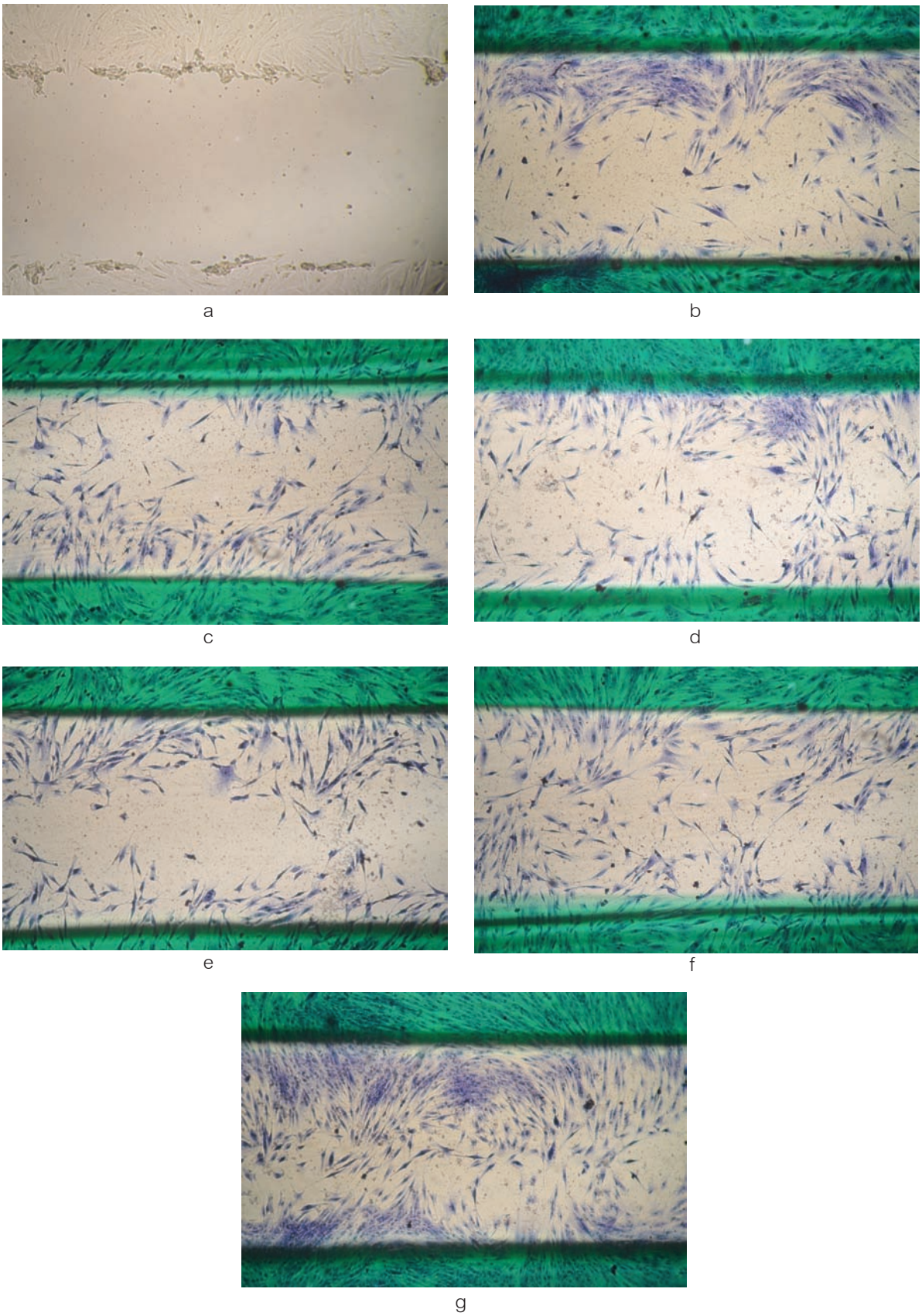

Figure 3 Migration assay
(a) scratch line (no stain). After 24 hours of incubation with: (b) non treated, (c) schizophyllan 0.1 mg/ml, (d) schizophyllan 0.5 mg/ml, (d) schizophyllan 1.0 mg/ml, (f) schizophyllan 5.0 mg/ml, (g) schizophyllan 10.0 mg/ml

ทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งจากรายงานของ Koagias Pและคณะ (2001) พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสท์มี receptor ที่จำเพาะต่อเบต้ากลูแคนทำให้เซลล์มีการตอบสนองโดยการหลั่งไซโตไคน์ชนิด NF-kB และ IL-6 ซึ่งเป็นสารสำคัญในการก่อให้เกิดการสมานแผล [9] ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าที่ผิวเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์อาจจะมี receptor ที่รองรับการกระตุ้นด้วยสารกลุ่มเบต้ากลูแคนและการเพิ่มจำนวนของเซลล์นี้เป็นไปได้ว่าสารซิโซไฟแลนสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม การจับกันของสารใด ๆ ต่อ receptor ที่ผิวเซลล์ รูปร่างโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุลควรมีความเหมาะสมต่อรูปร่าง receptor นั้น เมื่อพิจารณาขนาดโมเลกุลของสารซิโซไฟแลนพบว่า มีโครงสร้างเป็นเกลียวสามสายพันกัน (triple helix) โดยโครงสร้างสายตรงเชื่อมกันด้วยพันธะ (1-3)-beta-D-glucan มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45×10^4 กรัมต่อโมล [10] ซึ่งสอดคล้องตามรายงานของ Falch BH และคณะ (2000) ว่าประสิทธิภาพการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ (human monocyte) ในการหลั่ง TNF-α โดยเบต้ากลูแคนชนิด (1-3)-beta-D-glucan (sclerocan, schizophyllan, lentinan) ขึ้นอยู่กับ การแตกแขนงของโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลและการจัดเรียงรูปร่างโครงสร้างของโมเลกุล โดยพบว่าเบต้ากลูแคนที่โมเลกุลมีลักษณะเป็นเส้นตรง (linear wormlike) และมีโครงสร้างแบบเกลียวสาม (triple helical) น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 50×10^4 กรัมต่อโมล หรือเบต้ากลูแคนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 110×10^4 กรัมต่อโมลสามารถกระตุ้นเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าเบต้ากลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $(67 – 110) \times 10^4$ กรัมต่อโมล [11] สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของสารซิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ อาจเกิดจากความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบน้อยเกินไปจนไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการตอบสนองได้

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารซิโซไฟแลนในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่า สารซิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ทำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารซิโซไฟแลน ซึ่งผลการทดสอบนี้มีความใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาของ Son HJ และคณะ (2007) ที่ทำการทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ adult Human Dermal Fibroblast (aHDF) โดยเบต้ากลูแคนจาก *Aureobasidium* sp.ที่มีสูตรโครงสร้างโมเลกุล (1-3)(1-6)-beta-D-glucan พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เบต้ากลูแคนชนิดนี้ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ aHDF แต่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ aHDF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่สารเบต้ากลูแคน [12] ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันนี้อาจเกิดจากเซลล์ที่ใช้ทดสอบมีความใกล้เคียงกันเนื่องจาก เป็นเซลล์ในกลุ่มสร้างเส้นใย (fibroblasts) ในมนุษย์เหมือนกัน และยังสอดคล้องกับงานวิจัยอีกฉบับของ Son HJ และคณะ (2010) ที่พบว่า ผลการทดสอบเบต้ากลูแคนจาก *Aureobasidium* sp. ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ adipose tissue-derived stem cell (ADSC) ก็ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับเซลล์ aHDF คือ ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์ให้เคลื่อนที่ [1]

อย่างไรก็ตาม เบต้ากลูแคนแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์แตกต่างกัน ผลดังกล่าวเป็นไปได้ว่าเกิดจาก ปริมาณความเข้มข้นของเบต้ากลูแคนที่ใช้ทดสอบ รูปร่างโครงสร้างการจัดเรียงตัวในโมเลกุลเบต้ากลูแคน เช่น (1-3)(1-4)-beta-D-glucan, (1-3)(1-6)-beta-D-glucan [13-14] ชนิดของเซลล์ที่ใช้ทดสอบซึ่งเซลล์แต่ละชนิดก็มีคุณสมบัติและความไวต่อสารทดสอบที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ แหล่งต้นกำเนิดของเบต้ากลูแคนที่แตกต่างกัน เช่น เบต้ากลูแคนสกัดได้จากยีสต์,

เชื้อรา แม้มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกันคือ (1-3)(1-6)-beta-D-glucan ทำการทดสอบในกลุ่มเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) เช่นเดียวกัน แต่ผลการทดสอบที่ได้กลับมีความแตกต่างกัน ดังรายงานการวิจัยของ Son HJ และคณะ (2005) ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์ของเบต้ากลูแคนจาก *Lentinus edodes* ที่มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลแบบ (1-3)(1-6)-beta-D-glucan พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ปกติจากเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังของหนู (L929) แต่ไม่พบฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ L929 [15] จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ของเบต้ากลูแคนจากแหล่งต้นกำเนิดแต่ละชนิดแม้มีสูตรโครงสร้างเหมือนกันแต่อาจให้ผลการทดสอบแตกต่างกัน และอาจเกิดจากเซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็นคนละชนิดกันจึงมีความไวต่อสารทดสอบแตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังมีรายงานการปรับปรุงโครงสร้างทางกายภาพและขนาดโมเลกุลของสารชิโซไฟแลนโดยผ่านกระบวนการอุลตร้าโซนิคพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นไปจากเดิม [16] และยังมีรายงานว่าการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของสารชิโซไฟแลนแล้วพบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น เช่น ชิโซไฟแลนในรูปของเกลือซัลเฟต (sulfated schizophyllan) ชิโซไฟแลนในรูปฟอร์มิลเมธิเลท (formyl methylated schizophyllan) และชิโซไฟแลนในรูปอะมิโนเอธิเลท (amino ethylated schizophyllan) รายงานเหล่านี้ สรุปได้ว่า การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของชิโซไฟแลนมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้สูงขึ้น [17] ดังนั้น ฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ในกระบวนการสมานแผลโดยเบต้ากลูแคนยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตเพื่อความเข้าใจอย่างถ่องแท้

สรุปผลการทดลอง สารชิโซไฟแลนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์และมีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และที่ความเข้มข้น 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์หรือการสมานแผล (wound healing) การศึกษาในครั้งนี้อาจมีประโยชน์ในการการพัฒนาใช้เบต้ากลูแคนชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์รักษาแผลในช่องปากต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากรองศาสตราจารย์ดอกเตอร์ฤดี สุราฤทธิ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักงานการวิจัยทุกท่านที่ช่วยเหลือคณะผู้วิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่ปฏิบัติงาน

Funding: Pilot Study Grant (PG) 2016, Faculty of Dentistry, Mahidol University.

Competing interests: Not declare

Ethical approval: None

References

1. Woo YI, Park BJ, Kim HL, Lee MH, Kim J, Yang YI, et al. The biological activities of (1, 3)-(1, 6)-β-D-glucan and porous electrospun PLGA membranes containing β-glucan in human dermal fibroblasts and adipose tissue-derived stem cells. ***Biomed Mater*** 2010; 5: 044109.
2. David LW. Overview of (1→3)-β-D-glucan immunobiology, ***Mediators Inflamm*** 1997 ; 6: 247-250.
3. Bohn JA, BeMiller JN. (1-3)-Beta-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. ***Carbohydr Polym*** 1995; 28: 3-14.
4. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. ***Surgery*** 2008; 26: 31-37.
5. Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. ***Surgery*** 2011; 29: 475-479.

6. Pereira LP, Mota MRL, Brizeno LAC, Nogueira FC, Ferreira EGM, Pereira MG, et al. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from Caesalpinia ferrea stem barks in rat cutaneous wound healing: role of TNF-α, IL-1β, NO, TGF-β. *J Ethnopharmacol* 2016; 187: 213-223.
7. He Y, Ye M, Du Z, Wang H, Wu Y, Yang L. Purification, characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from Lachnum YM405. *Carbohydr Polym* 2014; 105: 169-176.
8. Berg LMVD, Zijlstra-Willems EM, Richters CD, Ulrich MMW, Geitenbeek TBH. Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratinocytes enhancing wound re-epithelialization. *Cell Immunol* 2014; 289: 49-54.
9. Kougias P, Wei D, Rice PJ, Ensley HE, Kalbfleisch J, Williams DL, et al. Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1→ 3)-β-D-glucans. *Infect Immun* 2001; 69: 3933-3938.
10. Zhang Y, Kong H, Fang Y, Nishinari K, Phillips GO. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. *Bioact Carbohydr Diet Fibre 1* 2013; 1: 53-71.
11. Falch BH, Espevik T, Ryan L, Stokke BT. The cytokine stimulating activity of (1→ 3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *CARBOHYDR RES* 2000; 329: 587-596.
12. Son HJ, Han DW, Baek HS, Lim HR, Lee MH, Woo YI, et al. Stimulated TNF-α release in macrophage and enhanced migration of dermal fibroblast by β-glucan. *Curr Appl Phys* 2007; 7: 33-36.
13. Usui S, Tomono Y, Sakai M, Kiho T, Ukai S. Preparation and Antitumor Activities of BETA-(1→6) Branched (1→3)- BETA-D-Glucan Derivatives. *BIOL PHARM BULL* 1995; 18: 1630-1636.
14. Wei D, Williams D, Browder W. Activation of AP-1 and SP1 correlates with wound growth factor gene expression in glucan-treated human fibroblasts. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2: 1163-1172.
15. Son HJ, Bae HC, Kim HJ, Lee DH, Han DW, Park JC. Effects of β-glucan on proliferation and migration of fibroblasts. *Curr Appl Phys* 2005; 5: 468-471.
16. Zhong K, Tong L, Liu L, Zhou X, Liu X, Zhang Q, et al. Immunoregulatory and antitumor activity of schizophyllan under ultrasonic treatment. *Int J Biol Macromol*. 2015; 80: 302-308.
17. Hirata A, Itoh W, Tabata K, Kojima T, Itoyama S, & Sugawara, I. Anticoagulant activity of sulfated schizophyllan. *BBB* 1994; 58: 406-407.