Evaluation of the proliferative effect of clinacanthus *nutans* glycerine and moringa *oleifera* seed oil extraction on human gingival fibroblast cell line

Sirinthip Choonate[1], Suwanna Korsuwannawong[2], Kongthawat Chairatvit[3]

[1] B.Sc.(Applied Biology) Department of Oral Biology Faculty of Dentistry, Mahidol University.
[2] B.Sc., M.Ed. (Research and Statistics) Research office Faculty of Dentistry, Mahidol University.
[3] B.Sc. Ph.D. (Biochemistry) Department of Oral Biology Faculty of Dentistry, Mahidol University.

Abstract

Objective: *Clinacanthus nutans* glycerine and *Moringa oleifera* seed oil are commonly used as herbal medicines in Thailand. Previous studies have shown the anti-inflammatory effects and promotion of the wound healing process. However, there is no study for both extracts on oral cells. The aim of this work is; therefore, to study the proliferative effect of both herbal Thai Medicine on Human Gingival Fibroblast (HGF) cell line.

Materials and methods: HGF cells were treated with herbal extracts at concentrations of 0.01, 0.1 and 0.5% (V/V). Cytotoxicity was evaluated by MTT assay. Sulforhodamine B (SRB) standard staining method was used to monitor cell proliferation for 10 days after treatment with various concentrations of herbal extracts.

Results: Both herbal extracts showed no toxicity to HGF cultures in all tested concentrations. the result of *Clinacanthus nutans* glycerine and *Moringa oleifera* seed oil extractions at concentrations of 0.01, 0.1 and 0.5% (V/V) the percentage of cell viability was 102, 105, 99 and 108, 110, 105, repectively. However, both extracts promoted cell proliferation by the concentration-dependent manner. *Clinacanthus nutans* glycerine showed 117.85%, 125.00% and 130.35% proliferative rates ($P<0.05$) compared to the control at concentrations of 0.01, 0.1 and 0.5% (V/V), repectively. showed significantly increased cell proliferation compared with the control group ($P<0.05$). Moringa *oleifera* seed oil showed a slightly lower proliferative effect on HGF (104.28%, 114.28% and 118.57% at concentrations of 0.01, 0.1 and 0.5% (V/V), repectively) compared to that of *Clinacanthus nutans* glycerine.

Conclusion: The result suggests that these two Thai medicinal plant extracts promote cell proliferation and might be able to use as a potential medicines for wound healing process on periodontal diseases.

Key words: *Clinacanthus nutans* glycerine, HGF cell line, *Moringa oleifera* seed oil, MTT assay, periodontal diseases, proliferation, wound healing

How to cite: Choonate S, Korsuwannawong S, Chairatvit K. Evaluation of the proliferative effect of clinacanthus nutans glycerine and moringa oleifera seed oil extraction on human gingival fibroblast cell line. M Dent J 2014; 34: 373-84.

Correspondence author:
Suwanna Korsuwannawong
Research office
Faculty of Dentistry, Mahidol University
6 Yothi Rd., Rajathevi, Bangkok 10400.
Tel: 02-200-7620-24
Fax: 02-200-7622
E-mail: Suwanna.aut@mahidol.ac.th
Received: 3 February 2014
Accepted: 16 May 2014

ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

ศิรินทิพย์ ชูเนตร[1] สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์[2] คงธวัช ชัยรัชวิทย์[3]

[1] วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์) ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2] วท.บ. (วิทยาศาสตร์ทั่วไป), กศ.ม. (การวิจัยและสถิติทางการศึกษา) สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[3] วท.บ.(ชีววิทยา) (เกียรตินิยมอันดับ 1), Ph.D. (Biochemistry) ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมในด้านความเป็นพิษ และการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา: นำเซลล์เหงือกไฟโบรบลาสท์ชนิดต่อเนื่อง มาเพาะเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 จนได้เซลล์ชั้นเดียว นำมาย่อยด้วยทริปซินอีดีทีเอร้อยละ 0.25 ให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ นำเซลล์มาใส่เพลทชนิด 96 หลุมๆละ $1x10^4$ เซลล์ นำเพลทมาบ่มในตู้อบ เป็นเวลา 24 ชม. และนำสารทดสอบสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด มาศึกษาประเมินความเป็นพิษ โดยวิธี MTT และนำเซลล์มาใส่เพลทชนิด 96 หลุมๆละ $5x10^3$ เซลล์ จำนวน 5 เพลท/สมุนไพร ภายหลังจากใส่สารทดสอบสมุนไพร นำเพลทมาบ่มในตู้ เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน เพื่อศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ของเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา โดยการย้อมเซลล์ด้วย SRB (Sulforhodamine B) โดยให้สารทดสอบสมุนไพรแต่ละชนิดมีความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนกลุ่มควบคุมใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มอย่างเดียว ทำการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์เป็นระยะเวลา 10 วัน

ผลการทดลอง: ด้านประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมที่ความเข้นข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 พบว่าร้อยละ ความมีชีวิตของเซลล์ต่อสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอเท่ากับ 104.08±4.90, 104.48±3.2 และ97.55±2.5 เรียงตามลำดับ ส่วนสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมเท่ากับ 108.55±4.10, 110.36±3.31 และ107.60±2.6 เรียงตามลำดับ ด้านการแบ่งตัวของเซลล์ต่อสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในวันที่ 8 โดยมีเปอร์เซนต์การแบ่งตัวของเซลล์ของเซลล์ (% cell Proliferation) เท่ากับ 117.85±10.37, 125±14.31 และ 130.35±11.35 เรียงตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม เท่ากับ 100 ($P<0.05$) ส่วนการแบ่งตัวของเซลล์ต่อสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในวันที่ 8 โดยมีเปอร์เซนต์การแบ่งตัวของเซลล์ เท่ากับ 104.28±10.57, 114.28±15.35 และ118.57±11.35 เรียงตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม เท่ากับ 100 ($P<0.05$)

บทสรุป: สารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ ส่วนการศึกษาฤทธิ์การแบ่งตัวของเซลล์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์จากสารทดสอบ ทำให้ผลที่ได้มีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับรักษาโรคในช่องปากได้ โดยสารมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) ด้วย

รหัสคำ: สมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ, เซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์, สมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม, การทดสอบหาความมีชีวิตของเซลล์, โรคปริทันต์, การแบ่งตัวของเซลล์ในการเพิ่มจำนวนเซลล์, การสมานแผล

วิธีอ้างอิงบทความนี้: ศิรินทิพย์ ชูเนตร, สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์, คงธวัช ชัยรัชวิทย์. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์. ว ทันต มหิดล 2557; 34: 373-84.

ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:
สุวรรณา ก่อสุวรรณวงศ์
สำนักงานการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล
6 ถ.โยธี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
หมายเลขโทรศัพท์ : 02-200-7620-24
หมายเลขโทรสาร : 02-200-7622
หมายเลขโทรศัพท์มือถือ : 081-340-5694
อีเมล์: Suwanna.aut@mahidol.ac.th
วันรับเรื่อง: 3 กุมภาพันธ์ 2557
วันยอมรับการตีพิมพ์: 16 พฤษภาคม 2557

บทนำ

สมุนไพรไทยได้ถูกนำมาใช้ในด้านการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อ โรคที่มีผลต่อระบบน้ำเหลือง และโรคอื่นๆ[1] ในขณะที่โรคในช่องปากก็เป็นปัญหาใหญ่และพบมากสำหรับสุขภาพช่องปากของคนทั่วไป คือ โรคฟันผุหรือโรคเหงือกอักเสบ[2-4] ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรโบราณมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคที่เกิดในช่องปากและฟัน โดยนำสรรพคุณทางยาของสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ประโยชน์เพื่อช่วยให้มีประสิทธิภาพในการรักษาช่องปากมากขึ้น มีรายงานการพัฒนาสมุนไพรในยาสีฟันเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคปริทันต์ในงานทางทันตกรรม พบว่า ผลิตภัณฑ์ยาสีฟันที่ผสมสารสมุนไพรมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย เช่น เมื่อผสมสมุนไพรพวกข่อย แก้ว พญายอ จะทำให้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและลดการอักเสบได้ เนื่องจากพืชสมุนไพรสามารถผลิตสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ (antimicrobial activity) เพื่อป้องกันตัวเองจากจุลชีพที่เป็นอันตรายต่อตัวมันเอง[5-8] ในสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมและกลีเซอรีนพญายอ ก็เป็นสมุนไพรไทยจากธรรมชาติของประเทศไทย กล่าวคือ มะรุมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Moringa oleifera Lam.อยู่ในวงศ์ Moringaceae การเรียกชื่อมะรุมแตกต่างกันออกไปในแต่ละภาค เช่น ภาคเหนือ เรียกว่า บะค้อนก้อม ภาคอีสานเรียกว่า ผักอีฮุมหรือบักฮุ้ม จัดเป็นพืชผักพื้นบ้านของไทย มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชีย (อินเดีย, ศรีลังกา) เป็นไม้ยืนต้นที่โตเร็ว ปลูกง่ายในเขตร้อน ทนแล้ง แต่พบได้โดยทั่วไปในแอฟริกา และเขตร้อนของทวีปอเมริกา เป็นไม้ผลัดใบขึ้นได้ในทุกภูมิประเทศ สำหรับประเทศไทย มะรุมพื้นเมืองที่ปลูกโดยทั่วไปเป็นพวก M.oleifera ซึ่งมีสายพันธุ์จากอินเดียแถบเทือกเขาหิมาลัย จากการศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน พบว่า มะรุมเป็นพืชที่มีสารจำพวก Polyelectrolyte อยู่ในเมล็ด[9] ต่อมาในปี พ.ศ. 2507 มีผู้รายงานว่ามะรุมมีสารเบนซิลไทโอไซยาเนตโดไซต์และเบนซิลกลูโดซิโนเลต มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยมีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรโบราณ สำหรับรักษาการเจ็บปวดและมีผู้รายงานว่าสมุนไพรมะรุมสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการเกิดพิษ ตลอดจนลดการอักเสบ[10-12] สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีรายงานการนำสมุนไพรมะรุมมาใช้ในการทดลองกับหนูตะเภา พบว่าสามารถลดการอักเสบของทางเดินหายใจที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Ovalbumin ในหนูตะเภาและมีผลป้องกันการอักเสบของทางเดินหายใจที่มีผลมาจากการเหนี่ยวนำด้วย acetyleholine [13] ฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีรายงานการศึกษาแสดงฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้น Epstein-Baritvirus-early antigen (EBV-EA) ใน Raji cells ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดย tumor promoter, 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13 -acetate(TPA) จากการศึกษาพบว่า niazimicin จะเป็นสารเคมีป้องกันการเกิดมะเร็งจากสารเคมี Chemopreventive agent[14] ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา มีรายงานการศึกษาถึงการแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli, Klebsialla aerugenus, Staphylococcus aureus, Bacillus subtillis และฤทธิ์ต้านเชื้อรา[15] ด้านการทดสอบความเป็นพิษมีการใช้สมุนไพรมะรุม พบว่ามีการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ Micronucleus พบว่ามีจำนวน micronucleated polychromatic erythrocytes(PCE)/1000 [16] และสมุนไพรพญายอ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Clinacanthus nutans (Burm.f.) Lindau อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกแตกต่างกัน ได้แก่ เสลดพังพอนตัวเมีย พญาปล้องทอง พญาปล้องดำ ผักมันไก่ ผักลิ้นเขียด ลิ้นมังกร โพะโซ่จาง ซึ่งถ้าเป็นเสลดพังพอนตัวผู้จะมีหนามสรรพคุณอ่อนกว่าเสลดพังพอนตัวเมีย นิยมเรียกเสลดพังพอนตัวเมียว่า “พญายอ” มีลักษณะไม้พุ่มแกมเลื้อยสูง 1-3 เมตร เถาและใบมีสีเขียวใบไม้ไม่มีหนาม ใบยาวเรียวปลายแหลม ออกตรงข้ามเป็นคู่ ดอกออกเป็นช่ออยู่ที่ปลายกิ่ง แต่ละช่อมี 3-6 ดอก กลีบดอกเป็นดอกปลายแยกสีแดงอมส้ม พญายอขึ้นได้งามในดินที่สมบูรณ์แสงแดดปานกลาง พบได้ทั่วไปตามป่าในประเทศไทยเป็นพืชตระกูลอแคนตาซีอิ (Acantaceae)[17] ซึ่งหาได้ทั่วไป แพทย์พื้นบ้านใช้รักษาโรคผิวหนังจำพวกเริม, งูสวัดและแก้พิษแมลงกัดต่อย สารสกัดจากสมุนไพรพญายอ มีผู้รายงานเกี่ยวกับการยับยั้งการติดเชื้อไวรัส การ

เกิดการแพ้และลดการอักเสบเช่นกัน[18] มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพญายอในด้านฤทธิ์ลดการอักเสบ โดยศึกษาในตัวอย่างหนูขาว นำสารสกัดเอ็นบิวทานอลจากใบพญายอให้ทางปากหนูขาวจะลดการอักเสบของอุ้งเท้าหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Carrangenan[19-21] แต่ถ้าใช้วิธีทาสารสกัดที่ผิวหนังจะไม่สามารถลดน้ำหนองของถุงลมหนูได้ ต่อมามีการใช้ 5% ของพญายอในรูป cold cream ซึ่งได้จากสารสกัดเอทานอล 95% และสารสกัดเอทานอลในน้ำ ทาเฉพาะที่ให้หนูขาวสามารถลดหนองและการเกิด granuloma ได้ 50.98%, 50.10%, 48.30%[22] ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานศึกษาด้านความเป็นพิษ มีการทดสอบความเป็นพิษ แสดงให้เห็นว่าพญายอสามารถรักษาแผลในปากได้และการทดสอบความเป็นพิษพบว่า สารสกัดเอ็นบิวทานอลมีค่า LD50 มีค่าเท่ากับ 13.4กรัม/กิโลกรัม ในเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังให้ทางปากและค่าเท่ากับ 3.4 กรัม/กิโลกรัม เมื่อฉีดเข้าช่องท้องและให้สารสกัดทุกวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนูขาว แต่พบว่า น้ำหนักไธมัสลดลงขณะที่น้ำหนักตับเพิ่มขึ้น ไม่พบความผิดปกติต่ออวัยวะอื่นๆ และไม่มีอาการไม่พึงประสงค์อื่นๆ[20] ส่วนผลงานวิจัยเกี่ยวกับการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ เมื่อใช้สมุนไพรพญายอเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อเซลล์เยื่อบุช่องปากของมนุษย์ (HOK) เป็นเซลล์ลายน์ที่พัฒนาขึ้นโดย Piboonyiom และคณะฯ ในปี ค.ศ.2002 เพาะเลี้ยงเซลล์ใน keratinocyte serum free (Keratinocyte-SFM, Gibco-BRL) ที่ได้รับการเติม epidermal growth factor และ bovine pituitary extract พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรีนพญายอที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เท่ากับ 10 ไมโครลิตร/5 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ นำมาเจือจางลง 10, 100 เท่า โดยทดสอบที่ช่วงเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง เพื่อวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการนับเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์ (Haemocytometer) พบว่า จำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อทดสอลทางสถิติโดยใช้ Kruskal-Wallis test ($p<.05$) ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆเหล่านี้มีผู้รายงานศึกษา แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความเป็นพิษและผลการแบ่งตัวของเซลล์ในสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้ จึงเป็นการศึกษาผลการแบ่งตัวของเซลล์ในสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดต่อเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรทั้งสองชนิด จะไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ และมีความเข้มข้นซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ดังกล่าว ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้เพื่อศึกษาด้านความเป็นพิษและการกระตุ้นการแบ่งตัวอของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ในสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ (Human Gingival Fibroblast cell line หรือ HGF cell line) (ATCC Lot. No 58007727, CRL 2014) นำมาเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dubbecco's Modified Eagles, Gibco, USA) ที่มีฟีทรัลโบวายซีรัม ร้อยละ 10 (10%Fetal Bovine Serum) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 จนเซลล์โตเต็มพื้นที่ขวดเลี้ยงเซลล์ มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว เมื่อนำมาทดลองให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวด ล้างด้วยฟอสเฟต บัพเฟอร์ซาไรด์ (phosphate buffer saline) จำนวน 5 มิลลิลิตร ล้าง 1 ครั้ง และดูดฟอสเฟต บัพเฟอร์ซาไรด์ ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมทริปซินอีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 จำนวน 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นดูดทริปซินอีดีทีเอ ออกจากขวด นำขวดเลี้ยงเซลล์บ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 เมื่อครบเวลานำขวดมาเคาะเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดจากพื้นขวด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม ที่

มีฟีทรัลโบวายซีรัม ร้อยละ 10 จำนวน 10 มิลลิลิตร และทำการแยกเซลล์ออกจากพื้นขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้ pasture pipette ดูดและปล่อยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ทั่วพื้นขวด 2-3 ครั้ง ดูดเซลล์จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครทิว จากนั้นเติมสีทริปแพนบลูร้อยละ 0.4 (0.4% trypan blue stain; Gibco, USA) จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยดูดปล่อยขึ้นลงจำนวน 1-2 ครั้ง นำส่วนผสมมาจำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่เครื่องนับเซลล์ (Haemacytometer; Hausser Scientific Horham, USA) ปรับให้ได้เซลล์จำนวน 1x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร

ประเภทสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ในสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม ตามตารางที่ 1

วิธีการทดสอบ

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

เตรียมตัวอย่างสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ ที่ความเข้มข้นร้อยละ0.5 แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ตัวอย่างความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ0.01 โดยมีกลีเซอรีนความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นกลุ่มควบคุม ส่วนตัวอย่างสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม ดำเนินการเช่นเดียวกันแต่ใช้ดีเอ็มเอสโอ (Dimethylsulphoxide; DMSO) ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม

การเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Corning Inc., USA) จำนวน 5 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะไร้เชื้อในตู้กรองอากาศให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ดูดเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้แยกจากกัน นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (Forma Direct Heat: CO_2 Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน โดยสังเกตจากสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มเหลือง

การเตรียมเซลล์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ออกจากตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างเซลล์ด้วย พีบีเอสบัพเฟอร์ ทำการย่อยเซลล์ด้วยทริปซินอีดีทีเอร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA) และทำลายฤทธิ์ของทริปซินด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% ฟีทรัลโบวายซีรั่ม (10%Fetal Bovine Serum) จากนั้นปิเปตเซลล์ลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม(Costar, Corning Life Science, Acton, MA, USA) หลุมละ 100 ไมโครลิตรที่มีเซลล์จำนวน 1x10^4 เซลล์ต่อหลุม นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ไป

Table 1 Type, brands and manufacturers of five preservative solution used in this experiment

Type	Brand name/ Cat. No./ Lot No.	Manufacturers
Control DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium Powder	GIBCO™ Cat. No. 12100-038 Lot No.1154412	Grand Island, New York, USA.
สมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ อภัยภูเบศร์	อภัยภูเบศร์ เลขทะเบียน G668/45 Lot. No.SLG B252	สำนักงานโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร์, จ.ปราจีนบุรี, ประเทศไทย
สมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม 100% (100% Pure Moringa Seed Oil)	Moringa™ Cat.No. 365	หจก.สามัญ นีโอ โมริ่งก้า, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย

เลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร

นำเซลล์จำนวน $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ให้ได้เซลล์จำนวน $1x10^4$ เซลล์/หลุม นำถาดเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มเพาะในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 37 องศาเซลเซียส, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ100 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เซลล์โตเต็มพื้นที่ขวดเพาะเลี้ยง มีลักษณะเป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นนำมาทำการทดลอง นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ใน 96 หลุมครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ดูดสารตัวอย่างสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ ที่ความเข้นข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 จำนวน 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม โดยทำความเข้มข้นละ 10 หลุม ดูดกลีเซอรีนความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 5 หลุม เป็นกลุ่มควบคุม และใช้กลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่กลีเซอรีนจำนวนอีก 5 หลุม นำเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยแต่ละช่วงเวลา จะนำมาทดสอบด้วยเอสอาร์บี (Sulforhodamine B; SRB)[23] สำหรับการทดสอบสารตัวอย่างสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม จะใช้ดีเอ็มเอสโอ (Dimethylsulphoxide; DMSO) ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุมในการทดสอบฤทธิ์ของตัวอย่าง

การประเมินฤทธิ์ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ และสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์

นำเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ที่ทำการทดสอบด้วยสารตัวอย่างสมุนไพรครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ออกจากตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วใส่สารละลายเอ็ม ที ที [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5–diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue)[24] ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ลงในแต่ละหลุม จำนวน 250 ไมโครลิตร/หลุม นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย MTT เททิ้งในภาชนะที่จัดเก็บของเสีย แล้วเติม ดีเอ็มเอสโอ(DMSO) หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทเทอร์เพลทรีดเดอร์ (Micro titre plate reader, Ceres UV 900 HDI, Bio-Tek Instrument Inc, Verment, USA) คำนวณเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ (%Cell viability) ด้วยสมการ %Cell viability = ODs x 100 / ODctrl (1) โดยที่ ODs คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มตัวอย่าง ODctrl คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรของกลุ่มควบคุม ทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ (%Cell viability) ของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยสถิติ One-way ANOVA : Post hoc Multiple Comparisons (Dunnett) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 18.0 ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

การทดสอบการย้อมเซลล์ด้วยวิธีเอสอาร์บี (Sulforhodamine B; SRB)

นำเซลล์จำนวน $5x10^3$ เซลล์/หลุม ใส่ในถาดหลุมชนิด 96 หลุม ภายหลังจากตัวอย่างถูกทดสอบ เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 วันแล้ว ตรึงเซลล์ด้วยไตรคลอโรอะซีตริกแอซิค ร้อยละ 10 (10% Trichloroacetic acid) เป็นเวลา 1ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง แล้วย้อมสีเอสอาร์บี ร้อยละ 0.057% (0.057% Sulforhodamine B; SRB) จำนวน 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยอะซีตริคแอซิด ร้อยละ 1 (1% acetric acid) จำนวน 3 ครั้งๆละ 100 ไมโครลิตร/หลุม จนกระทั่งพื้นเพลทใส จึงเติมทริสเบสความเข้มข้น 10 มิลลิโมล่า (10mM Tris-base buffer) จำนวน 100 ไมโครลิตร/หลุม นำเพลทไปเขย่าที่เครื่องเขย่า เป็นเวลา 10 นาที นำเพลทมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

ผลการทดลอง

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมในด้านทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยในเหงือกมนุษย์ที่ตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ต่อสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ โดยมีกลุ่มควบคุมลบ กลุ่มตัวอย่างที่ความเข้นข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 และกลุ่มควบคุมบวก เท่ากับ 95.11±3.75, 104.08±4.90, 104.48±3.2, 97.55±2.5 และ 2.93±0.14 เรียงตามลำดับ ส่วนสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม เท่ากับ 109.73±4.48, 108.55±4.10, 110.36±3.31, 107.60±2.6 และ 2.62±0.13 เรียงตามลำดับตามตาราง ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (ตารางที่ 2) และ (รูปที่ 1)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ ในตู้อบควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ด้วยการย้อมเซลล์ด้วยวิธีเอสอาร์บี ตามผลการทดสอบในตารางที่ 3 และรูปที่ 2 (รูป A-1 และ A-2)

Table 2 Percent cells viability of *Clinacunthus nutans* and *Moringa oleifera seed oil*

Concentrations of samples	*Clinacunthus nutans*	*Moringa oleifera seed oil*
Negative control (Thermanox™ coverslips)	95.11±3.75	109.73± 4.48
0.01% (v/v)	104.08±4.90	108.55± 4.10
0.1% (v/v)	104.48±3.20	110.36± 3.31
0.5% (v/v)	97.55±2.50	107.60± 2.60
Positive control Polyvinylchloride (PVC)	2.93±0.14	2.62± 0.13

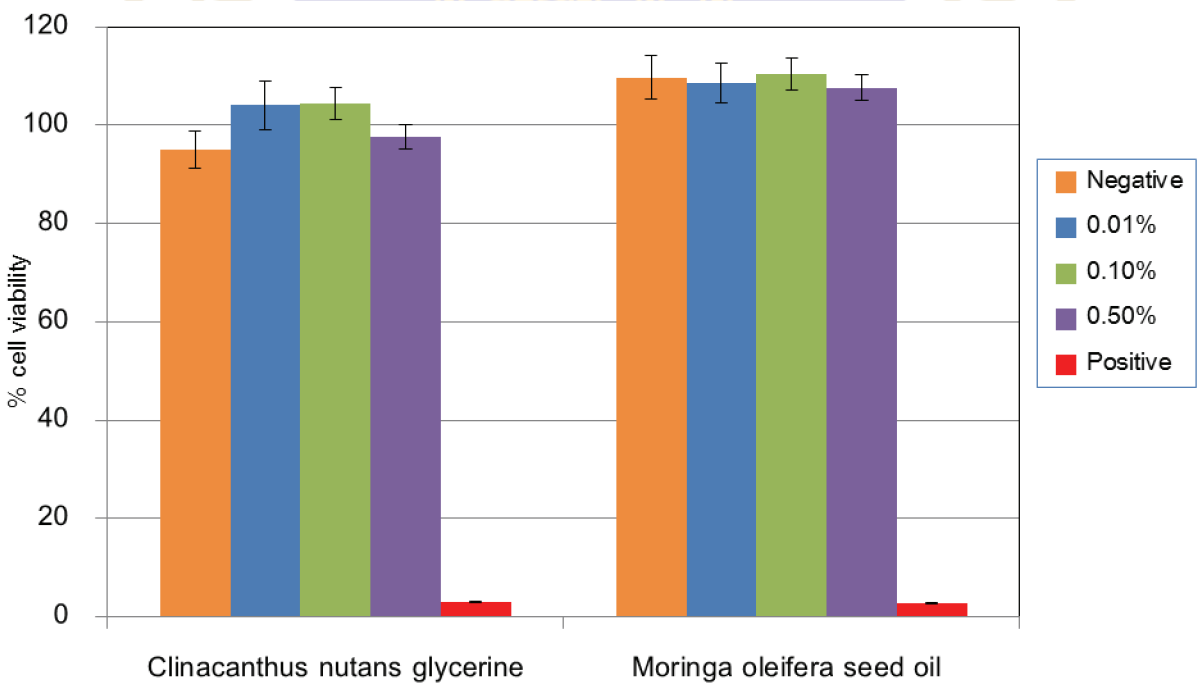


Figure 1 Percent cells viability of Clinacanthus nutans Glycerine and Moringa oleifera seed oil

การคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ ในช่วงระยะที่เป็น exponential phase คือระยะที่เซลล์แบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือวันที่ 3 ถึงวันที่ 6 พบว่าสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 มีเปอร์เซนต์การแบ่งตัวของเซลล์ (% cell proliferation) เท่ากับ117.85±10.37, 125±14.31 และ 130.35±11.35 เรียงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารตัวอย่างทดสอบ (100%) ส่วน ผลการทดสอบในตารางที่ 4 และรูปที่ 3 (รูป B-1 และ B-2) พบว่า สมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.5 มี เปอร์เซนต์การแบ่งตัวของเซลล์เท่ากับ104.28±10.57, 114.28±15.35 และ118.57±11.35 เรียงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารตัวอย่างทดสอบ (100%) พบว่าสารสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยในเหงือกมนุษย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

บทวิจารณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรกลีเซอรีนพญายอและสารสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม พบว่าสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์สร้างเส้นใยในเหงือกมนุษย์ ในวันที่ 8 และภายหลังจากนั้นอัตราการเจริญของเซลล์เริ่มลดลงในอัตราการตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด พบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญของเซลล์อยู่ในระดับต่ำกว่าอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มทดสอบที่ใส่สารสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจากการศึกษามีผู้รายงานเกี่ยวกับสารสกัดสมุนไพรพญายอมีสารสำคัญ คือ เฟลโวนอยด์ เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ลดการอักเสบ[25] ซึ่งมีผู้รายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากใบพญายอขนาด 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลต่อไซโตคายน์ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยไปยับยั้ง interleukin-1-b แต่ไม่มีผลต่อ interleukin-6 [26-27] นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ลดความเจ็บปวด[28-30] และฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส มีผู้รายงานว่าสารสกัดจากใบพญายอสามารถทำลายไวรัส HSV-1 โดยตรงก่อนที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์[31] และสามารถฆ่าเชื้อไวรัสที่เป็นเริม HSV-2 ซึ่งเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยทำลายไวรัสโดยตรง เมื่อไวรัสยังไม่เข้าสู่เซลล์ [31, 32-34] ส่วนสารสกัดสมุนไพรน้ำมันเมล็ดมะรุม สามารถสกัดเป็นน้ำมันได้ น้ำมันเมล็ดมะรุมประกอบไปด้วย Sterol ได้แก่ campesterol, stigmasterol , b-sitosterol , D5-avenasterol , clerosterol , 24-methylenecholesterol , D7-

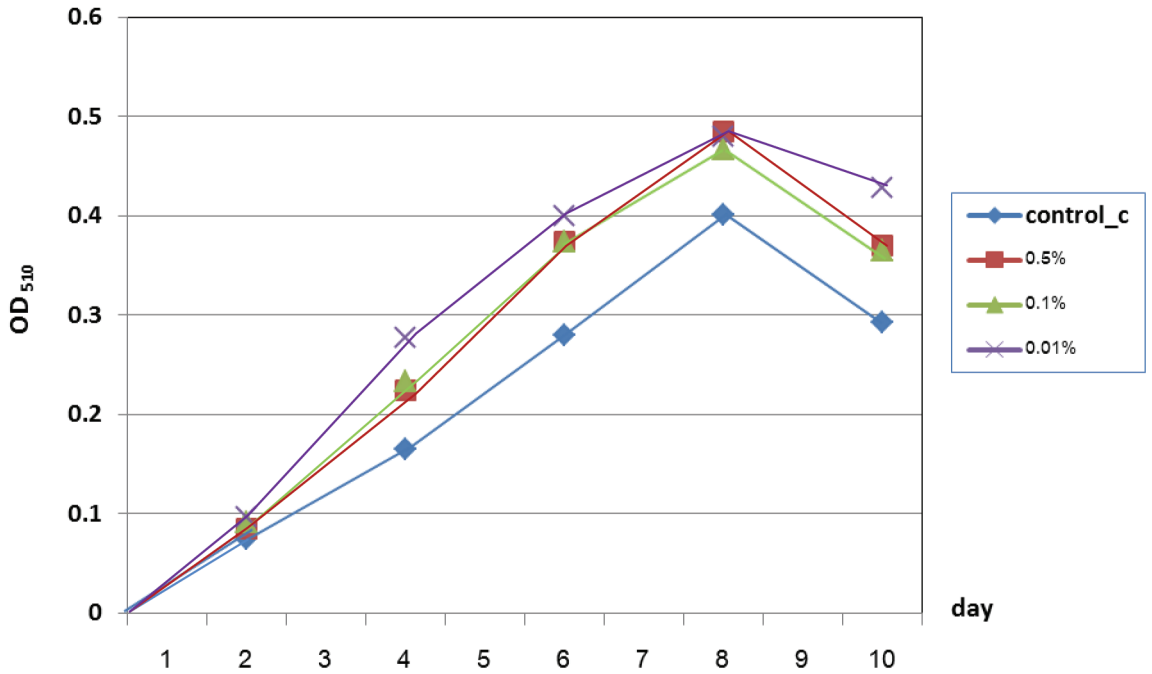
Table 3 Cell Proliferation in HGF cell line of ***Clinacunthus nutans***

Concentrations of samples	% Cell proliferation of Clinacunthus *nutans*
Control	100.00± 4.57
0.01% (v/v)	117.85±10.37
0.1% (v/v)	125.00±14.31
0.5% (v/v)	130.35±11.35

Table 4 Cell Proliferation in HGF cell line of ***Moringa oleifera seed oil***

Concentrations of samples	% Cell proliferation of *Moringa oleifera seed oil*
Control	100.00± 3.57
0.01% (v/v)	104.28±10.57
0.1% (v/v)	114.28±15.35
0.5% (v/v)	118.57±11.35

A-1



A-2

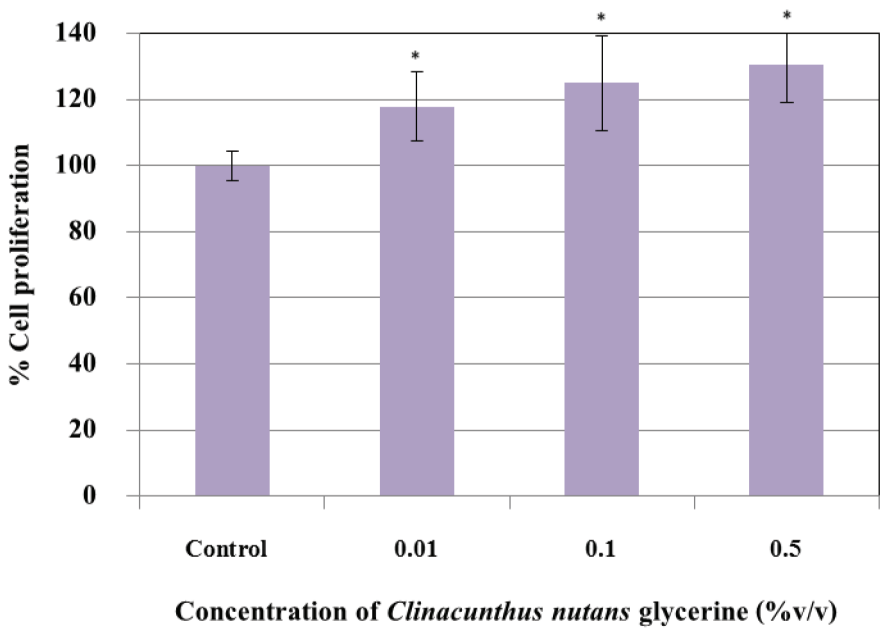
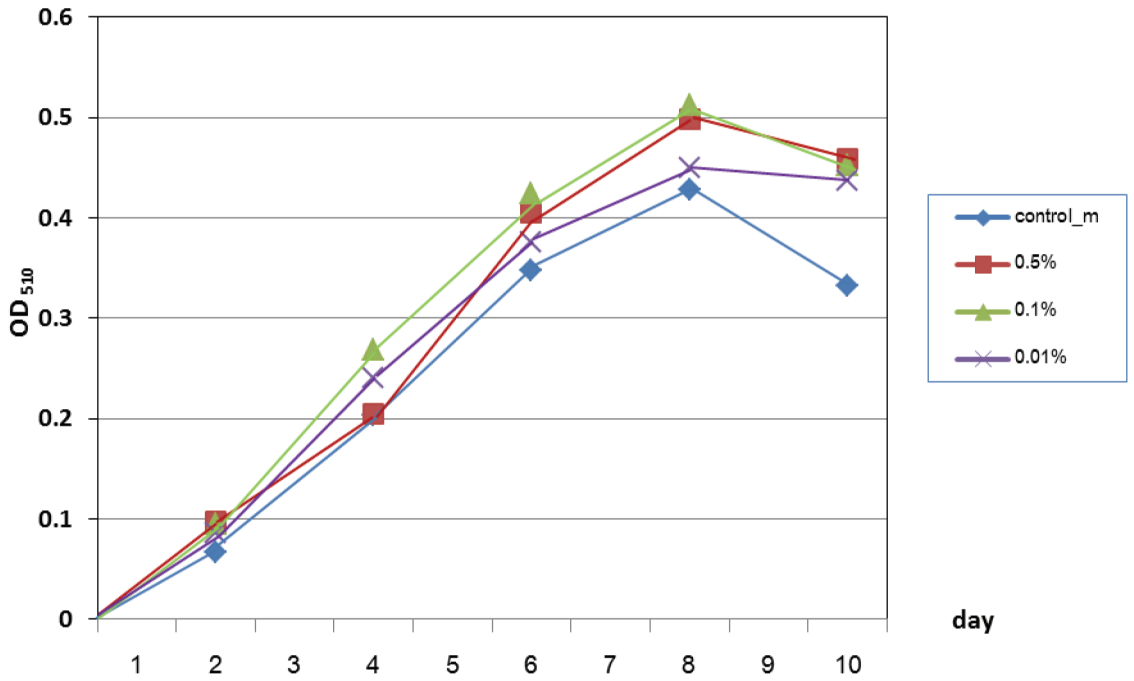


Figure 2 Percentage of cell proliferation compared to the Clinacanthus nutans Glycerine at concentrations of 0.01, 0.1 and 0.5% (v/v) on human gingival fibroblast cell line.

B-1



B-2

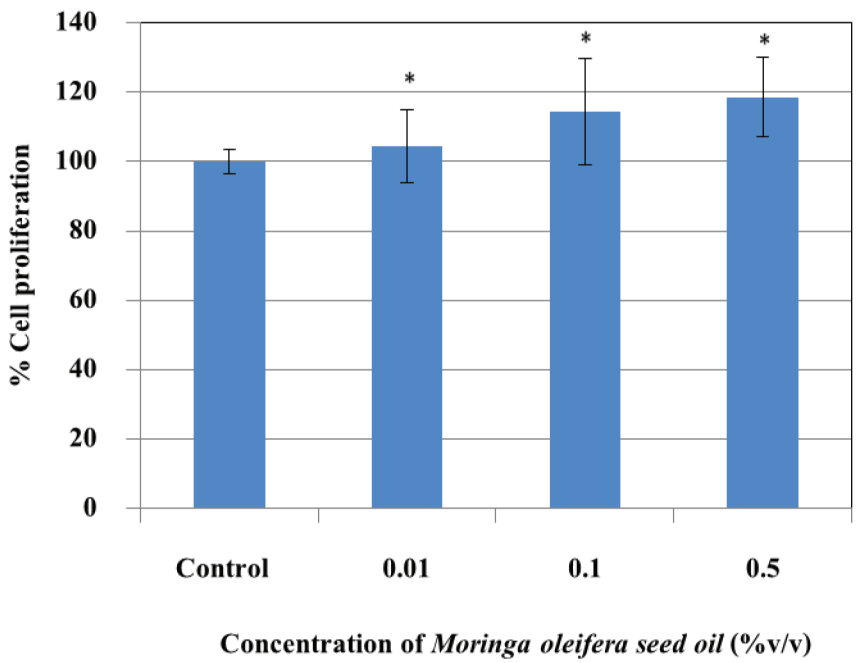


Figure 3 Percentage of cell proliferation compared to the Moringa oleifera seed oil at concentrations of 0.01, 0.1 and 0.5% (v/v) on human gingival fibroblast cell line.

campestanol,stigmastanol และ 28-isoavenasterol นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยกรดไขมันเช่น Oleic oils ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวต่ำ และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยทั้งหมดมีปริมาณน้ำมันสะสมอยู่ 26% ปริมาณฟอสโฟลิปิดต่ำร้อยละ 0.17 น้ำมันที่สกัดได้มีสีเหลืองค่อนข้างใส ไม่พบกรดไซโคลโพรพีน ซึ่งเป็นพิษในน้ำมันเมล็ดมะรุม[35] จากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการวิจัยในระดับเซลล์และสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดน้ำมันจากเมล็ดมะรุมสามารถต้านและกำจัดอนุมูลอิสระได้ และสารสกัดน้ำมันจากเมล็ด พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ที่มีสาเหตุจาก Staphylococcus aureus [36]

จากการทดสอบสมุนไพรไทยทั้ง 2 ชนิดนี้ พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างเส้นใยในเหงือกมนุษย์ ในด้านการประเมินความเป็นพิษไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับรักษาโรคในช่องปากได้ โดยสารมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) โดยผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาสมุนไพรไทยเป็นยารักษาโรคในช่องปากต่อไป

Funding: None
Competing Interests: None declared
Ethical Approval: None (Laboratory study)

เอกสารอ้างอิง

1. Farnsworth NR, Bunyapraphatsara N. ***Thai medicinal plants: recommended for primary health care system.*** Mahidol University, Thailand. 1992.
2. Slots J, Bragd L, Wickstrom M, Dahlen G. The occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults. ***J Clin Periodontol*** 1986; 13: 570-577.
3. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases ***Periodontology*** 2000; 1994: 78- 111.
4. Bascones A, Noronha S, Gomez M, Mota P, Gonzalez Moles MA, Villarroel Dorrego M. Tissues destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? ***Quintessence Int.*** 2005; 36: 299-306.
5. Ibrahim MA. ***Agriculture and food science in Finland*** 2001; 10: 243-259.
6. Satish S, Raveesha KA, Janardhana GR. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. ***Letters in Applied Microbiology*** 1999; 28: 145-147.
7. Talapatra SK, Bhar DS, Talapatra B. Flavonoid and terpenoid constituents of Eupatorium odoratum. ***Phytochemistry*** 1973; 12: 667-668.
8. Bose PK, Chakrabarti P, Chakravarti S, Dutta SP, Barua AK Flavonoid constituents of Eupatorium odorratum. ***Phytochemistry*** 1973; 12: 667-668.
9. ภิญญ์ทิตา มุ่งการดี. การกำจัดความขุ่นของน้ำโดยใช้เมล็ดมะรุม. ***วิศวกรรมสาร มข.*** 2531; 15: 39-43.
10. Ndiaye M, Dieye AM, Mariko F, Tall A, Sall DA, Faye B: Contribution to the study of the anti-inflammatory activity of *Moringa oleifera* (Moringaceae). ***Dakar Med*** 2002; 47: 210-211.
11. Aruna K, Sivaramakrishnan VM: Anticarcinogenic effects of some Indian plant products. ***Food Chem Toxicol*** 1992; 30: 953-956.
12. Siddhuraju P, Becker K: Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree *(Moringa oleifera* Lum.) leaves. ***J Agric Food Chem*** 2003; 51: 2144-2155.
13. Mahajan SG, Mehta AA. Effect of *Moringa oleifera* Lam. Seed extract on ovalbumin-induced airway inflammation in guinea pigs. ***Inhalation Toxicology*** 2008; 20: 897-909.
14. Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, Fujiwara Y, Hashimoto K, Maoka T, Kozuka M, Ito Y, Tokuda H, Nishino H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. ***Mutat Res*** 1999; 440: 181-8.
15. Dahut MU, Memon R. ***Pak J Pharmacol*** 1997; 14(2): 15-21.
16. Villasenor IM, Finch P, Lim-Sylianco CY, dayrit F. Structure of a mutagen from roasted seeds of *Moringa oleifera*. ***Carcinogenesis*** 1989; 10: 1085-7.
17. Tiangburanatam W. ***Dictionary of Thai medicine plants.*** 4th ed. Bangkok: Prachoom Karn Pim; 1996.
18. Satayavivad J, Bunyaoraphatsara N, Kitisiripornkul S,

Tanasomwang W. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of *Clinacanthus nutans* Lindau. ***Thai J Phytopharm*** 1996; 3: 7-17.

19. Kittisiripornkul S, Bunyapraphatsara N, Tanasomwong W, Satayavivat J. The anti-inflammatory action and toxicological studies of Clinacanthus nutans. ***การประชุม Princess Congress I*** 10-13 Dec. 1987, กรุงเทพฯ: AC-5.
20. Satayavivat J, Bunyapraphatsara N, Kittisiripornkul S, Tanasomwong W. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of Clinacanthus nutans (Burm.f.) Lindau. ***Thai J Phytopharm*** 1996; 3: 7-17.
21. Tanasomwong W. The screening of anti – inflammatory action of Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau: ***a critical evaluation of carrangeenan-induced hind paw edema model***. MS Thesis, Mahidol Univ, 1986.
22. Suntararuks S, Satayavivat J, Vongsakul M, Wanichanon C, Thiantanawat A, Akanimanee J. The study of immunologic effects of Clinacanthus nutans extract in male Wister rats. ***The Fourth Princess Chulabhorn Internation Science Congress Chemicals in the 21th Century***, 28 Nov-2 Dec 1999, Bangkok, Thailand: P-24.
23. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. ***Nat Protoc***. 2006; 1: 112-6.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. ***J Immuno Methods.*** 1983; 65: 55-63.
25. Chuakul W. Chemical study of the antiinflammatory agents from the leaves of Phayaa Plong Thong, *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. ***M. Sc. Thesis***, Faculty of Pharmacy, Mahidol Univ, Thailand, 1986.
26. Thamaree S, Rugrungtham K, Ruangrungsi N, Thaworn N, Kemsri W. The inhibitory effects of extracts of some herbal medicines on the production of proinflammatory cytokines by *in vitro* stimulated human blood cells. ***Thai J Pharm Sci*** 1998; 22: S47.
27. Thamaree S, Rugrungtham K, Ruangrungsi N, Thaworn N, Kemsri W. The inhibitory effects of andrographolide and extracts of some herbal medicines on the production of proinflammatory cytokines by LPS-stimulated human blood cells. ***Chula Med J*** 2001; 45: 661-70.
28. Satayavivad J, Bunyapraphatsara N, Kitisiripornkul S, Tanasomwang W. Analgeric and anti-inflamatory activities of extracts of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. ***Thai J Phytopharm*** 1996; 3: 7-17
29. สุภาณี พิมพ์สมาน วิไลลักษณ์ ชินะจิตร ฉันทนา อารมย์ดี สาธร พรตระกูลพิพัฒน์ จริยา หาญวจนวงศ์ พัชรีวัลย์ ปั้นเหน่งเพ็ชร พิสมัย เหล่าภัทรเกษม. การศึกษาศักยภาพของพญายอเพื่อประโยชน์ทางการเกษตรและคลินิก. ***การสัมมนาการเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพร, กรุงเทพฯ***, 31 ก.ค. – 1 ส.ค. 46: 71-82.
30. Kittisiripornkul S, Bunyapraphatsara N, Tanasomwong W, Satayavivad J. The antiinflammatory action and toxicological studies of *Clinacanthus nutans*. ***การประชุม Princess Congress I, Bangkok, Thailand***, 10-13 Dec 1987.
31. ชุตินันท์ กันตสุข. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด. ***วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย***, 2534.
32. Suwanna V, Kanchana D and Risara J. Antiviral drug activity of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau. to human *Herpes* type 2 *in viro* cells. ***Mahidol University Annual Research Abstracts***, Jan 1- Dec 31, 1992.
33. ชื่นฤดี ไชยวสุ และคณะ. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบเสลดพังพอนและใบพญายอต่อเชื้อ *Herpes Simplex* virus type-2 ในหลอดทดลอง. ***วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*** 2535; 34: 153-8.
34. Rattanakiat S. Anti-*Herpes simplex* virus type 2 activity of some Thai medicinal plant extracts. ***รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ***, 2002.
35. จันทนา ก่อนเก่า. การพัฒนาน้ำมันพืชชนิดใหม่เพื่ออุตสาหกรรม. ***วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี***, 2539.
36. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร (ออนไลน์). มะรุมพืชที่ทุกคนอยากรู้. วันที่สืบค้นข้อมูล 9 สิงหาคม 2555. จาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เวปไซต์ ***http: //www.medplant.mahidol.ac.th/document/moringa.asp***