



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาผลและกลไกการรักษาภาวะกระดูกพรุนของพืช
สมุนไพรไทยกวาวเครือขาวในหนูแรท

โดย

สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์
วัชรภรณ์ ดิยะสัตย์กุลโกวิท

ธันวาคม ๒๕๕๖

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สัญญาเลขที่ R_006_2555 ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. นรัตถพล เจริญพันธุ์ จาก ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับการศึกษาเซลล์กระดูกในหลอดทดลอง

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาผลและกลไกการรักษภาวะกระดูกพรุนของพืชสมุนไพรไทยกวาวเครือขาวในหนูแรท

ชื่อผู้วิจัย สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ และ วัชรภรณ์ ตริยะสัจย์กุลโกวิท

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2556

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาวต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูก และการออกฤทธิ์ผ่านตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์สร้างกระดูก osteoblast ของหนูแรท ในหลอดทดลอง โดยทำการทดลองในเซลล์ 2 ชนิด คือ osteosarcoma cell line UMR-106 และ primary rat osteoblast cells และให้สาร genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L, puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L และสารสกัดกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µg/mL นาน 48 ชั่วโมง เทียบผลการทดลองที่ได้กับ 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) และ 0.3% DMSO (กลุ่มควบคุมเชิงลบ) พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในกวาวเครือขาวไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ UMR106 แต่ไปกระตุ้นการเจริญของ primary rat osteoblast cells เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี BrdU assay ในขณะที่ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูก คือ alkaline phosphatase (ALP) แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน runx2, osterix และ osteocalcin ซึ่งตรวจวัดโดยวิธี real-time RT-PCR พร้อมกับกระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูกที่เมื่อตรวจดู bone nodule จากการย้อมสีเซลล์ด้วย Alizarin red S staining เห็นเป็นสีแดง ทั้งในเซลล์ UMR106 และ primary rat osteoblast cells เมื่อตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation) คือ receptor activator of nuclear factor KB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) โดยวิธี real-time RT-PCR พบว่า สารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในกวาวเครือขาวไปลดการแสดงออกของ RANKL แต่กระตุ้น OPG จึงทำให้ RANKL/OPG ratio ลดต่ำลงในเซลล์ UMR106 แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ primary rat osteoblast cells โดยพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวผ่านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์ UMR-106 เพราะการแสดงออกของยีน osterix, ALP และ osteocalcin ในเซลล์ UMR106 ที่เคยถูกกระตุ้นเมื่อได้รับ E_2 , GEN, PU และ PM กลับลดลงมาเท่ากับกลุ่มควบคุม เมื่อให้ estrogen receptor antagonist (ICI 182780) ก่อนการทดสอบสาร โดยสรุปสารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในกวาวเครือขาวสามารถกระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูกได้โดยไปกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกในระยะต้น และไปยับยั้งการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก ดังนั้นผลจากการทดลองในครั้งนี้จึงช่วยสนับสนุนศักยภาพของกวาวเครือขาวที่จะพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนในคน ต่อไปในอนาคต

Project title Study of the therapeutic effects and mechanisms of *Pueraria mirifica* herb on bone loss in rats

Names of the Investigators Suchinda Malaivijitnond and Wacharaporn Tiyasatkulkovit

Year December 2013

Abstract

This study aims to investigate the mechanism of actions of *Pueraria mirifica* (PM) extract and its major phytoestrogens (puerarin and genistein) via estrogen receptors (ERs) on rat osteoblast cells in *in vitro*. Two types of cells, osteosarcoma cell line UMR-106 and primary rat osteoblast cells were incubated for 48 hours with 0.1, 10 and 1000 nmol/L of genistein (GEN), 0.1, 10 and 1000 nmol/L of puerarin (PU), and 1, 10 and 100 µg/mL of PM extract in comparison with 10 nmol/L of 17β-Estradiol (positive control) and 0.3% DMSO (negative control). It was found that the PM extract, PU and GEN inhibited the proliferation of the UMR106 cells, but stimulated the proliferation of the primary rat osteoblast cells, detected by BrdU assay. However, PM extract and phytoestrogens stimulated the expression of genes associated with osteoblast differentiation, alkaline phosphatase (ALP), and had no effects on runx2, osterix and osteocalcin, measured by real-time RT-PCR technique, and stimulated bone mineralization, determined by Alizarin red S staining both in UMR106 and primary rat osteoblast cells. The expression of genes associated with osteoclast differentiation, i.e., receptor activator of nuclear factor κB (RANKL) was suppressed, and osteoprotegerin (OPG) and RANKL/OPG ratio were increased in UMR106, but those genes were not changed in primary rat osteoblast cells. The mechanism of action was passed through ER of the UMR106 cells, because the expression of osterix, ALP and osteocalcin, which were stimulated by E₂, GEN, PU and PM, were ablated by co-incubation with estrogen receptor antagonist (ICI 182780). From this study, it can conclude that the PM extract and its phytoestrogens can increase bone formation via stimulation of pre-osteoblast differentiation and suppression of osteoclast maturation. The positive effects of this study can corroborate the high potential of the PM herb to be developed as anti-osteoporotic drug for human use in the near future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการภาพประกอบ	v
รายการสัญลักษณ์	vi
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีการวิจัย	8
ผลการวิจัย	17
การอภิปรายผล	39
เอกสารอ้างอิง	42
ส่วนผนวก (ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์)	45

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1	2
รูปที่ 2	3
รูปที่ 3	4
รูปที่ 4	17
รูปที่ 5	18
รูปที่ 6	18
รูปที่ 7	19
รูปที่ 8	20
รูปที่ 9	21
รูปที่ 10	22
รูปที่ 11	23
รูปที่ 12	24
รูปที่ 13	25
รูปที่ 14	26
รูปที่ 15	27
รูปที่ 16	28
รูปที่ 17	29
รูปที่ 18	29
รูปที่ 19	30
รูปที่ 20	31
รูปที่ 21	31
รูปที่ 22	32
รูปที่ 23	33
รูปที่ 24	34
รูปที่ 25	35
รูปที่ 26	36
รูปที่ 27	.37
รูปที่ 28	38

รายการสัญลักษณ์

μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
μM	=	Micromolar
ALP	=	Alkaline phosphatase
BCA	=	Biconchonic acid
BMC	=	Bone mineral content
BMD	=	Bone mineral density
BrdU	=	5-Bromo-2'- deoxyuridine
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
cm ²	=	Square centimeter
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
E ₂	=	17β-estradiol
ECM	=	Extracellular matrix
ER	=	Estrogen receptor
ER α	=	Estrogen receptor alpha
ER β	=	Estrogen receptor beta
HPLC	=	High performance liquid chromatography
mg	=	Milligram
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
MS	=	Mass spectrometer
MTT	=	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nM	=	Nanomolar
nm	=	Nanometer
OPG	=	Osteoprotegerin
PBS	=	Phosphate-buffered saline

PCR	=	Polymerase chain reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
qRT-PCR	=	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RANKL	=	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Runx2	=	Runt-related transcription factor 2
SERMs	=	Selective estrogen receptor modulators
Vol	=	Volume

บทนำ

กระดูกพรุน (osteoporosis) เป็นภาวะที่กระดูกมีความหนาแน่นของเนื้อกระดูกน้อยกว่าปกติ ทำให้กระดูกบางและเปราะ เสี่ยงต่อกระดูกหักง่ายขึ้น (Kanis et al., 1994) ในปัจจุบันอุบัติการณ์ของโรคกระดูกพรุนมีแนวโน้มสูงขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากอายุเฉลี่ย ของประชากรส่วนใหญ่สูงขึ้น ดังนั้นจึงพบโรคกระดูกพรุนได้ในผู้หญิงและผู้ชายวัยทอง (Pongchaiyakul et al., 2006) สาเหตุสำคัญที่ เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนคือภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (Riggs, 1982; Ohta et al., 2002) ถึงแม้ว่าการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement therapy) เป็นวิธีการที่ใช้ในการรักษา หรือป้องกันภาวะกระดูกพรุน ที่มีประสิทธิภาพ แต่พบว่าการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ได้แก่ ก่อให้เกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุ โพรมมดลูก มะเร็งต่อมลูกหมาก และเสี่ยงต่อภาวะลิ่มเลือดอุดตัน เป็นต้น (Canavan and Doshi, 1999; Lissin and Cooke, 2000; Fontanges et al., 2004; Smith, 2006) ด้วยตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นดังกล่าว จึงได้มีการศึกษา วิจัย และค้นคว้ายา ที่ใช้รักษา หรือป้องกันโรคกระดูกพรุน เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น และด้วยประชากรไทยส่วนใหญ่ มีฐานะยากจน ทำให้ผู้ที่เป็โรค กระดูกพรุนไม่สามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาพืชสมุนไพรท้องถิ่นภายในประเทศเพื่อพัฒนาเป็นยา ในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุน เพื่อลดต้นทุนในการผลิตและการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งสามารถนำไปใช้กับ ประชาชนได้อย่างเหมาะสม และไม่มีผลข้างเคียง

กวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatbandhu เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่พบได้ทั่วประเทศไทย ส่วนหัวของ กวาวเครือขาวมีสารไฟโตเอสโตรเจนเป็นส่วนประกอบอย่างน้อย 17 ชนิด โดยสารหลักเป็นพวก isoflavanoids ได้แก่ daidzin, genistin, daidzein, genistein และ puerarin (Malavijitnond, 2012) ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงสามารถ จับกับตัวรับ (estrogen receptors) และออกฤทธิ์ได้เหมือนกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กวาวเครือขาว สามารถป้องกัน (Urasopon et al., 2007; 2008) และรักษา (ผลการทดลองจากโครงการนี้ในปีที่ 1) การสูญเสียมวลกระดูก และความ หนาแน่นกระดูก ในหนูแรพเทคเมียและเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบังเพศออก โดยขึ้นอยู่กับขนาดของ กวาวเครือขาวที่ให้ และไม่มีผลแตกต่างกันระหว่างเพศ จากผลงานการวิจัยทั้งหมดนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวสามารถ แสดงผลต่อกระดูกได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามในการที่จะนำกวาวเครือขาวไปผลิตเป็นยาป้องกันและรักษาโรค กระดูกพรุน จำเป็นที่จะต้องเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อเซลล์กระดูกเสียก่อน ดังนั้นในครั้งนี (ปีที่ 2) จึงทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเซลล์กระดูกของหนูแรพ (ทั้งชนิด osteosarcoma และ primary osteoblast cell) ในหลอดทดลอง (in vitro) โดยจะติดตามดูผลของของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการเจริญของเซลล์กระดูก การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และการสร้างเนื้อกระดูก (mineralization)

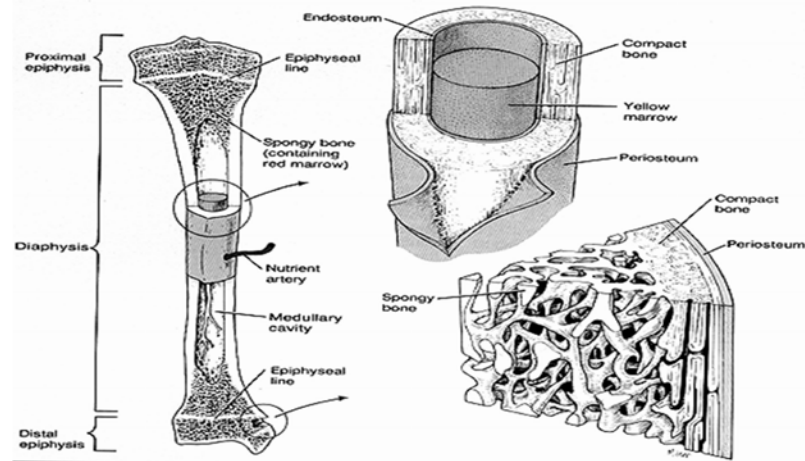
วัตถุประสงค์ของโครงการ (ปีที่ 2)

1. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาวต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูก ต่อเซลล์กระดูกของหนูแรพ ในหลอดทดลอง
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาวผ่านตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์สร้างกระดูก osteoblast

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระดูก (Bone)

กระดูก เป็นอวัยวะสำคัญมีหน้าที่ช่วยในการเคลื่อนไหวของร่างกาย ค้ำจุน และปกป้องอวัยวะภายใน รวมทั้งเป็นแหล่งสะสมแร่ธาตุที่สำคัญของร่างกาย โดยเฉพาะแคลเซียม และฟอสฟอรัส กระดูกแต่ละชิ้นประกอบด้วยเนื้อกระดูกที่มีโครงสร้างแตกต่างกันสองชนิดคือ กระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) และกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) (รูปที่ 1) โดยกระดูกเนื้อแน่นจะพบอยู่ด้านนอกของกระดูก มีช่องว่างระหว่างเนื้อกระดูกน้อย มีความหนาแน่นสูง พบเป็นโครงสร้างส่วนใหญ่ของกระดูกบริเวณ diaphysis กระดูกเนื้อโปร่งพบด้านในของกระดูก มีลักษณะโปร่งบาง สานกันเป็นโครงตาข่าย ทำหน้าที่ช่วยกระจายแรงในการรับน้ำหนัก และเป็นที่อยู่ของหลอดเลือด และไขกระดูก พบมากบริเวณกระดูกส่วน metaphysis และ epiphysis บริเวณนอกสุดของกระดูกจะหุ้มด้วยเยื่อหุ้มกระดูก

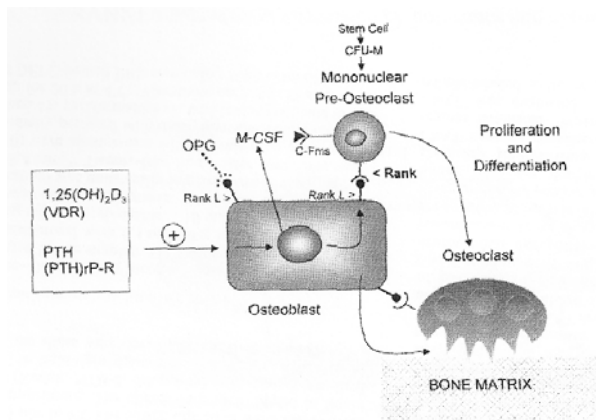


รูปที่ 1 โครงสร้างของกระดูกยาว (long bone) ประกอบด้วยกระดูกเนื้อแน่น และกระดูกเนื้อโปร่ง

ส่วนประกอบหลักของกระดูก ได้แก่ 1) osteoid ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ ทำให้กระดูกมีความยืดหยุ่น 2) calcium phosphate ซึ่งอยู่ในรูปของ hydroxyapatite ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}(\text{OH})_2$) โดยสะสมตัวอยู่ในช่องว่างระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจน ทำให้กระดูกเกิดการแข็งตัว และ 3) เซลล์กระดูก ซึ่งมีอยู่สามชนิดด้วยกัน คือ osteoblast เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างกระดูก osteoclast เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีหลายนิวเคลียส ทำหน้าที่ในการสลายกระดูก และ osteocyte ซึ่งเป็น osteoblast ที่เจริญเต็มที่แล้ว โดยปกติแล้วเซลล์ทั้งสามชนิดนี้ทำงานร่วมกัน เพื่อทำให้เกิดกระบวนการซ่อม สร้าง และสลายกระดูก (bone remodeling cycle) ซึ่งเป็นวงจรที่เกิดขึ้นตลอดเวลา เพื่อคงสมดุล และความแข็งแรงของกระดูก (Nakamura, 2007)

โดยพบว่า osteoblast และ osteoclast จะมีการทำงานที่ประสานกัน (รูปที่ 2) โดยมียีนหลายชนิดที่ควบคุมการเจริญ (development) ของ osteoblast เช่น Core binding factor A1 (Cbfa1) หรือ Runx2, Osf2 และ AML3 (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997) โดยยีนเหล่านี้จะมีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) และการเจริญ (maturation) โดยไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนหลายชนิด เช่น osterix, osteoponin, osteocalcin, bone sialopactin, type I collagen, receptor

activator of nuclear factor KB (RANK-L) และ osteoprotegerin (OPG) osteocalcin และ osteoponin จะช่วยในการสะสมแคลเซียม (mineralization) ในขณะที่ RANK-L และ OPG จะควบคุมการทำงานของ osteoclast โดย RANK-L จะจับกับ RANK receptor ที่อยู่บน pre-osteoclast (osteoclast precursor) ซึ่งจะไปกระตุ้น pre-osteoclast ให้กลายเป็น mature osteoclast ที่สามารถทำหน้าที่สลายกระดูกได้ ในขณะที่ OPG สามารถจับกับ RANK-L ได้ ทำให้ RANK-L ไม่สามารถจับกับ RANK receptor ที่ pre-osteoclast ได้ ดังนั้น pre-osteoclast จึงไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น mature osteoclast ได้ การสลายกระดูกจะลดลง



รูปที่ 2 แสดงการทำงานประสานกันระหว่าง osteoblast และ osteoclast ในการควบคุมสมดุลของกระดูก M-CSF และ OPG/RANKL เป็น osteoblast factor ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของ osteoclast

ฮอร์โมนสำคัญที่มีบทบาทในการควบคุมสมดุลของกระดูก คือ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone) และฮอร์โมนแคลซิโตนิน (calcitonin) ฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้จะทำหน้าที่ตรงข้ามกัน โดยฮอร์โมนพาราไทรอยด์จะทำหน้าที่สลายกระดูกและฮอร์โมนแคลซิโตนินจะช่วยในการสร้างกระดูก (Jane and Gary, 2001)

Bone remodeling cycle ประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ ที่แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ (**รูปที่ 3**)

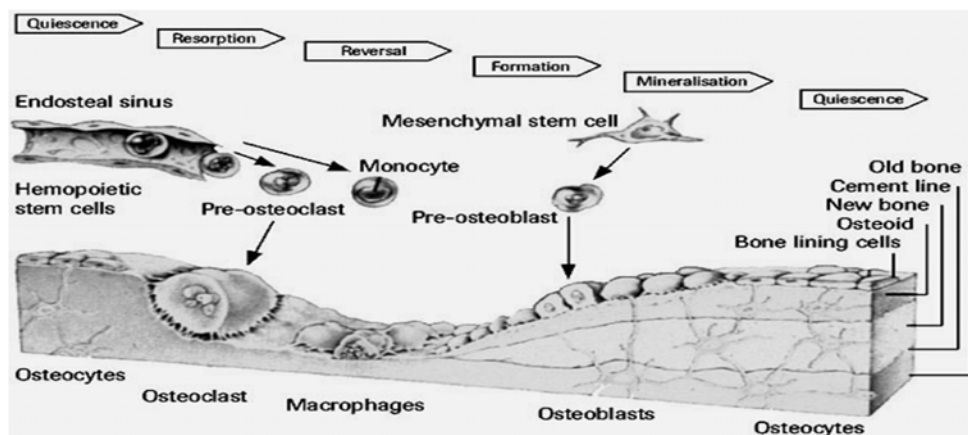
Resorption phase คือ กระบวนการสลายเนื้อกระดูก โดย osteoclast จะใช้ส่วนของ ruffle border วางตัวบริเวณผิวกระดูกส่วนที่จะมีการสลายเนื้อกระดูก จากนั้นจะหลั่งไฮโดรเจนไอออน (H^+) และหลั่ง hydrolytic enzyme เพื่อสลายกระดูก ทำให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมฟอสเฟตออกมา ในขณะที่เกิดกระบวนการสลายกระดูก osteoclast จะหลั่งเอนไซม์ Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) ออกมา ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการ dephosphorylation เกิดการสลายเนื้อกระดูก ทำให้กระดูกเกิดเป็นหลุมเล็กๆ ขึ้น

Reversal phase ภายหลังจากที่มีการสลายกระดูกแล้ว จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวพวก macrophages มาเก็บกินซากกระดูก มีกลุ่ม mononuclear cells (pro-osteoblasts) มายังตำแหน่งที่มีการสลายกระดูก และเริ่มเข้าสู่กระบวนการสร้างกระดูกต่อไป

Formation phase คือ กระบวนการสร้างกระดูก โดย osteoblast จะสังเคราะห์ และหลั่ง osteoid ล้อมรอบตัวเอง หลังจากนั้นจะหลั่ง pyrophosphate และแคลเซียม ออกมาจนกระทั่งความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์สูงเกินกว่าที่จะละลายได้ osteoblast จะหลั่ง เอนไซม์ alkaline phosphatase ออกมาเพื่อสลาย (hydrolyze) pyrophosphate ทำให้

เกิดการสะสมตัวของแคลเซียม ที่ช่องว่างระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจน ซึ่งเรียกระบวนการนี้ว่า mineralization ทำให้ osteoblast ค่อยๆ ถูกดันให้ออกห่างจากผิวกระดูก แล้วเปลี่ยนไปเป็น osteocyte

Quiescence phase เป็นระยะภายหลังจากที่เกิดกระบวนการสร้างกระดูกเสร็จสิ้นแล้ว (Hill and Orth, 1998; Nakamura, 2007)



รูปที่ 3 แสดงกระบวนการ bone remodeling cycle ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสลายกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoclast และกระบวนการสร้างกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoblast

Bone remodeling cycle เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตลอดเวลา ตั้งแต่เกิดจนตาย เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้กระดูกมีการเจริญพัฒนา และซ่อมแซมกระดูกให้มีความแข็งแรงอยู่เสมอ ถ้ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับกระบวนการดังกล่าว เช่น เกิดกระบวนการสลายกระดูกมากกว่าการสร้างกระดูก จะทำให้มีการสูญเสียเนื้อกระดูก มวลกระดูกลดลง และอาจทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ในที่สุด

ภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis)

กระดูกพรุน คือ ภาวะที่กระดูกมีความหนาแน่นของเนื้อกระดูกลดน้อยลง รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างระดับจุลภาคของเนื้อเยื่อกระดูก ส่งผลให้กระดูกเปราะบาง ไม่สามารถรับน้ำหนัก หรือแรงกดได้ตามปกติ ทำให้กระดูกหักได้ง่าย (Kanis et al., 1994) โดยตำแหน่งที่หักบ่อย ได้แก่ กระดูกสันหลัง (spinal vertebra) กระดูกสะโพก (hip) และกระดูกข้อมือ (wrist) กลไกในการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้นเกิดได้จากสองกลไกด้วยกันคือ 1)เกิดจาก bone turnover สูงขึ้น เนื่องจากกระดูกมี remodeling unit เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดอัตราการสลายกระดูกมากขึ้นกว่าปกติ และ 2)เกิดจากกระบวนการ bone remodeling cycle imbalance โดยพบว่าเกิดกระบวนการ bone resorption มากกว่า กระบวนการ bone formation ซึ่งการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้น อาจเกิดจากกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือเกิดจากทั้งสองกลไกพร้อมกันได้ (Compson, 2001)

ฮอร์โมนเอสโตรเจน มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการรักษาสมดุลของกระดูก (Compson et al., 1990) โดยเอสโตรเจนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ osteoclast ทำให้เกิดกระบวนการ bone resorption ลดลง จากที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า

กระบวนการ bone remodeling cycle เกิดจากการทำงานของ osteoblast และ osteoclast พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิด มีตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptors) ทั้งชนิดแอลฟา (estrogen receptor alpha; ER α) และเบต้า (ER β) (Bland, 2000) ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนจะสามารถแสดงฤทธิ์ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ทั้งสองชนิดได้ โดยการจับกับตัวรับของเอสโตรเจน เมื่อมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จะมีการสร้าง cytokines จาก osteoblast และ osteoblast progenitor cells มากขึ้น cytokines เหล่านี้ได้แก่ interleukin - 1 (IL-1), interleukin - 6 (IL-6) และ tumor necrosis factor - alpha (TNF- α) ซึ่งพบว่า cytokines เหล่านี้จะมีผลทำให้ osteoclast มีอายุยาวนานขึ้น และทำให้ progenitor cell เจริญไปเป็น mature osteoclast ได้มากขึ้น (Huges and Boyce, 1997; Jimi et al., 1996) ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนยังมีผลต่อการทำงานของ osteoblast พบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนกระตุ้นให้ osteoblast สร้าง type I collagen มากขึ้น (Nakamura, 2007) และยับยั้งการเกิดกระบวนการ apoptosis ของ osteoblast เมื่อมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงมีผลทำให้กระบวนการ bone formation เกิดขึ้นน้อยลง ด้วยเหตุผลดังกล่าว เมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนจึงทำให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการ bone remodeling cycle ขึ้น ทำให้มีการสูญเสียมวลกระดูกมากกว่าปกติ และเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดกระดูกพรุนตามมา

ภาวะกระดูกพรุนเป็นภาวะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่สามารถหยุดยั้งการสูญเสียมวลกระดูกไม่ให้เกิดเพิ่มมากขึ้น และลดอัตราการเกิดกระดูกหักได้ ดังนั้นการป้องกันจึงเป็นวิธีการที่ดีที่สุด แต่คนส่วนใหญ่มักไม่เห็นความสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้เกิดภาวะกระดูกพรุน จนกระทั่งมีอาการจึงจะเข้ารับการรักษา ปัจจุบันการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนทำได้โดย การออกกำลังกาย รับประทานอาหารที่มีปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอ หลีกเลี่ยงการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และงดสูบบุหรี่ ส่วนในผู้หญิงที่ผ่าตัดรังไข่ออก และผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จะให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน พบว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนสามารถลดอุบัติการณ์เกิดกระดูกหักได้ (Tongeson and Bell., 2001) แต่อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ได้แก่ ก่อให้เกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก มะเร็งต่อมลูกหมาก และเสี่ยงต่อภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (Sulak 1997; Canavan and Doshi, 1999; Lissin and Cooke, 2000; Fontanges et al., 2004; Smith, 2006) เป็นต้น ด้วยตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นดังกล่าว จึงได้มีการศึกษา วิจัย และค้นคว้ายา ที่ใช้รักษา หรือป้องกันภาวะกระดูกพรุน เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ 1) กลุ่มที่ยับยั้งกระบวนการสลายกระดูก (antiresorptive agents) ได้แก่ bisphosphonates ซึ่งเป็นยาที่สามารถยับยั้ง osteoclast activity และกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของ osteoclast ส่งผลให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกลดน้อยลง (Papapoulos, 2008) 2) กลุ่มที่กระตุ้นกระบวนการสร้างกระดูก (anabolic agent) โดยยากกลุ่มนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้เพื่อเพิ่มมวลกระดูก ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ซึ่งพบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์สามารถเพิ่มกระบวนการสร้างกระดูกโดยการกระตุ้น osteoblast activity สามารถเพิ่มจำนวนของ osteoblast และยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของ osteoblast cells ได้ (Deal, 2009) แต่พบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์มีผลข้างเคียง คือ ทำให้เกิดอาการวิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ และ อาเจียน และผลที่ได้ยังไม่แน่นอน จึงยังไม่เป็นที่นิยมที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุน นอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนทั้งสองกลุ่ม ยังมีราคาสูง และต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ที่มีภาวะ

กระดูกพรุนไม่สามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะประชากรไทยส่วนใหญ่ ที่มีฐานะยากจน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสมุนไพรท้องถิ่นภายในประเทศ เพื่อพัฒนาเป็นยาในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุน เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และการนำเข้ยาจากต่างประเทศ อีกทั้งสามารถนำไปใช้กับประชาชนได้อย่างเหมาะสม และไม่มีผลข้างเคียง

ผลของไอโซฟลาโวน (Isoflavones) ต่อกระดูก

ไอโซฟลาโวนเป็นสารไฟโตเอสโตรเจน ที่พบมากในพืช เช่น ถั่วเหลือง มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ไอโซฟลาโวน ได้แก่ daidzin, genistin, daidzein, genistein และ puerarin สามารถจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Murkies et al., 1998; Chen and Anderson, 2002) ได้มีการศึกษาพบว่าไอโซฟลาโวนมีผลกระตุ้นการสร้างกระดูก จากการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกกับ genistein ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-5} โมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเนื้อเยื่อ และเพิ่ม alkaline phosphatase activity ซึ่งเป็น bone formation marker ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yamaguchi and Gao, 1998) และเมื่อทำการยับยั้ง osteoclast ด้วย tartrate – resistant acid phosphatase ซึ่งเป็น bone resorption marker พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ genistein จะมีจำนวนของ osteoclast ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gao and Yamaguchi., 1999) และจากการศึกษาในเซลล์กระดูกพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง osteoblast MC3T3-E1 ร่วมกับ genistein และ daidzein ที่ความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-5} โมลาร์ สามารถเพิ่ม alkaline phosphatase activity และ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sugimoto and Yamaguchi, 2000) ในปี 2007 Zhang และคณะ พบว่าเมื่อเลี้ยง osteoblast ร่วมกับ puerarin ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 ไมโครโมล/ลิตร มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ และเพิ่ม alkaline phosphatase activity ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาของ Ishimi และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 พบว่า การให้ genistein ขนาด 0.4 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อวัน นาน 4 สัปดาห์ ในหนูขาวเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ พบว่า สามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกของกระดูกต้นขาได้

กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่พบได้เฉพาะในประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu เป็นไม้เลื้อย และมีหัวอยู่ใต้ดินเพื่อสะสมอาหาร ส่วนหัวของกวาวเครือขาว ถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ทดแทนฮอร์โมนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน เป็นต้น กวาวเครือขาวสามารถออกฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ ได้เหมือนกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการทดลองให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวแก่สัตว์ทดลองพบว่ากวาวเครือขาวสามารถไปกระตุ้นการเจริญของเซลล์เยื่อบุมดลูกและเซลล์เยื่อบุน้ำช่องคลอดในหนูแรทเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ (Malavijitnond et al., 2004; 2006; Cherdshewasart et al., 2007a) สามารถลดระดับของลูทีไนซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone; LH) และฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (follicle stimulating hormone; FSH) ในหนูแรทเพศผู้และเพศเมีย (Malavijitnond et al., 2004) และในลิงหางยาวเพศเมีย (Trisomboon et al., 2004; 2006) และพบว่าสามารถบรรเทาอาการภายหลังหมดประจำเดือนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ เช่น อาการร้อนวูบวาบ หรือนอนไม่หลับได้ เป็นต้น (Muangman and Cherdshewasart, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่ากวาวเครือขาวสามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งเต้านมในหนูแรทเพศเมียที่ถูกชักนำด้วยสารก่อมะเร็ง 7,12-DMBA ได้อย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้

(Cherdshewasart et al., 2007b) และเมื่อให้สารสกัดกวาวเครือขาวที่ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสามารถไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในหลอดทดลองได้ (Cherdshewasart et al., 2004) จากการศึกษาพิษเรื้อรังของกวาวเครือขาวในขนาด 5 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในหนูแรท นาน 6 เดือน พบว่ากวาวเครือขาวไม่แสดงความเป็นพิษ นั่นคือ ไม่มีผลต่อการทำงานของตับ ไต และน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์ และอวัยวะภายใน (Manosroi et al., 2004) และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังในกระต่ายและหนูตะเภา (Cherdshewasart et al., 2003)

ส่วนหัวของกวาวเครือขาวประกอบไปด้วย สารไฟโตเอสโตรเจนหลายชนิด ที่พบมากได้แก่ กลุ่มของไอโซฟลาโวน ซึ่งประกอบด้วย daidzin, daidzein, genistin, genistein, puerarin และ mirificin เป็นต้น (Chanakaow et al., 2000; Ingham et al., 2002; Cherdshewasart et al., 2007a; 2008; Urasopon et al., 2008b) ซึ่งสารไอโซฟลาโวนเหล่านี้ มีรายงานว่า มีผลกระตุ้นการเจริญของกระดูก ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กวาวเครือขาวสามารถลดระดับของฮอร์โมนพาราไทรอยด์ และระดับแคลเซียมในซีรัม ในลิงหางยาวแก่เพศเมียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Trisomboon et al., 2004) และต่อมา Urasopon และคณะ (2007 และ 2008a) ได้ทำการศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวทันทีที่ภายหลังจากการตัดต่อมบังเพศออก (ตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และตัดอัณฑะออกในหนูแรทเพศผู้ และหนูยังไม่ได้แสดงภาวะกระดูกพรุน) เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ตัดต่อมบังเพศออกและไม่ได้รับกวาวเครือขาว แสดงภาวะกระดูกพรุน และพบว่ากวาวเครือขาวสามารถ**ป้องกันการสูญเสียมวลกระดูก** และความหนาแน่นกระดูก ของกระดูกส่วนรยางค์ (long bone) และกระดูกส่วนแกนกลาง (axial bone) ในหนูทั้งสองเพศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นอยู่กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ และไม่มีผลแตกต่างกันระหว่างเพศ และจากการศึกษาต่อมาของโครงการวิจัยนี้ เพื่อประเมินผลของกวาวเครือขาวในการรักษาโรคกระดูกจากสภาวะพร่องฮอร์โมนเพศในหนูแรทเพศผู้และเพศเมีย โดยการตัดต่อมบังเพศของหนูทั้งสองเพศออกและพักหนูไว้นาน 90 วันพบว่ากวาวเครือขาวสามารถ**ป้องกันการสภาวะกระดูกพรุนได้** เช่นกัน จากผลงานการวิจัยทั้งหมดนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวสามารถแสดงผลต่อกระดูกได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน นั่นคือ กวาวเครือขาวสามารถ**ป้องกันและรักษา**การเกิดโรคกระดูกพรุนได้ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่น และสามารถนำเอากวาวเครือขาวไปพัฒนาเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อกระดูก (ในปีที่ 2 ของโครงการนี้)

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดกวางเครือขาวและการวิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโตเอสโตรเจน

ผงกวางเครือขาว (*Pueraria mirifica* cultivar SARDI 190, lot no. 0070317) ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. สมโภช ทับเจริญ สถาบันสุวรรณวาทกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

นำผงกวางเครือขาวน้ำหนัก 1 กรัมมาสกัดด้วย 70% เอทานอล ปริมาณ 4 mL 2 ครั้ง ตามวิธีการของ Urasopon et al. (2008) นำสารละลายส่วนใสด้านบน (supernatant) ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน ทำให้แห้งนาน 4 ชั่วโมงด้วยเครื่อง centrifugal concentrator เก็บตัวอย่างที่สกัดได้เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาในการทดลองที่ 2 และ 3 ต่อไป

นำส่วนหนึ่งของสารสกัดกวางเครือขาวไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบสารไฟโตเอสโตรเจนด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการของ Malaivijitnond et al. (2004) โดยย่อดังนี้ ฉีดสารสกัดกวางเครือขาวปริมาตร 10 μ L ใน sensory guard column (model Hyperclone ODS (C18); Phenomenex, Torrance, CA, USA) ของ ระบบ HPLC (model Agilent 1000; Agilent, Waldbronn, Germany) ที่เชื่อมต่อกับ reverse phase Symmetry C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; Phenomenex) โดย mobile phase ประกอบด้วย 0.1% vol/vol phosphoric acid และ acetonitrile ในอัตราเร็ว 1 mL/min ตรวจวัดด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 255 nm โดยเปรียบเทียบสารที่วิเคราะห์ได้กับสารไฟโตเอสโตรเจนมาตรฐาน 5 ชนิด คือ daidzin, genistin, daidzein, genistein (catalog nos. 30408, 48756, D7802 และ G6649 ตามลำดับ; St Louis, MO, USA) และ puerarin (catalog no. P5555; Buchs, Switzerland) ทำการทดลอง 2 ซ้ำและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

2. การศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรทชนิด osteosarcoma cell line UMR-106

2.1. ศึกษาคุณสมบัติของเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรทชนิด osteosarcoma cell line UMR-106

ทำการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเพื่อยืนยันคุณสมบัติความเป็นเซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ osteosarcoma cell line UMR-106 และการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในเซลล์กระดูก UMR-106 เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนการทดลองในลำดับถัดไป ดังนี้

ตั้งชื่อเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรทชนิด rat osteosarcoma cell line UMR-106 จาก American Type Culture Collection (ATCC) no. CRL-1661 เลี้ยงเซลล์ UMR-106 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) ร่วมกับการให้ 10% fetal bovine serum (FBS; PAA, Pasching, Austria) และ 100 U/mL penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) จากนั้นบ่มเซลล์ไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิ 37°C และ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ดังนี้

2.1.1. ตรวจสอบการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์ UMR-106

เลี้ยงเซลล์ UMR-106 ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร โดยใช้เซลล์จานละ 5×10^5 เซลล์ จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 80-90 เปอร์เซ็นต์ (80-90% of the cell confluent) หลังจากนั้นทำการสกัด mRNA จากเซลล์ และเปลี่ยนเป็น cDNA เพื่อทำการตรวจวัด estrogen receptors ทั้งชนิดแอลฟา ($\text{ER}\alpha$) และเบต้า ($\text{ER}\beta$) โดยวิธี real-time RT-PCR

2.1.2. ตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างกระดูก (bone mineralization) ของเซลล์ UMR-106

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่เหมาะสมต่อการสร้างกระดูก (หรือที่เรียกว่า osteogenic medium) ในหลอดทดลอง ที่ประกอบด้วย 10 mmol/L β -glycerophosphate และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid และตรวจสอบการสร้าง bone nodule ด้วยการย้อมสี Alizarin red staining ทุกวันจนกว่าจะพบว่าการสร้าง bone nodule เกิดขึ้น

2.2. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากวเครือขาวต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ UMR-106

แบ่งเซลล์ UMR-106 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96-well plate) หลุมละ 1×10^3 เซลล์ (1 ช่องเท่ากับ 1 ตัวอย่าง) เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Nontapomsak et al., 2010) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E_2) เติมสาร 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากวเครือขาวที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) โดยวิธี MTT assay และวัดการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) โดยวิธี BrdU assay

2.3. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากวเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูก osteoblast-like UMR-106

แบ่งเซลล์ UMR-106 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร จานละ 5×10^5 เซลล์ เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 80-90 เปอร์เซ็นต์ แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษา ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ทำการทดลองอย่างละ 8 ซ้ำ) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E_2) เติมสาร 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากวเครือขาวที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 48 และ 72 ชั่วโมง ภายหลังจากแต่ละช่วงเวลา นำเซลล์ UMR-106 มาสกัด mRNA และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ UMR-106 (osteoblast cell differentiation) ได้แก่ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin โดยวิธี real-time RT-PCR

2.4. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์ UMR-106 ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation)

แบ่งเซลล์ UMR-106 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร จานละ 5×10^5 เซลล์ เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 80-90 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 6.3 แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษา ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ทำการทดลองอย่างละ 8 ซ้ำ) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E_2) เติมสาร 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 48 และ 72 ชั่วโมง ภายหลังจากแต่ละช่วงเวลา นำเซลล์ UMR-106 มาสกัด mRNA และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation) ได้แก่ receptor activator of nuclear factor κB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) โดยวิธี real-time RT-PCR

2.5. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวผ่านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนของเซลล์ UMR-106

แบ่งเซลล์ UMR-106 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร จานละ 5×10^5 เซลล์ เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 80-90 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 6.3 จากนั้นเติมสาร 10 nmol/L estrogen receptor antagonist (ICI 182780; Sigma) ลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษา (โดยเลือกเฉพาะความเข้มข้นสูงสุดในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากการทดลองข้อ 6.2 และ 6.3) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E_2) เติมสาร 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นำเซลล์ UMR-106 มาสกัด mRNA และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ UMR-106 (osteoblast cell differentiation) ได้แก่ osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin โดยวิธี real-time RT-PCR

2.6. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการสร้างเนื้อกระดูก (mineralization) ของเซลล์ UMR-106

แบ่งเซลล์ UMR-106 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุม (6-well plate) หลุมละ 1×10^5 เซลล์ เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบปกติ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่มีการเติม osteogenic medium ที่ประกอบด้วย 50 mmole/L β -glycerophosphate และ 50 μ g/ml L-ascorbate 2-phosphate ทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษา (โดยเลือกเฉพาะความเข้มข้นสูงสุดในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากการทดลองข้อ 2.4 และ 2.5) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E_2) เติมสาร 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิด *In vitro* osteoblast mineralization ด้วยการย้อมสีเซลล์ด้วย Alizarin red staining เพื่อดูการเกิด bone nodule และทำการเปรียบเทียบเชิงปริมาณของการเกิด bone nodule โดยวัดปริมาณแคลเซียมที่สะสมโดยใช้การย้อมสีเซลล์ด้วยแคลเซิน (calcein) และตรวจวัดค่าด้วย fluorescence multiwell plate reader

3. การศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรทชนิด primary osteoblast cells

3.1. การเตรียม primary rat osteoblast cells และการตรวจสอบลักษณะทางฟิไซโปกของเซลล์

นำหนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 8 สัปดาห์ มาการุณยฆาต เก็บกระดูกส่วน tibia และ fibular เลาะเนื้อเยื่อส่วนที่ติดกับกระดูกออกมาให้หมด และล้างกระดูกด้วยสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS buffer) ด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำกระดูกที่เตรียมได้ไปวางบนจาน petri dish ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) ร่วมกับการให้ 100 IU/mL penicillin และ 100 μ g/mL streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) ตัดกระดูกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1-3 mm² และล้างด้วย DMEM 5 ครั้งหรือจนกระทั่งไม่มีเลือดหรือไขกระดูกหลงเหลืออยู่ ซึ่งจะเห็นชิ้นกระดูกเป็นสีขาว จากนั้นนำชิ้นกระดูกที่ได้ไปใส่ใน culture flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ปริมาตร 10 mL และเติม 0.25% collagenase (Sigma Chemical, USA) เพื่อย่อยกระดูก โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดการย่อยเนื้อกระดูกโดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 0.25% collagenase ออกไปจนหมด และเติม DMEM ปริมาตร 10 mL ร่วมกับการให้ 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma Chemical, USA) จากนั้น

ย้ายขึ้นกระดุกไปใส่ใน culture flask ที่มี DMEM ปริมาตร 10 mL ร่วมกับการให้ 30% FBS 100 IU/mL penicillin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-ascorbate 2-phosphate และ 100 μm sodium pyruvate (Gibo, Grand Island, NY, USA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 3 วัน โดยไม่รบกวนเพื่อให้ osteoblast cells เคลื่อนออกมาจากเนื้อกระดุก จากนั้นย้าย osteoblast cells ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับขั้นตอนข้างบนนี้ เพียงแต่เปลี่ยนเป็น 15% FBS และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน และ subculture ด้วย 5% trypsin (Gibo, Grand Island, NY, USA)

จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะของ osteoblast cells ภายใต้อุปกรณ์ inverted-light microscope และตรวจสอบการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนและการสร้างเนื้อกระดูก (mineralization) ของ primary rat osteoblast cells ดังนี้

3.1.1. ตรวจสอบการแสดงออกของตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์ primary rat osteoblast cells

เลี้ยงเซลล์ primary rat osteoblast cells ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 เซนติเมตร โดยใช้เซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 80-90 เปอร์เซ็นต์ (80-90% of the cell confluent) หลังจากนั้นทำการสกัด mRNA จากเซลล์ และเปลี่ยนเป็น cDNA เพื่อทำการตรวจวัด estrogen receptors ทั้งชนิดแอลฟา (ER α) และเบต้า (ER β) โดยวิธี real-time RT-PCR

3.1.2. ตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างกระดูกของเซลล์ primary rat osteoblast cells

เลี้ยงเซลล์ primary rat osteoblast cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่เหมาะสมต่อการสร้างกระดูก (หรือที่เรียกว่า osteogenic medium) ในหลอดทดลอง ที่ประกอบด้วย 10 mmol/L β -glycerophosphate และ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid และตรวจสอบการสร้าง bone nodule ด้วยการย้อมสี Alizarin red staining ทุกวันจนกว่าจะพบว่ามี การสร้าง bone nodule เกิดขึ้น

3.2. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ primary rat osteoblast cells

แบ่งเซลล์ primary rat osteoblast cells ระยะ second passage ใส่ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96-well plate) หลุมละ 1×10^3 เซลล์ (1 ช่องเท่ากับ 1 ตัวอย่าง) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษา ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E₂) เติมสาร 17 β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจวัดการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) โดยวิธี BrdU assay

3.3. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดกวางเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูก primary rat osteoblast cells

แบ่งเซลล์ primary rat osteoblast cells ระยะ second passage ใส่ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุม (6-well plate) หลุมละ 2×10^5 เซลล์ แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E_2) เติมสาร 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากกวางเครือขาวที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μ g/mL

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นำเซลล์ primary rat osteoblast cells มาสกัด mRNA และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ primary rat osteoblast cells ได้แก่ runx2, osteix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin โดยวิธี real-time RT-PCR

3.4. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดกวางเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์ primary rat osteoblast cells ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation)

แบ่งเซลล์ primary rat osteoblast cells ระยะ second passage ใส่ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 6 หลุม (6-well plate) หลุมละ 2×10^5 เซลล์ แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E_2) เติมสาร 17β -Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากกวางเครือขาวที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μ g/mL

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นำเซลล์ primary rat osteoblast cells มาสกัด mRNA และตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation) ได้แก่ receptor activator of nuclear factor κ B (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) โดยวิธี real-time RT-PCR

3.5. ศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดกวางเครือขาวต่อการสร้างเนื้อกระดูก (mineralization) ของเซลล์ primary rat osteoblast cells

แบ่งเซลล์ primary rat osteoblast cells ระยะ second passage ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 mm จำนวน 5×10^5 เซลล์ เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบที่มีการเติม osteogenic medium ที่ประกอบด้วย 50 mmole/L β -

glycerophosphate และ 50 µg/ml L-ascorbate 2-phosphate แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม และเติมสารที่ต้องการศึกษา (โดยเลือกเฉพาะความเข้มข้นสูงสุดในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากการทดลองข้อ 3.3 และ 3.4) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่ม Control) เติมสาร 0.3% vol/vol Dimethylsulfoxide (0.3% DMSO)

กลุ่มที่ 2 (กลุ่ม E₂) เติมสาร 17β-Estradiol ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L

กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม GEN) เติมสาร Genistein ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 4 (กลุ่ม PU) เติมสาร Puerarin ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L

กลุ่มที่ 5 (กลุ่ม PM) เติมสารสกัดจากกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 100 µg/mL

หลังจากเติมสาร ทำการบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 21 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน ตรวจสอบการเกิด *In vitro* osteoblast mineralization ด้วยการย้อมสีเซลล์ด้วย Alizarin red S staining เพื่อดูการเกิด bone nodule

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) (Nontapornsak et al., 2010)

ทำการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) โดยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในตรวจวัดเอนไซม์ mitochondrial reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของกระบวนการหายใจของเซลล์ พบว่าในเซลล์ที่มีเอนไซม์ mitochondrial reductase อยู่สามารถเปลี่ยนสีของ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็นสีม่วงของ formazan crystal ได้

จากการทดลอง ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์ osteoblast ใน 96-well plate และให้สารต่าง ๆ ในแต่ละกลุ่มการทดลองแล้ว จะทำการเติม MTT solution (catalog no. M2128; Sigma) จำนวน 40 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate (ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละช่องเท่ากับ 1 mg/mL) จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3.5 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นเติม MTT solvent (4mmole/L HCL + 0.1% vol/vol Nonidet P-40 in isopropanol) จำนวน 150 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm (ใช้ค่าอ้างอิงที่ 620 nm) ด้วยเครื่อง microplate reader (model 1420; Wallac) ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

การตรวจวัดการเจริญของเซลล์ (cell proliferation)

ทำการตรวจวัดการเจริญของเซลล์ โดยวิธี BrdU assay โดยอาศัยหลักการที่ว่า BrdU (Bromodeoxyuridine) เป็นสาย nucleoside สังเคราะห์ ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับเบส thymidine ในสายดีเอ็นเอ ซึ่งในระยะ S phase ของ cell cycle ที่เกิดกระบวนการ DNA replication นั้น BrdU สามารถเข้าไปจับกับเบสคู่สมแทนที่ thymidine ในสายดีเอ็นเอที่สร้างมาใหม่ได้ ซึ่งปริมาณ BrdU ที่วัดได้จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงจำนวนดีเอ็นเอที่สร้างใหม่ หรือการเจริญของเซลล์

จากการทดลอง ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์ UMR-106 และ primary rat osteoblast cells ใน 96-well plate และให้สารต่าง ๆ ในแต่ละกลุ่มการทดลองแล้ว จะทำการตรวจวัดโดยใช้ BrdU enzyme-linked immunosorbent assay kit (catalog no. 11647229001; Roche, Mannheim, Germany) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 nm (ใช้ค่าอ้างอิงที่ 490 nm) ด้วยเครื่อง microplatereader (model 1420; Wallac, Finland)

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์สร้างกระดูกและการสังเคราะห์ cDNA (Wongdee et al., 2011)

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ UMR-106 และ primary rat osteoblast cells ทำได้โดยการล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วยสารละลาย PBS และเติม Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ปริมาตร 1 mL ที่ไว้ 5 นาที จากนั้นแยกสารละลายส่วนไขมันเติมคลอโรฟอร์ม จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ที่ไว้ประมาณ 5 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วแยกเฉพาะส่วนไขมันเติม isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ที่ไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้อาร์เอ็นเอที่ได้ตกตะกอน แล้วดูดสารละลายส่วนไขมันทิ้ง ล้างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 70% EtOH ทั้งนี้ทุกขั้นตอนต้องทำที่อุณหภูมิ 4 °C mRNA ที่สกัดได้จะนำไปละลายด้วย DEPC-H₂O และเก็บรักษาไว้ที่ -80°C ตรวจสอบการปนเปื้อนของ mRNA ที่สกัดได้ โดยการวัดค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ซึ่งสัดส่วนที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 จึงจะถือว่า mRNA ที่สกัดได้ มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

นำ mRNA ที่ได้ในปริมาณ 1 µg ไปสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี reverse transcription ด้วย iScript cDNA synthesis kit และ oligo-dT₂₀ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) โดยใช้เครื่อง Bio-Rad myCycler ทั้งนี้ในการตรวจสอบความคงที่ของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ จะนำไปเปรียบเทียบกับ housekeeping gene คือ β-actin

การตรวจวัดการแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยวิธี Quantitative real-time PCR

ตรวจวัดการแสดงออกของ mRNA expression โดย Bio-Rad MiniOpticon real-time PCR ร่วมกับการใช้ iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad) โดย primers ที่ใช้ มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง primers ของหนูแรท (*Rattus norvegicus* oligonucleotide sequences) ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์สร้างกระดูก UMR-106 และ primary rat osteoblast cells

Gene name (abbreviated name)	Accession no.	Primer (forward/reverse)	Product length (bp)
<i>Estrogen receptors (ER)</i>			
Estrogen receptor-α	NM_012689	5'-CCAAGTCCACTTGTGATCAAGC-3' 5'-TTGAGGCTTCACTGAAGGGTC-3'	148
Estrogen receptor-β	NM_012754	5'-AAAGCCAAGAGAAACGGTGGGCAT-3' 5'-GCCAATCATGTGCACCAGTTCCTT-3'	204
<i>Osteoblast-related genes</i>			
Runt-related transcription factor 2 (Runx2)	XM_001066909	5'-TAACGGTCTTCACAAATCCTC-3' 5'-GGCGGTGAGAGAACTA-3' 5'-GCCTACTTACCCGTCTGA-3'	135
Osterix	AY177399	5'-CTCCAGTTGCCACTAAT-3' 5'-GCAGGATCGGAACGTCAAT-3'	139
Alkaline phosphatase (ALP)	NM_013059	5'-ATGAGTTGTAAGGCAGGGTC-3' 5'-CACAGGGAGGTGTGTGAG-3'	144
Osteocalcin	J04500	5'-TGTGCCCTCCACTTTTC-3' 5'-TCGCTCTGTTCTGACT-3'	203
Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)	NM_057149	5'-AGTGCTTCTGTCTTCG-3' 5'-ATTGGCTGAGTGTCTGGT-3'	145
Osteoprotegerin (OPG)	NM_012870	5'-CTGGTCTGTTTGATGC-3'	140
<i>Housekeeping gene</i>			
β-actin	NM_031144	5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' 5'-GTCATCTTTACGGTTGGC-3'	185

การตรวจวัดการสร้างเนื้อกระดูกของเซลล์ UMR-106 และ primary rat osteoblast cells ในหลอดทดลอง (*In vitro* mineralization)

ตรวจวัด *In vitro* mineralization โดยดูจากแคลเซียมที่เซลล์สร้างและรวมตัวกันเป็นกลุ่มที่เรียกว่า bone nodule ด้วยการย้อมสี 1% Alizarin Red S (Sigma) ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จากการทดลองภายหลังจากเลี้ยงเซลล์ UMR-106 และ primary rat osteoblast cells ใน 6-well plate และให้สารต่าง ๆ ในแต่ละกลุ่มการทดลองแล้ว ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จำนวน 1 ครั้ง จากนั้น fix เซลล์ด้วย 70 % EtOH เป็นเวลา 30 นาที และย้อมด้วย 1% Alizarin Red S เป็นเวลา 5 นาที ล้างสีย้อมส่วนเกินออกจากเซลล์ด้วย distilled water จะสังเกตเห็น bone nodule ด้วยตา และนำไปตรวจดูลักษณะโดยละเอียดอีกครั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงเชิงประกอบ

การวัดปริมาณแคลเซียมโดยการย้อมด้วย calcein (Hale et al., 2000) จากการทดลองภายหลังจากเลี้ยงเซลล์ UMR-106 และ primary rat osteoblast cells ใน 6-well plate และให้สารต่าง ๆ ในแต่ละกลุ่มการทดลองแล้ว เติม 1 $\mu\text{g/ml}$ calcein ลงไปในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์สารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง และนำไปวัดค่า fluorescence ด้วยเครื่อง microplate reader (model 1420; Wallac) ที่ความยาวคลื่น 485 nm excitation และ 530 nm emission ค่าที่ได้จะเป็นค่าของ calcein ที่จับกับแคลเซียมที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม

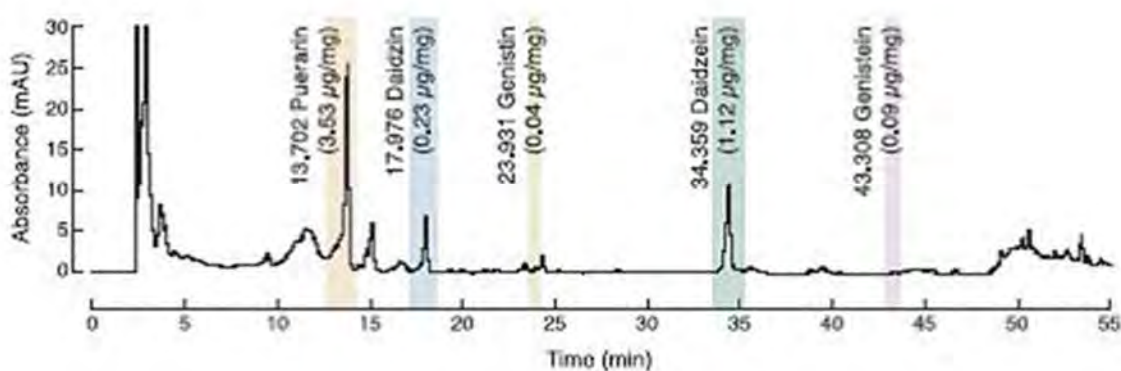
การวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลข้อมูลในรูปของ mean \pm SEM วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มด้วย Mann-Whitney test และการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีมากกว่า 1 ค่า โดยใช้ One-way Analysis of Variance (ANOVA) และทดสอบ post-hoc test ด้วย Dunnett's test ยอมรับค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโตเอสโตรเจน

จากรูปที่ 1 ได้วิเคราะห์พบสารไฟโตเอสโตรเจน 5 ชนิดจากสารสกัดกวางเครือขาว คือ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ที่ retention time เท่ากับ 13.702, 17.976, 23.931, 34.359 และ 43.308 นาที ตามลำดับ พบว่า puerarin เป็นสารหลักที่มีปริมาณมากที่สุด คือ 35.3 mg/100 g และ daidzin, genistin, daidzein และ genistein เท่ากับ 2.3, 0.4, 11.2 และ 0.9 mg/100 g ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่า puerarin จำนวน 15, 90, 3 และ 4 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 4)

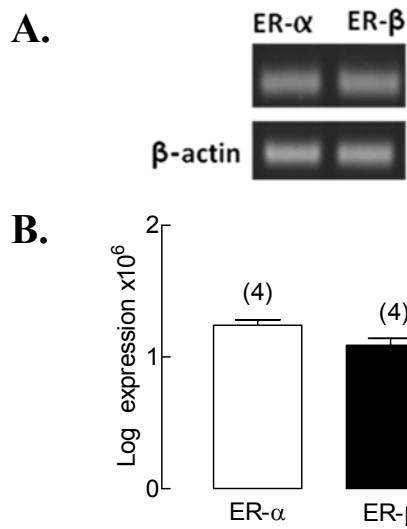


รูปที่ 4 แสดง chromatogram ปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจน 5 ชนิด คือ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein จากสารสกัดกวางเครือขาว โดยแสดง retention time และปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละตัว

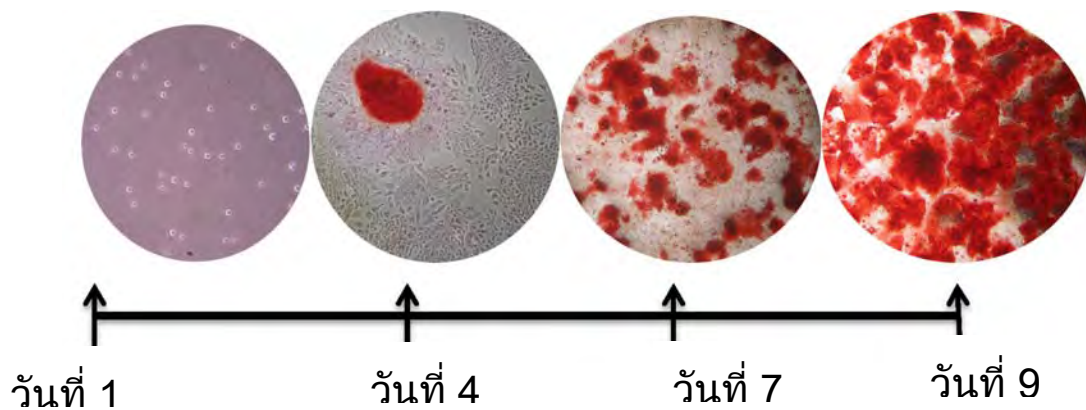
2. การศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรทชนิด osteosarcoma cell line UMR-106

2.1. ศึกษาคุณสมบัติของเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรทชนิด osteosarcoma cell line UMR-106

ก่อนที่จะทำการศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวางเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์ osteoblast-like UMR-106 ต้องศึกษาก่อนว่า UMR-106 จะสามารถตอบสนองต่อสารเอสโตรเจนสังเคราะห์ได้หรือไม่ โดยตรวจวัดการแสดงออกของ Estrogen receptor-alpha (ER- α) และ Estrogen receptor-beta (ER- β) และตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างกระดูก *In vitro* Mineralization พบว่า UMR-106 มีการแสดงออกของ ER- α และ ER- β mRNA อย่างเด่นชัด (รูปที่ 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า UMR-106 สามารถตอบสนองต่อสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวางเครือขาว ได้ผ่าน ERs และ UMR-106 cells สามารถเริ่มเกิด mineralization ได้ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 6)



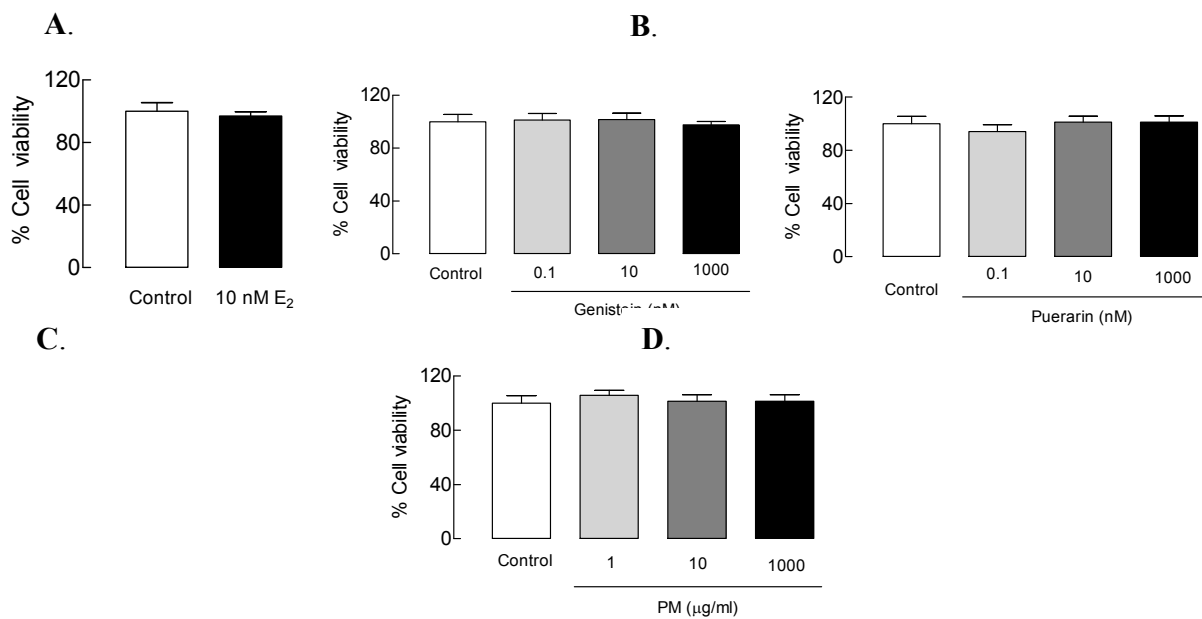
รูปที่ 5 แสดงการแสดงผลของ Estrogen receptors (ERS) ทั้งสองชนิด คือ estrogen receptor-alpha (ER- α) และ estrogen receptor-beta (ER- β) ของเซลล์กระดูกชนิด Osteoblast-like UMR-106 cells โดยวิธี Gel Electrophoresis for Conventional RT-PCR (A) และ Realtime RT-PCR (B)



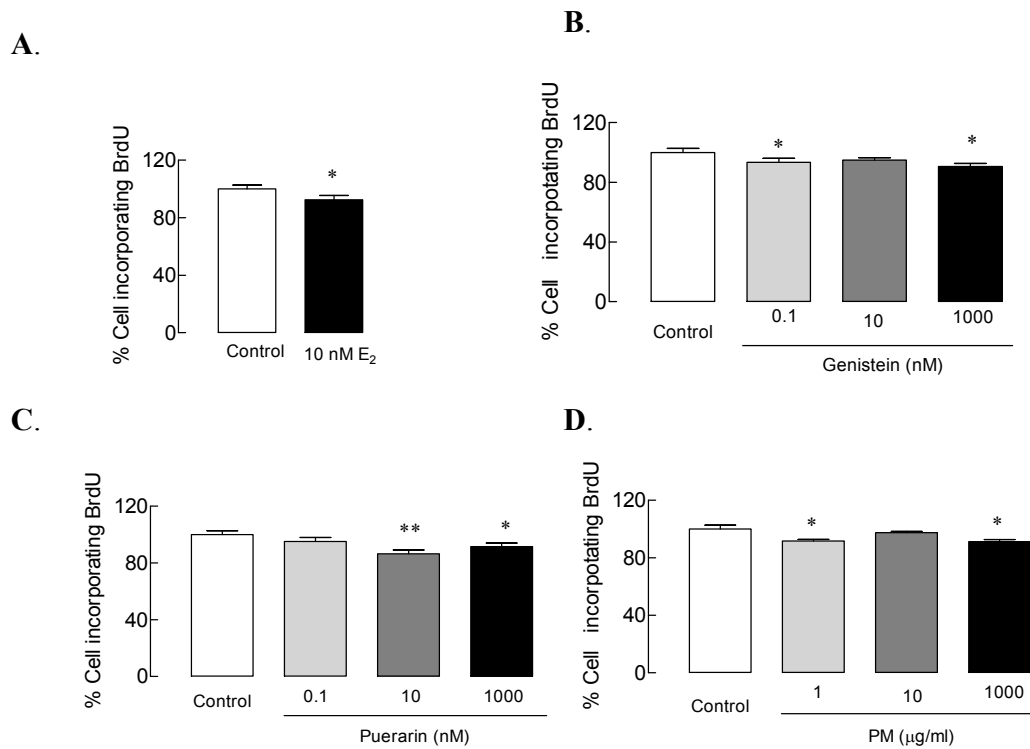
รูปที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบคุณสมบัติ *In vitro* Mineralization ของเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells โดยการเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 nM β -Glycerophosphate ย้อมเซลล์ด้วย Alizarin Red S Staining และตรวจสอบผ่านกล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 20X พบว่า UMR-106 cells สามารถเริ่มเกิด mineralization ได้ในวันที่ 4

2.2. ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ UMR-106

จากการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) โดยวิธี MTT assay ของเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากการได้รับสารชนิดต่างๆ คือ 17β -Estradiol (E_2) ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L, genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L, puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L และสารสกัดกวาวเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μ g/mL เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.3% DMSO) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 7) แต่พบว่าการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) เมื่อตรวจวัดโดยวิธี BrdU assay ลดลงในทุกกลุ่มการทดลอง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง (รูปที่ 8)



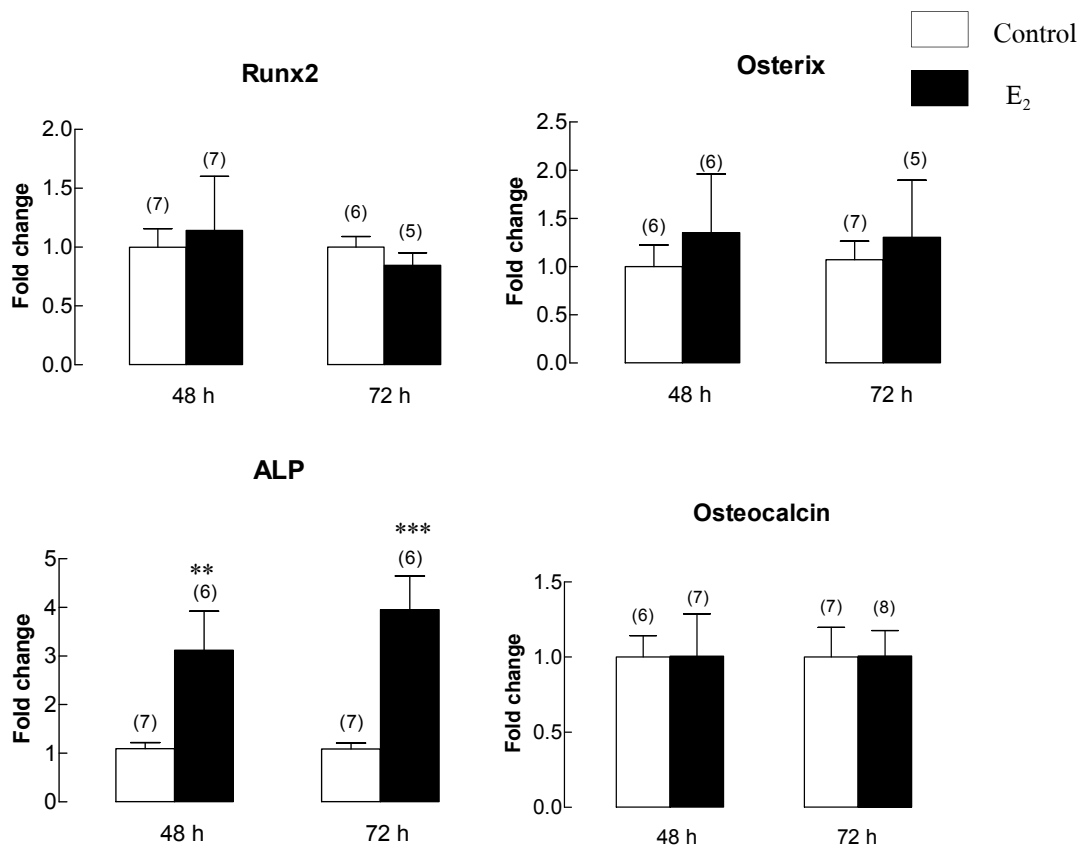
รูปที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์ของ cell viability ของเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากการได้รับสารชนิดต่างๆ ได้แก่ 17β -estradiol (E_2), genistein (GEN), puerarin (PU) และสารสกัดกวาวเครือขาว (PM) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง



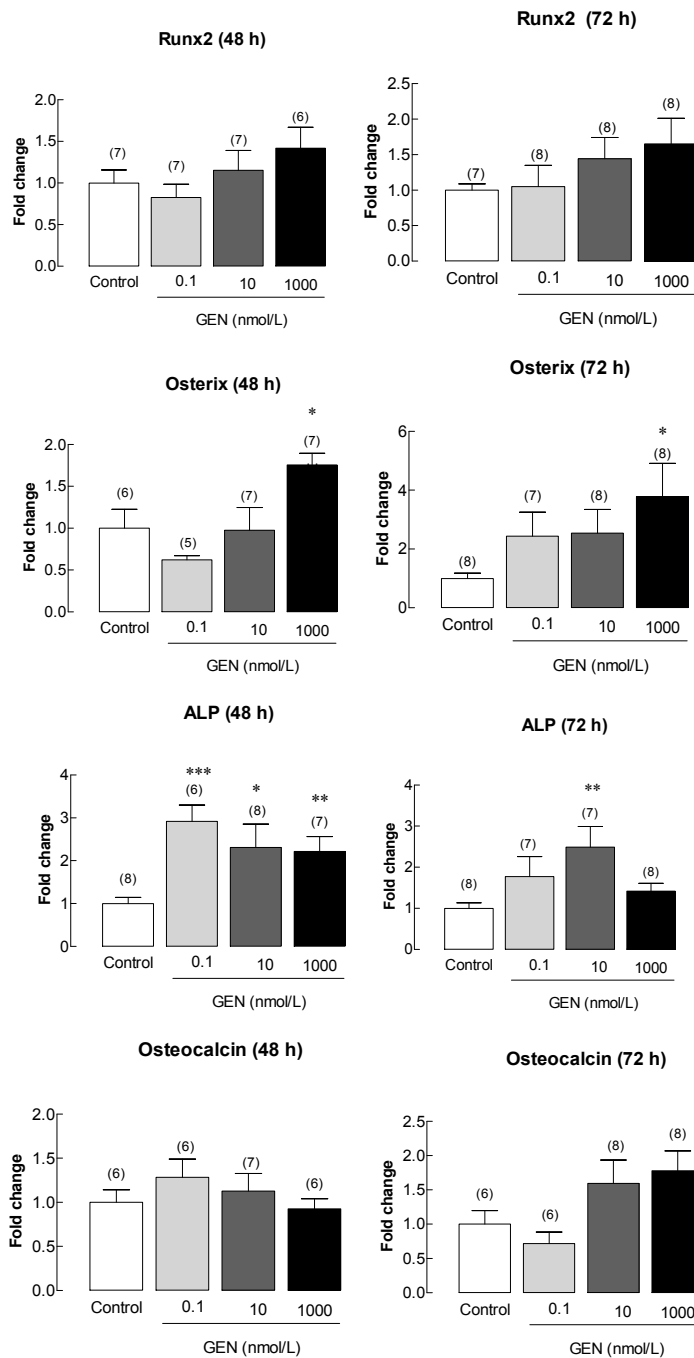
รูปที่ 8 แสดงจำนวน cell proliferation โดยวัดจากเปอร์เซ็นต์การจับ BrdU labeling agent ที่จับกับ DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ ของเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากการได้รับสารชนิดต่างๆ ได้แก่ 17 β -estradiol (E₂), genistein (GEN) , puerarin(PU) และสารสกัดกวาวเครือขาว (PM) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (*, ** = p<0.05 และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

2.3. ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูก osteoblast-like UMR-106

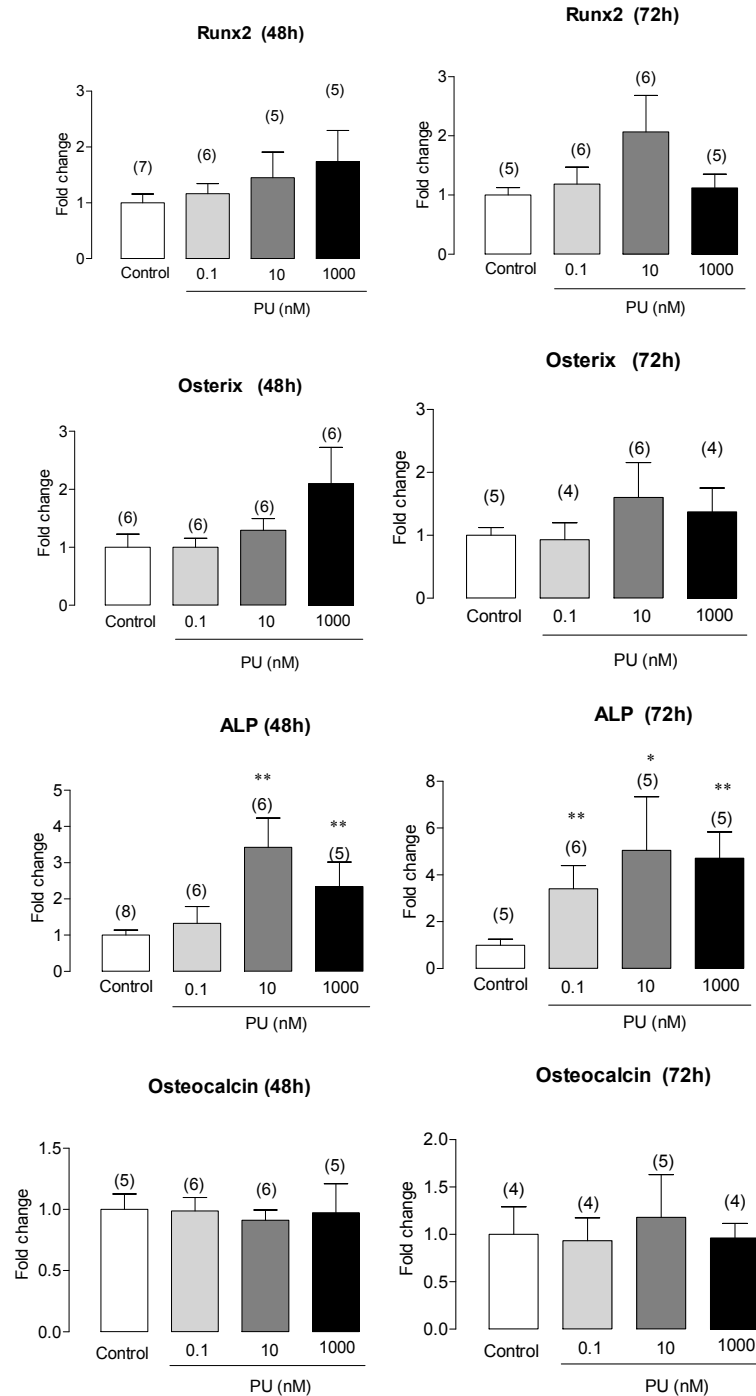
จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ด้วยวิธี real-time RT-PCR ได้แก่ ยีน runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากได้รับสาร 17 β -estradiol (E₂) ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L, genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L, puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L และสารสกัดกวาวเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μ g/mL เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.3% DMSO) พบว่า E₂, GEN และ PU สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน ALP ได้ทั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 9-11) ยกเว้น PM ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน ALP ได้เฉพาะที่ 48 ชั่วโมง เท่านั้น (รูปที่ 12) นอกจากนี้ GEN และ PM ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน osterix (ทั้ง GEN และ PM) และ osteocalcin (เฉพาะ PM เท่านั้น) ได้อีกด้วย



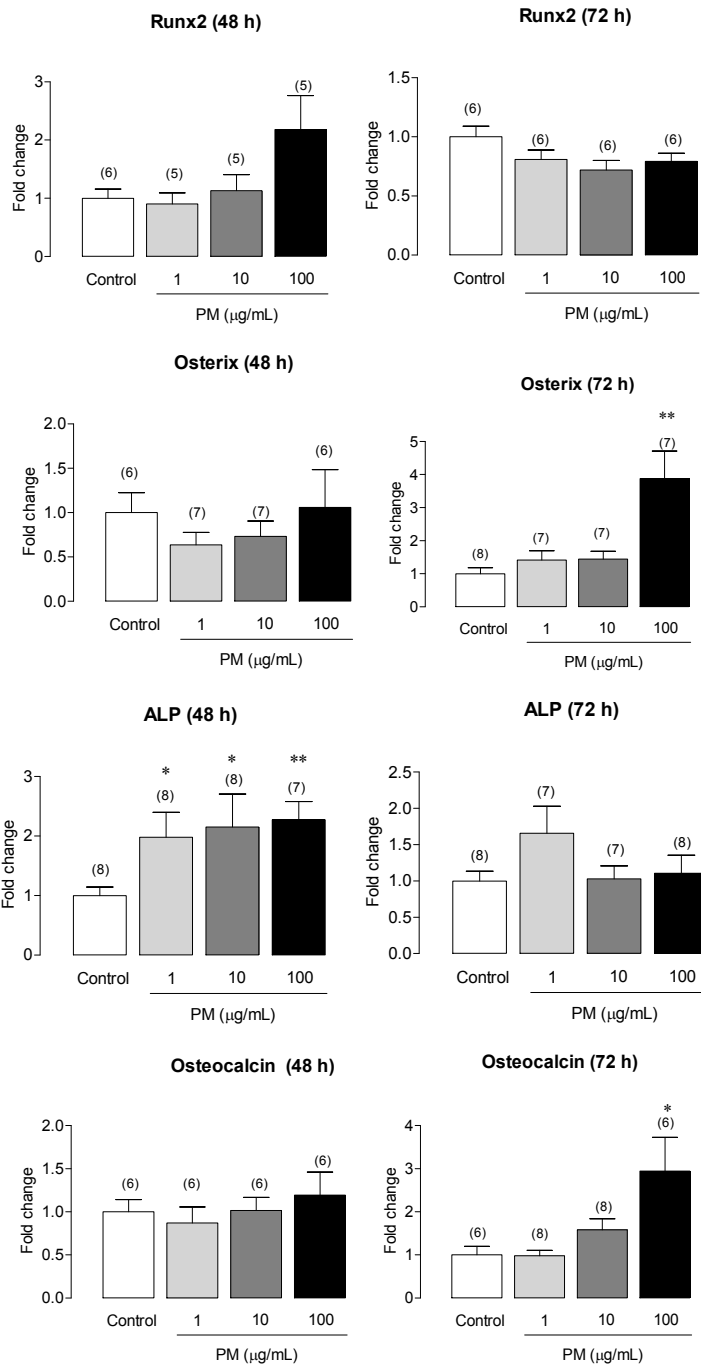
รูปที่ 9 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoblast differentiation คือ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากได้รับเอสโตรเจนสังเคราะห์ (E₂) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (**, *** = p<0.01 และ 0.005 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



รูปที่ 10 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoblast differentiation คือ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากได้รับสาร genistein (GEN) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, **, *** = $p < 0.05$, 0.01 และ 0.005 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



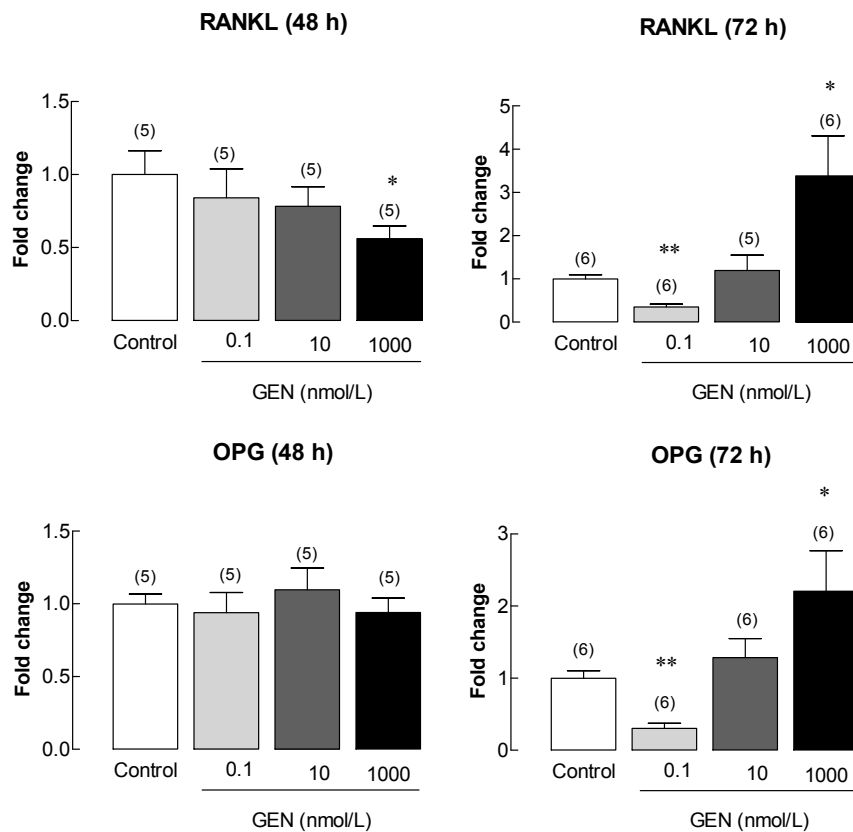
รูปที่ 11 แสดงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิด osteoblast differentiation คือ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากได้รับ puerarin (PU) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



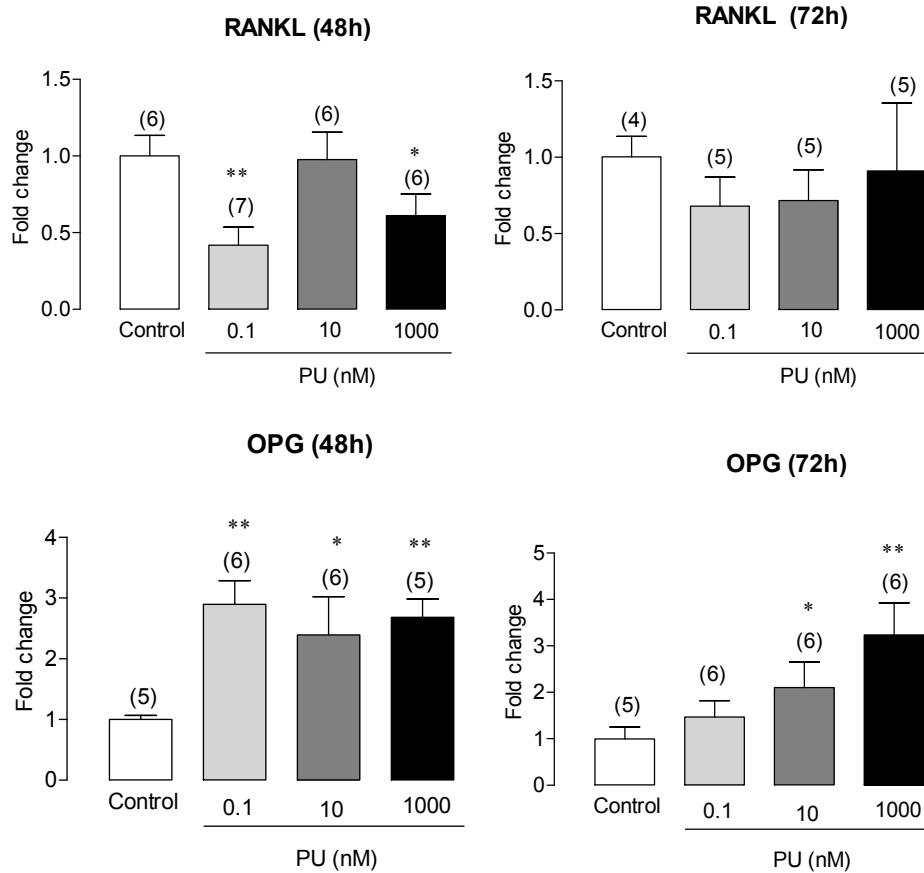
รูปที่ 12 แสดงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoblast differentiation คือ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากได้รับสารสกัด กวาวเครือขาว (PM) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

2.4. ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์ UMR-106 ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation)

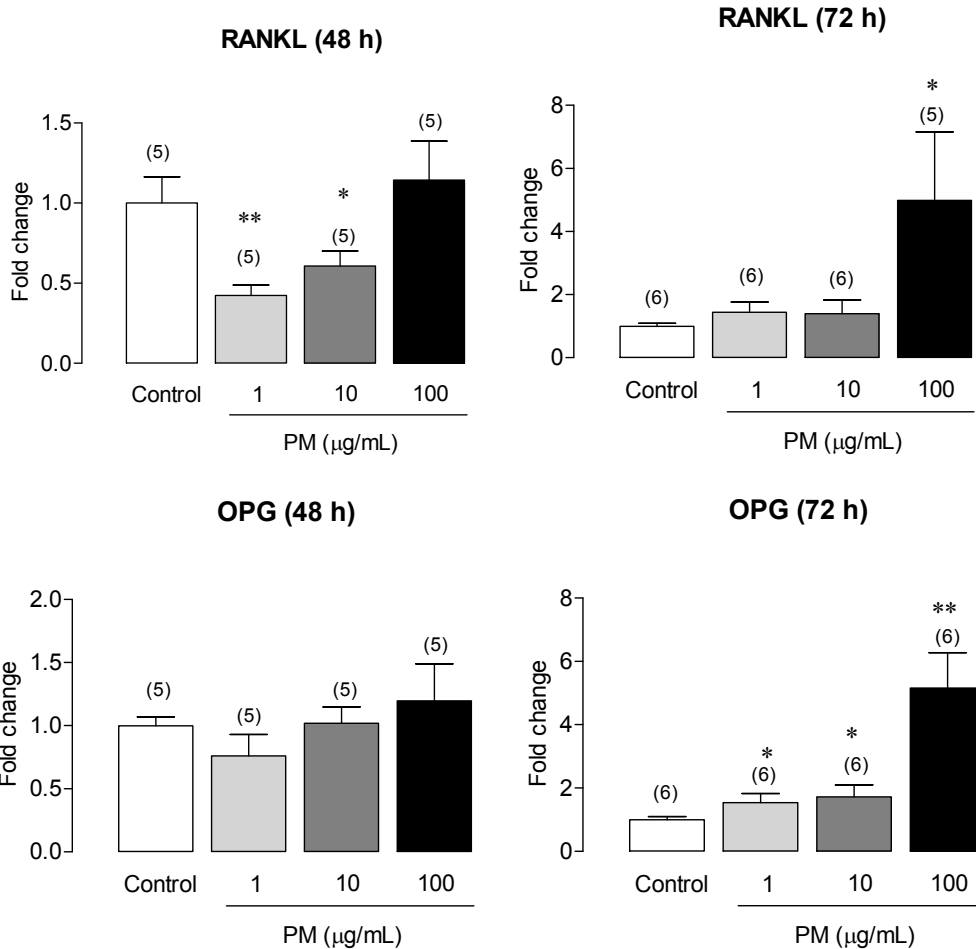
จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation) ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ได้แก่ receptor activator of nuclear factor kB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) ในเซลล์กระดูกชนิด Osteoblast-like UMR-106 cells ภายหลังจากได้รับสาร Genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L, Puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L และสารสกัดจากกวาวเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 µg/mL เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.3% DMSO) พบว่า PU สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน OPG อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.05$ และ 0.01) ทั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 14) และลดการแสดงออกของยีน RANKL ที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ GEN และ PM ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน OPG เฉพาะที่ 72 ชั่วโมง และทำให้เกิดการแสดงออกของ RANKL ยีนทั้งแบบเพิ่มขึ้นและลดลงที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 13 และ 15)



รูปที่ 13 แสดงผลการแสดงออกของยีนจากเซลล์กระดูก osteoblast-like UMR-106 cells ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการเกิด osteoclast differentiation ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิด bone resorption ได้แก่ receptor activator of nuclear factor kB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) ภายหลังจากได้รับ genistein (GEN) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



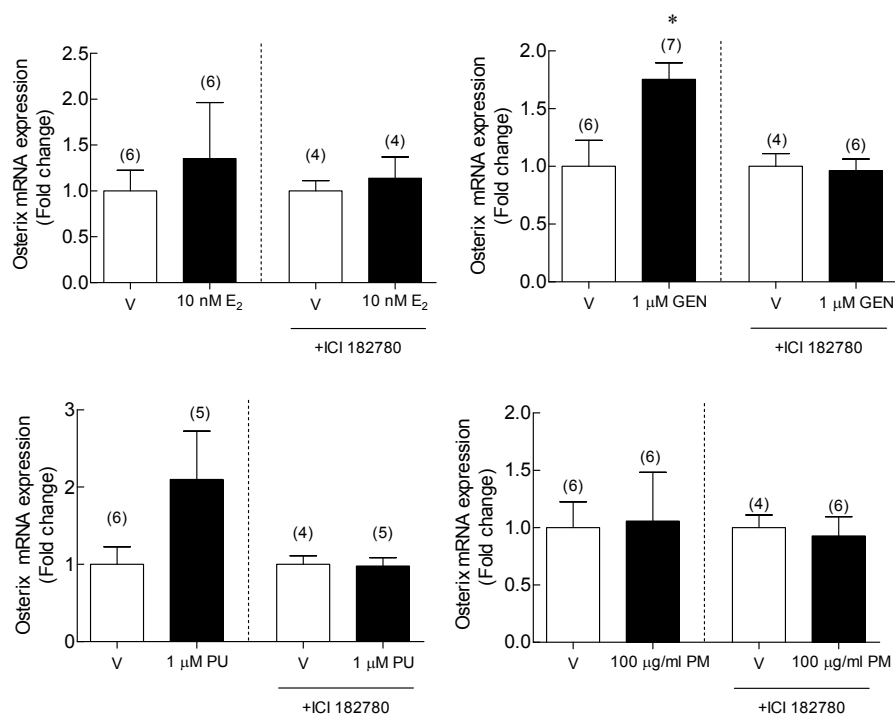
รูปที่ 14 แสดงผลการแสดงออกของยีนจากเซลล์กระดูก osteoblast-like UMR-106cells ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoclast differentiation ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิด bone resorption ได้แก่ receptor activator of nuclear factor kB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) ภายหลังจากได้รับ puerarin (PU) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



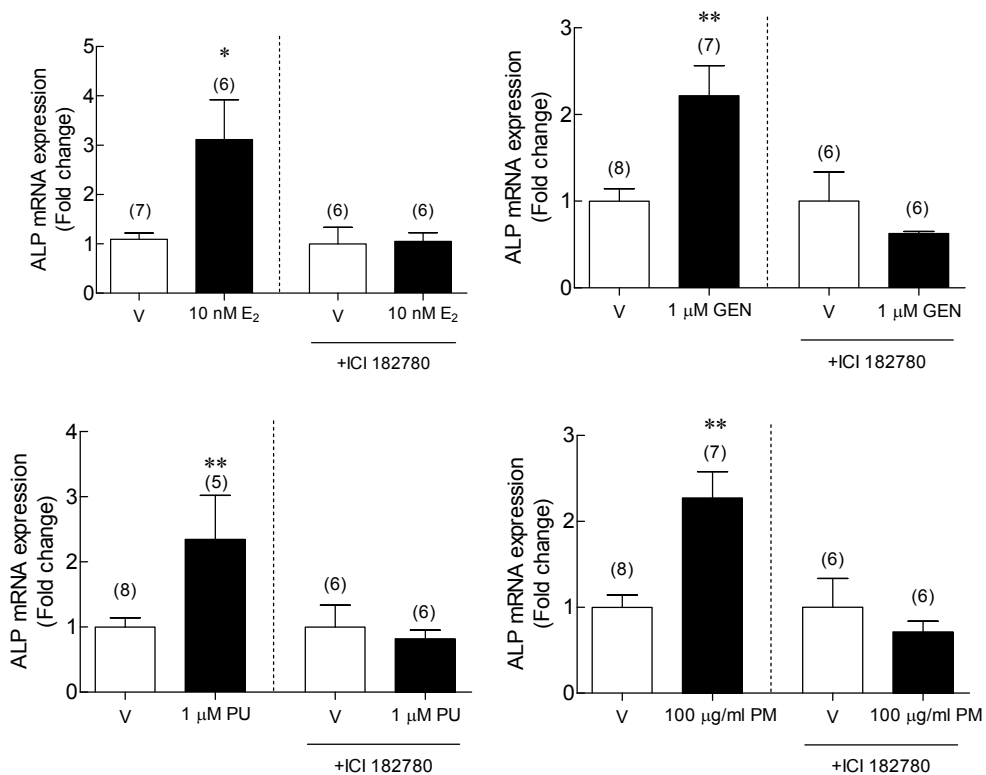
รูปที่ 15 แสดงผลการแสดงออกของยีนจากเซลล์กระดูก osteoblast-like UMR-106cells ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoclast differentiation ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิด bone resorption ได้แก่ receptor activator of nuclear factor kB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) ภายหลังจากได้รับสารสกัดกวางเครือขาว ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

2.5. ศักยภาพการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวผ่านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนของเซลล์ UMR-106

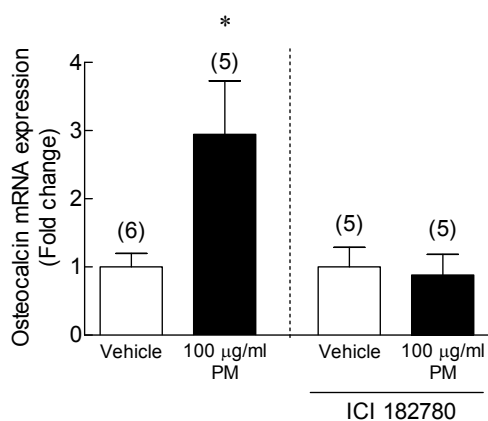
เพื่อยืนยันว่าการออกฤทธิ์ของสารเอสโตรเจนสังเคราะห์ (E_2), สารไฟโตเอสโตรเจน และสารสกัดจากกวาวเครือขาว ผ่านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนของเซลล์ UMR-106 จึงคัดเลือกเฉพาะความเข้มข้นสูงสุดในแต่ละกลุ่มการทดลองในข้อ 6.2 และ 6.3 คือ 17β -estradiol (E_2) ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L, genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L, puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L และสารสกัดกวาวเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL มาทำการทดลองต่อในขั้นตอนนี้ ภายหลังจากเติมสาร 10 nmol/L estrogen receptor antagonist (ICI 182780) และตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ได้แก่ osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด osteoblast-like UMR-106 cells เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.3% DMSO) พบว่าการแสดงออกของยีน osterix, ALP และ osteocalcin ที่เคยถูกกระตุ้นเมื่อได้รับ E_2 , GEN, PU และ PM กลับลดลงมาเท่ากับกลุ่มควบคุมเมื่อให้ estrogen receptor antagonist (ICI 182780) ก่อนการทดสอบสาร (รูปที่ 16-18) ซึ่งบ่งชี้ว่าการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวผ่านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนของเซลล์ UMR-106



รูปที่ 16 แสดงการแสดงออกของยีน osterix เมื่อให้ estrogen receptors antagonist (ICI 182780) ร่วมกับ 17β -estradiol (E_2), genistein (GEN), puerarin (PU) และสารสกัดจากกวาวเครือขาว (PM) (* = $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



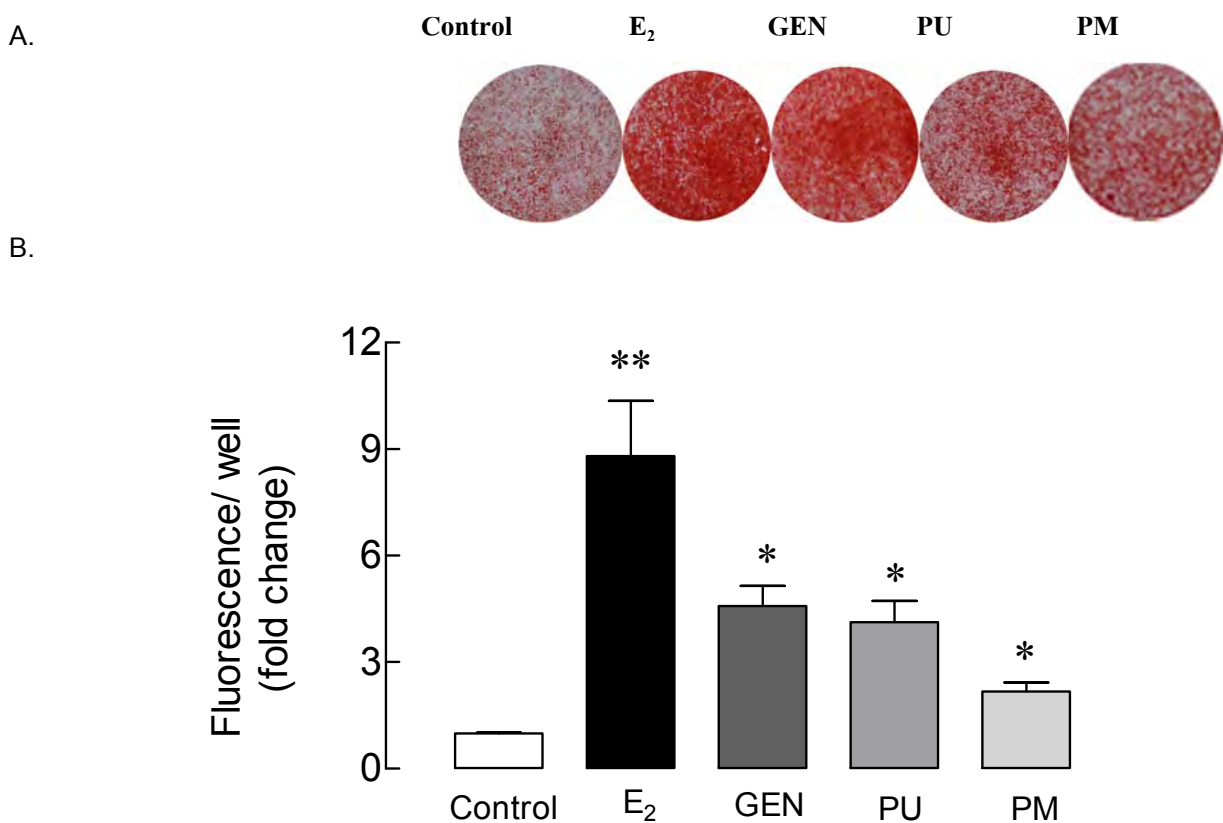
รูปที่ 17 แสดงการแสดงออกของยีน ALP เมื่อให้ estrogen receptors antagonist (ICI 182780) ร่วมกับ 17β- estradiol (E₂), genistein (GEN), puerarin(PU) และสารสกัดกวางเครือขาว (PM) (*, ** = p<0.05 และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



รูปที่ 18 แสดงการแสดงออกของยีน osteocalcin เมื่อให้ estrogen receptors antagonist (ICI 182780) ร่วมกับสารสกัดกวางเครือขาว (PM) (* = p<0.05 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

2.6. ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวางเครือขาวต่อการสร้างเนื้อกระดูก (mineralization) ของเซลล์ UMR-106

จากการตรวจสอบผลของ 17β -estradiol (E_2) ที่ความเข้มข้น 10 nmol/L, genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L, puerarin(PU) ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L และสารสกัดจากกวางเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL ต่อการสร้างเนื้อกระดูก (mineralization) ของเซลล์ UMR-106 พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดสามารถกระตุ้นการเกิด bone nodule ได้ โดย E_2 สามารถกระตุ้นการเกิด bone nodule ได้ดีกว่าสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวางเครือขาว (รูปที่ 19)

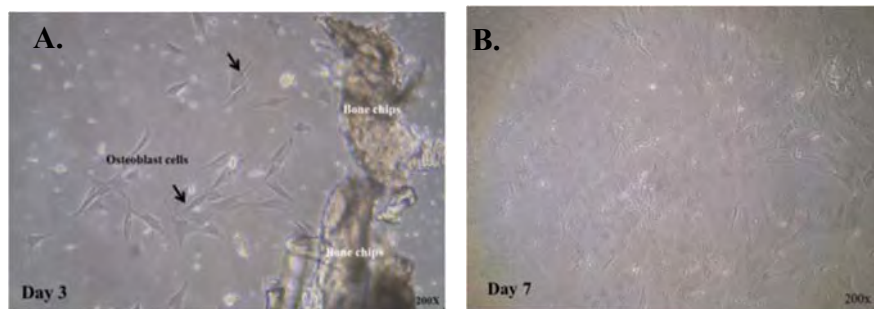


รูปที่ 19 แสดงการเกิดการสร้างเนื้อกระดูก (Mineralization) ของ osteoblast-like UMR-106 cells โดยการย้อมสีเซลล์ด้วย Alizarin Red Staining (A) และวัดปริมาณของแคลเซียมที่สะสมภายในเซลล์จากการวัดปริมาณ calcein ที่จับกับแคลเซียม (B) ภายหลังจากการได้รับสารชนิดต่างๆ ได้แก่ 17β -estradiol (E_2), genistein (GEN), puerarin(PU) และสารสกัดกวางเครือขาว (PM) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

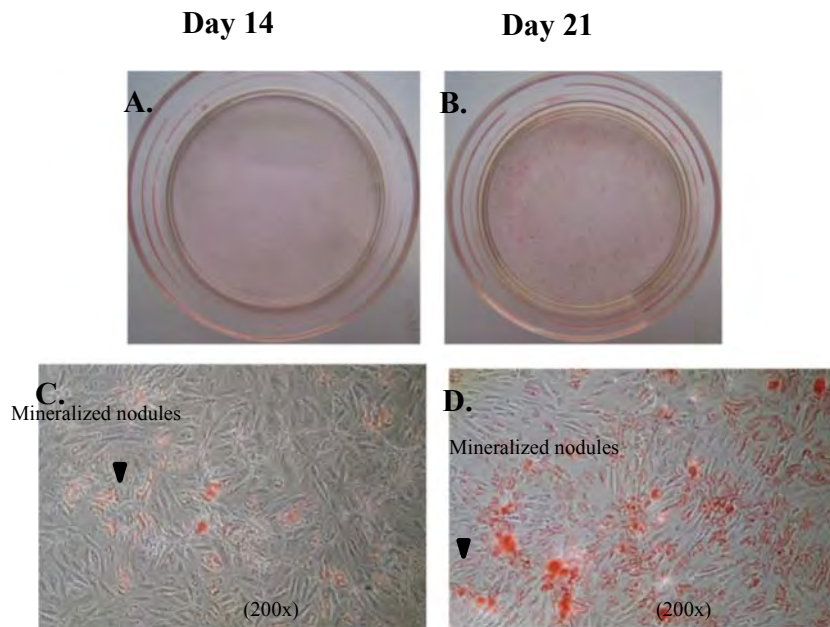
3. การศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรชชนิด primary osteoblast cells

3.1. การเตรียม primary rat osteoblast cells และการตรวจสอบลักษณะทางฟีไทป์ของเซลล์

จากการตรวจสอบฟีไทป์ของ primary rat osteoblast cell ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ซึ่งมีรูปร่างกลมหรือ polygonal เริ่มเคลื่อนออกจากเนื้อกระดูก และเกาะบนจานเพาะเลี้ยงในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 20) เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นสามเหลี่ยมหรือรูปร่างเรียวหัวท้ายแหลม แบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นใหม่ที่ประมาณ 80% ของจานเพาะเลี้ยงในวันที่ 7 (รูปที่ 21B) เมื่อนำ 2nd passage ของเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 50 nM β -glycerophosphate เซลล์สามารถเกิดการสร้าง bone nodule ในวันที่ 14 และจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนวันที่ 21 ของการเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 21B, D) เมื่อย้อมด้วย Alizarin Red S staining จะเห็นเป็นผลึกสีแดง (รูปที่ 21A, C).



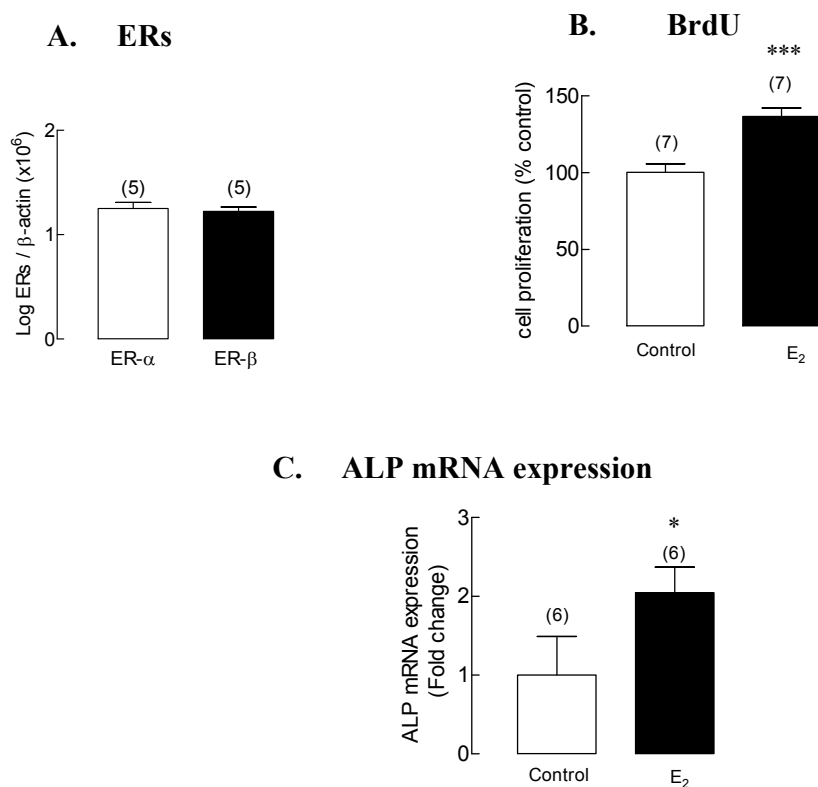
รูปที่ 20 แสดงการเพาะเลี้ยง rat primary osteoblast cells จากกระดูกของหนูแรช เซลล์เริ่มเคลื่อนออกจากเนื้อกระดูก ในวันที่ 3 (A) และเกาะกับจานเพาะเลี้ยงและแบ่งเซลล์จนมีปริมาณ 80% ในวันที่ 7 การเพาะเลี้ยงเซลล์ ลูกศรแสดง osteoclast cells



รูปที่ 21 แสดงการสร้างเนื้อกระดูกในหลอดทดลองของ primary rat osteoblast cells ลูกศรแสดง bone nodule ซึ่งติดสีแดงจากการย้อมด้วย Alizarin red S ในวันที่ 14 (A, C) และวันที่ 21 (B, D) หมายถึง รูป C และ D ขยาย 200 เท่าจากรูป A และ B หัวลูกศรแสดง mineralized nodule

3.2. ศึกษาคุณสมบัติของเซลล์สร้างกระดูกของหนูแรทชนิด primary rat osteoblast cell

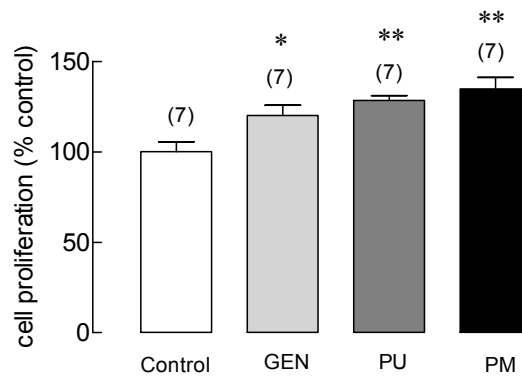
ก่อนที่จะทำการศึกษาผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวางเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์ primary rat osteoblast cell ต้องศึกษาก่อนว่า primary rat osteoblast cell จะสามารถตอบสนองต่อสารเอสโตรเจนสังเคราะห์ได้หรือไม่ โดยตรวจวัดการแสดงออกของ estrogen receptor-alpha (ER- α) และ estrogen receptor-beta (ER- β) และตรวจสอบคุณสมบัติการสร้างกระดูก *In vitro* Mineralization พบว่า primary rat osteoblast cell มีการแสดงออกของ ER- α และ ER- β mRNA (รูปที่ 22A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า primary rat osteoblast cell สามารถตอบสนองต่อสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวางเครือขาวได้ผ่าน ERs ดังนั้นเมื่อบ่มเซลล์กับ 10 nM E₂ นาน 48 ชั่วโมง พบว่า E₂ สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (รูปที่ 22B) และมีการแสดงออกของ osteoblast differentiation marker gene คือ ALP เพิ่มขึ้น (รูปที่ 22C) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน Runx2, osterix และ osteocalcin mRNA



รูปที่ 22 แสดงการแสดงออกของ estrogen receptor-alpha (ER- α) และ estrogen receptor-beta (ER- β) ของเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell โดยวิธี Realtime RT-PCR (A) เปอร์เซ็นต์ของ cell viability (B) และ การแสดงออกของ ALP ภายหลังจากการได้รับสาร 17 β -estradiol (E₂) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (*, ** = p<0.05 และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

3.3. ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ primary rat osteoblast cell

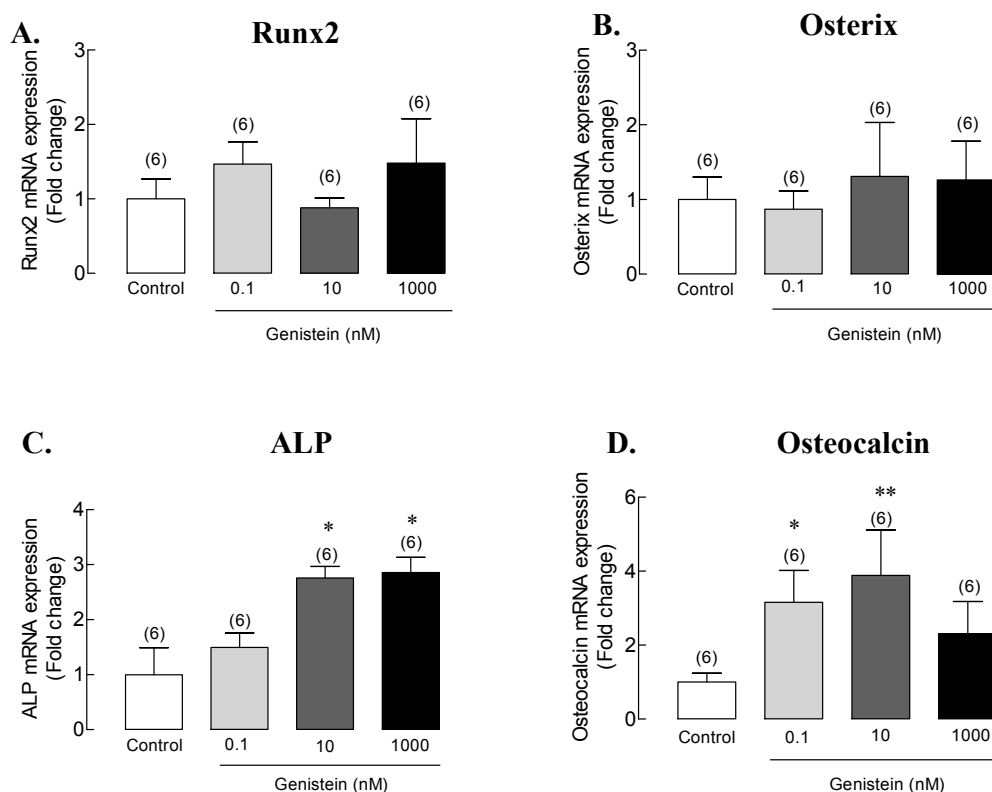
จากผลการตรวจวัดการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) โดยวิธี BrdU assay ของเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell ภายหลังจากการได้รับสารชนิดต่างๆ คือ genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L, puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 1000 nmol/L และสารสกัดจากกวาวเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ และ 0.01) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.3% DMSO) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 23) แต่พบว่ามีการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) เมื่อตรวจวัดโดยวิธี BrdU assay ลดลงในทุกกลุ่มการทดลอง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง



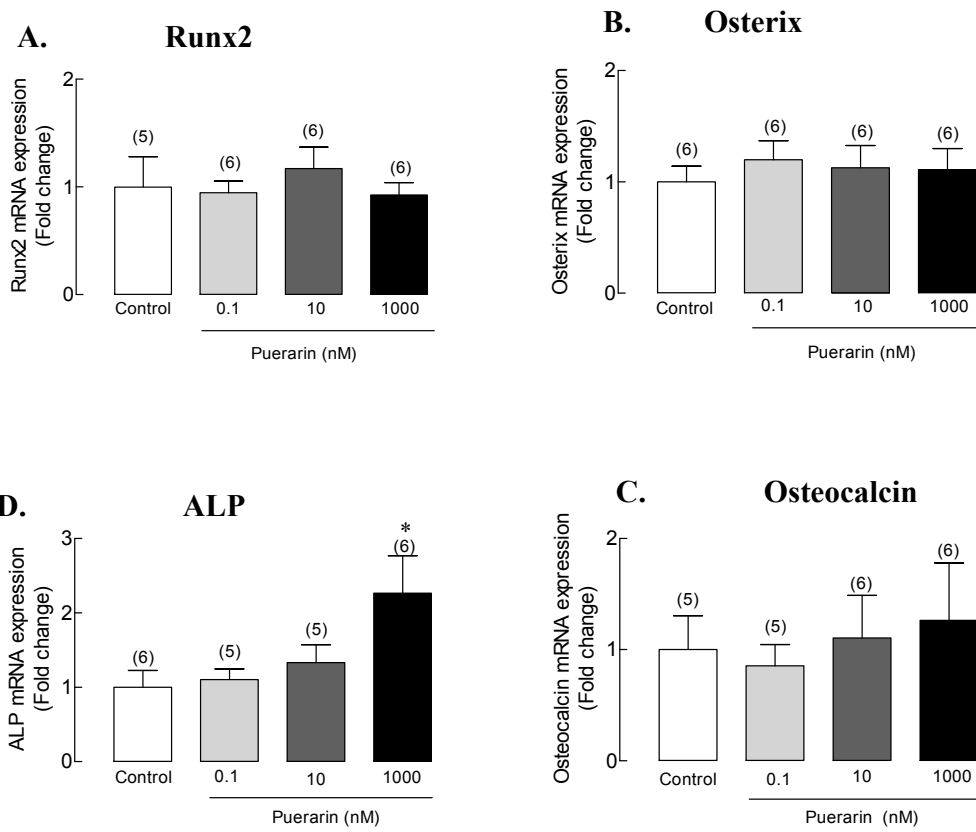
รูปที่ 23 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell ภายหลังจากการได้รับสารชนิดต่างๆ ได้แก่ 17β -estradiol (E_2), genistein (GEN), puerarin (PU) และ กวาวเครือขาว (PM) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

3.4. ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูก primary rat osteoblast cell

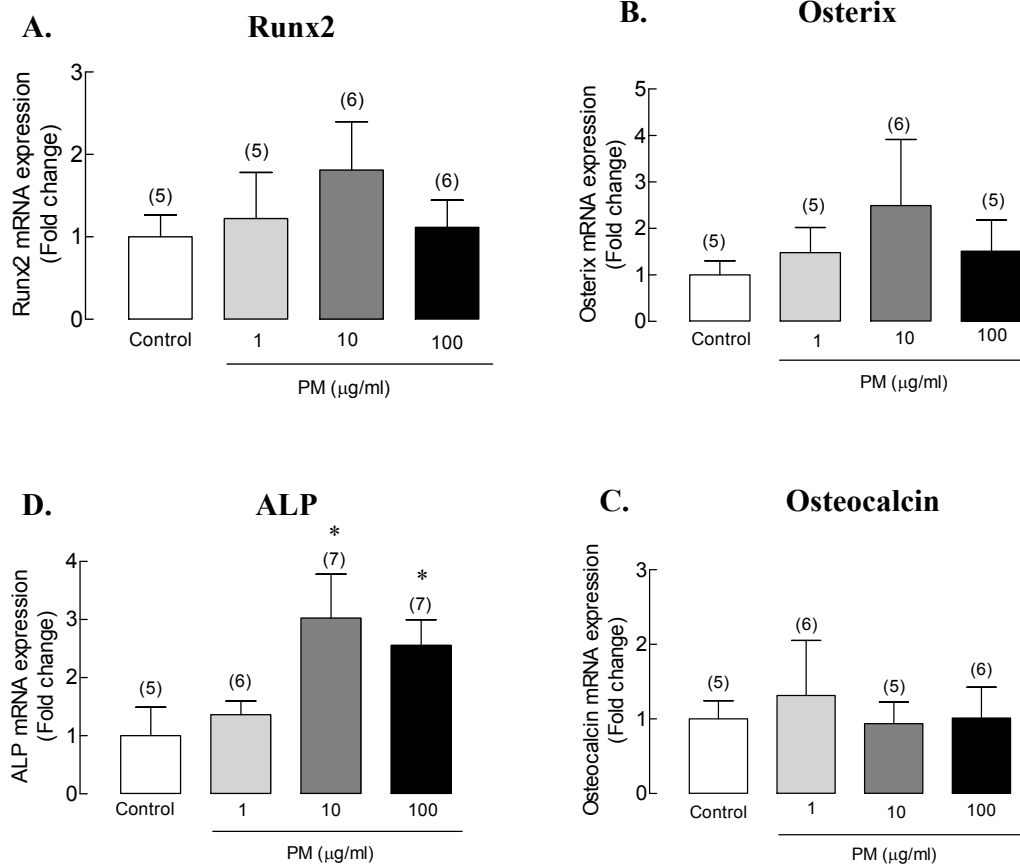
จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ด้วยวิธี Real-time RT-PCR ได้แก่ ยีน runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell ภายหลังจากได้รับสาร genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L, puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L และสารสกัดจากกวาวเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 µg/mL เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.3% DMSO) พบว่า E₂, GEN และ PU สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน ALP (รูปที่ 24-26) นอกจากนี้ GEN ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 10 nM ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน osteocalcin ได้อีกด้วย ในขณะที่ PU และสารสกัดจากกวาวเครือขาวไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ runx2, osterix และ osteocalcin



รูปที่ 24 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoblast differentiation ได้แก่ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell ภายหลังจากได้รับ genistein (GEN) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = p<0.05 และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



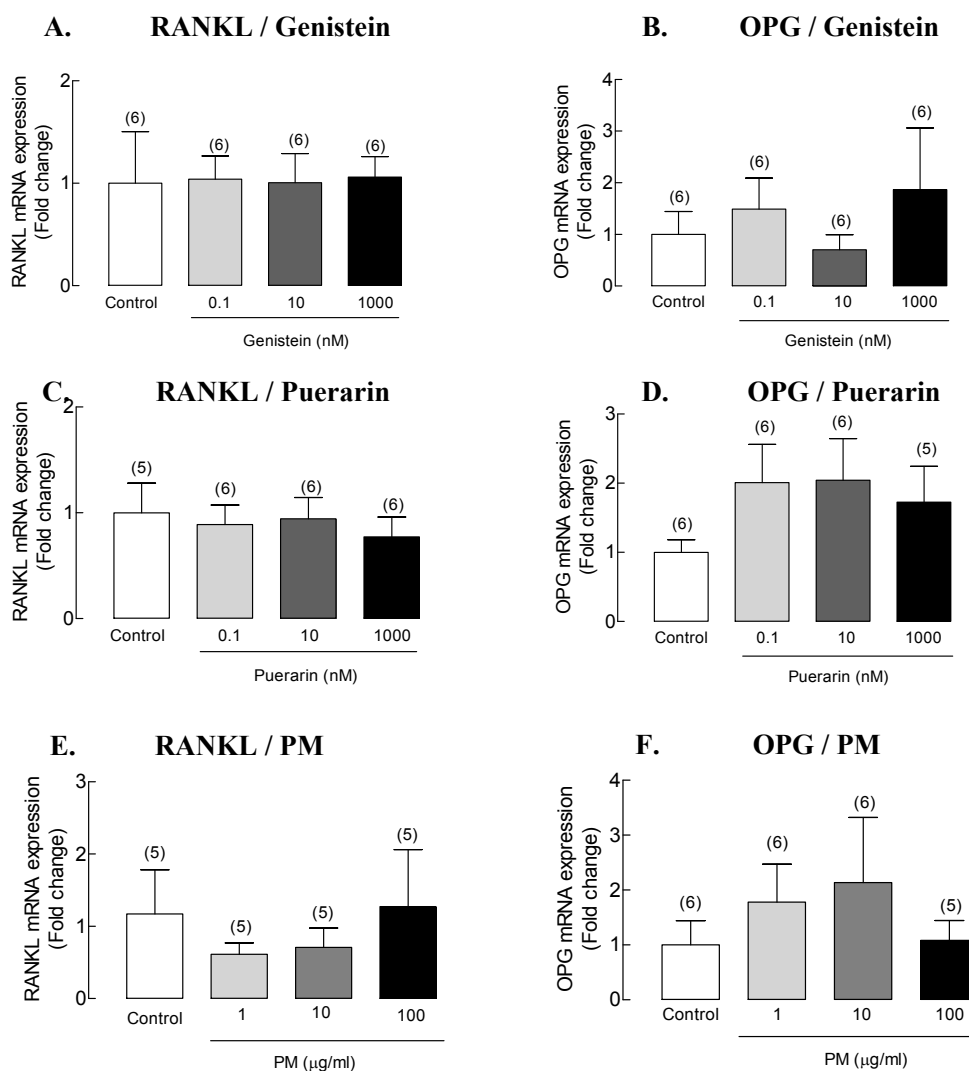
รูปที่ 25 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoblast differentiation ได้แก่ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell ภายหลังจากได้รับ puerarin(PU) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*,** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 26 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoblast differentiation ได้แก่ runx2, osterix, alkaline phosphatase (ALP) และ osteocalcin ในเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell ภายหลังจากได้รับสารสกัดกวางเครือขาว (PM) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

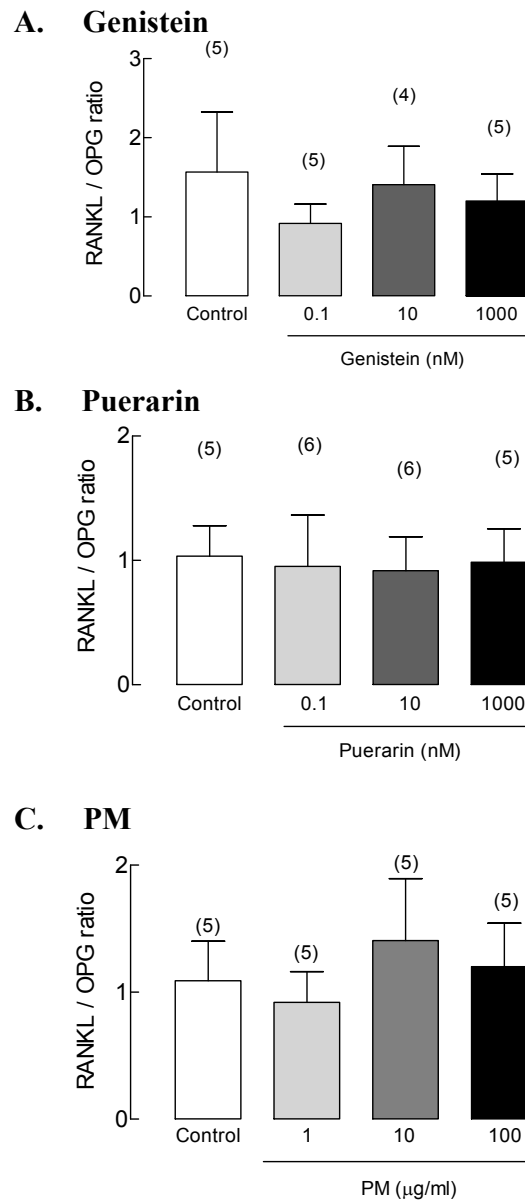
3.5. ผลของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์ primary rat osteoblast cell ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก

จากการตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation) ด้วยวิธี Real-time RT-PCR คือ receptor activator of nuclear factor kB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG) ในเซลล์กระดูกชนิด primary rat osteoblast cell ภายหลังจากได้รับสาร genistein (GEN) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L, puerarin (PU) ที่ความเข้มข้น 0.1, 10 และ 1000 nmol/L และสารสกัดกวาวเครือขาว (PM) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 µg/ml เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.3% DMSO) พบว่า GEN, PU และ PM ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL, OPG และ RANKL/OPG (รูปที่ 27-28)



รูปที่ 27 แสดงผลการแสดงออกของยีนจากเซลล์กระดูก primary rat osteoblast cell ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด osteoclast differentiation คือ receptor activator of nuclear factor kB (RANKL) และ osteoprotegerin (OPG)

ภายหลังจากได้รับ genistein (GEN), puerarin (PU) และสารสกัดกวางเครือขาว (PM) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)



รูปที่ 28 แสดงผลการแสดงออกของยีน RANKL/OPG จากเซลล์กระดูก primary rat osteoblast cell ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด osteoclast differentiation ภายหลังจากได้รับ genistein (GEN), puerarin (PU) และสารสกัดจากกวางเครือขาว (PM) ที่ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Real-time RT-PCR (*, ** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)

การอภิปรายผล

กวาวเครือขาว เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการสร้างกระดูก (osteogenic effect) โดยไปเพิ่มความหนาแน่นกระดูกและมวลกระดูก ทั้งในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ (Urasopon et al. 2007; 2008) ในการทดลองครั้งนี้จึงทำการศึกษานหาผลึกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนหลักที่พบในกวาวเครือขาว คือ Puerarin (PU) และ Genistein (GEN) ในเซลล์กระดูก osteosarcoma cell line (UMR-106 cells) ก่อน ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และศึกษาการแสดงออกของยีน เซลล์มีความหลากหลายของพันธุกรรมน้อยกว่า (genetic homogeneity) คงตัว ผลการทดลองที่ได้มีความแม่นยำ (reproductivity) และสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ง่ายและสะดวกกว่า (Midura et al., 1990; Celic et al., 1998) แต่อย่างไรก็ตาม osteoblast cell line เป็นเซลล์มะเร็งชนิด osteosarcoma มักจะเปลี่ยนรูปร่าง (transformation) และการแสดงออกของยีนและการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Karin and Farach-Carson, 2004) ในบางครั้งการตอบสนองของ cell line ต่อสารต่าง ๆ ผลที่ได้ อาจจะไม่เหมือนกับใน primary cell ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งใน primary rat osteoblast cell ที่ได้จากกระดูก long bone (tibia และ fibular) ของหนูแรทสายพันธุ์ SD ซึ่งมีการตอบสนองคล้ายกับเซลล์กระดูกในร่างกาย โดยเฉพาะในแง่การจดจำของเซลล์ (cellular memory) (Kasperk et al., 1995)

จากการศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบได้ในกวาวเครือขาวต่อการอยู่รอด (cell viability) และการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ osteoblast-like UMR-106 และ primary rat osteoblast cell พบว่าผลที่ได้ต่างกัน นั่นคือสารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบได้ในกวาวเครือขาว กระตุ้นการอยู่รอด (cell viability) และการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) ของเซลล์ osteoblast-like UMR-106 แต่ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ primary rat osteoblast cell ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า genistein กระตุ้นการเจริญของ primary mouse osteoblast cells (Pan et al., 2005) และ primary rat cavarial osteoblast cells แต่ไม่มีผลต่อ UMR106 cells (Li et al., 2005) ในขณะที่ genistein ที่ความเข้มข้น 1000 nM ไปลดการเจริญของ human osteosarcoma cell line (hFOB) ลง 20% (Rickard et al., 2003) ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า osteoblastic cells มีลักษณะเฉพาะในการเจริญและต่างกันในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า (Karin and Farach-Carson, 2004) ทั้งนี้สารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนทั้ง 2 ชนิด คือ genistein และ puerarin ที่มีผลลดอัตราการเจริญของเซลล์สร้างกระดูกวัยอ่อน osteoblast-like UMR106 cells คาดว่าไปกระตุ้นให้เซลล์พัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกเจริญวัยได้เร็วขึ้น

ในการซ่อมสร้าง (bone remodeling) ของเนื้อกระดูก จะเป็นการทำงานควบคู่กันของเซลล์ 2 ชนิด คือ osteoblast bone formation cell และ osteoclast bone resorption cell ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างและสลายกระดูก ตามลำดับ โดยเซลล์ทั้งสองชนิดนี้จะต้องมีการเจริญและเปลี่ยนแปลง (differentiation) จากเซลล์ในระยะวัยอ่อน (immature cells) ไปเป็นเซลล์โตเต็มวัย (mature cells) โดยได้รับการกระตุ้นจาก cytokine หรือฮอร์โมน หลายชนิด ซึ่งในการสร้างกระดูกโดย osteoblast นั้น ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ matrix maturation (การพัฒนาของเซลล์ระยะต้น) และ mineralization (การพัฒนาของเซลล์ระยะท้าย) (Ducy et al. 2000; Owen et al. 1990) ซึ่งมีปัจจัยในการควบคุมต่างกัน ดังนี้ 1) ในการพัฒนา

ของเซลล์สร้างกระดูกระยะต้น จะเป็นการเปลี่ยนจาก mesenchymal cells ไปเป็น osteoblastic lineage ที่ถูกควบคุมโดย Runx2 และ osterix (Komori 2006) โดย Runx2 สามารถกระตุ้นการเจริญของ mesenchymal stem cell และกระตุ้นการเปลี่ยนไปเป็น pre-osteoblasts (Komori 2006; Ducy et al. 2000) หลังจากนั้น osterix จะกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) ต่อไป (Komori 2006) การเจริญของเซลล์สร้างกระดูกวัยอ่อน (Pre-osteoblasts) สามารถถูกกระตุ้นโดยสารอื่น ๆ ได้เช่นกัน เช่น IGF-1, fibroblast growth factor-2 และ bone morphogenetic proteins (Ou et al. 2010; Zaidi 2007) โดยปกติแล้วหลังจากที่การเจริญของเซลล์สร้างกระดูกลดลง การแสดงออกของ matrix maturation marker คือ ALP จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น (Zaidi 2007; Stein et al. 2004; Owen et al. 1990) 2) การพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกระยะท้าย ที่ประกอบด้วยการสร้างเนื้อกระดูก (mineralization) ซึ่งในระยะนี้จะมีการแสดงออกของยีน osteocalcin เพิ่มขึ้น (Stein et al. 2004; Owen et al. 1990) ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองนี้พบว่า ภายหลังจากบ่มเซลล์ กับสารสกัดกวางเครือขาว puerain และ genistein นาน 48 ชั่วโมง ทั้งใน osteoblast-like UMR-106 cells และ primary rat osteoblast cells ทำให้การแสดงออกของ ALP เพิ่มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของ Runx2, osterix and osteocalcin ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดกวางเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในกวางเครือขาวกระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูก โดยไปกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกระยะต้น มากกว่าระยะท้าย แต่อย่างไรก็ตามก็ควรที่จะศึกษาผลต่อ bone marker ใหม่ ๆ เพิ่มเติม

นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ คือ osteoblast และ osteoclast ยังสามารถสื่อสารกัน (cross-talk) ได้ ผ่านการสร้างและหลั่ง RANKL and OPG (Simonet et al. 1997; Kong et al, 1999; Teitelbaum, 2000) โดย osteoblast ในระยะเซลล์เจริญวัยจะหลั่งสาร RANKL ที่ไปจับกับตัวรับ (RANK receptor) ที่วางตัวอยู่บนเซลล์สลายกระดูกวัยอ่อน (osteoclast precursors) และไปกระตุ้นให้เซลล์สลายกระดูกวัยอ่อนพัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูกเจริญวัย (mature osteoclasts) ในขณะที่การสลายกระดูก (osteoclastogenesis) สามารถถูกยับยั้งได้โดย OPG (a soluble decoy receptor of RANKL) ซึ่งหลังจาก mature osteoblast เช่นกัน โดย OPG จะไปจับกับ RANKL ทำให้ไม่สามารถจับกับ RANK receptor ได้ ดังนั้นสัดส่วนของการแสดงออกของ OPG ต่อ RANKL (OPG/RANK หรือ RANKL/OPG ratio) จะสามารถบ่งชี้การสร้างและสลายกระดูกได้ (Anandarajah, 2008) โดยปกติแล้วเซลล์สร้างกระดูกเป็นเป้าหมายของ osteoclastogenic agents หลายชนิด เช่น พาราไทรอยด์ฮอร์โมน และโปรแลกติน โดยไปกระตุ้นให้ RANKL/OPG ratio เพิ่มขึ้น และทำให้เกิดการสลายกระดูกเพิ่มขึ้น และเกิดโรคกระดูกพรุน (Charoenphandhu et al. 2010; Zaidi 2007; Teitelbaum 2000) ในการทดลองครั้งนี้สารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดกวางเครือขาวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ OPG mRNA เพิ่มขึ้น ในเซลล์ osteoblast-like UMR106 cells แม้ว่าสารสกัดกวางเครือขาวและ genistein ที่ขนาดสูงสุด เท่ากับ 100 µg/mL และ 1,000 nmol/L ตามลำดับ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL ได้ แต่สัดส่วนของ RANKL/OPG ก็ยังคงมีค่าต่ำอยู่ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดกวางเครือขาว นอกจากจะมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างกระดูกแล้ว ยังสามารถยับยั้งการสลายกระดูกด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ของ Li et al. (2004) ที่ว่า พูวารินในความเข้มข้น 0.01–1 µmol/l สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของเซลล์สลายกระดูกได้ เมื่อทำ osteoblast/osteoclast co-culture ใน bovine bone slices โดยไปลดจำนวนและพื้นผิวของเซลล์สลายกระดูกที่เนื้อ

กระดูก (surface area of osteoclast absorption lacunae) และเมื่อให้ genistein ที่ความเข้มข้น 10 nM กระตุ้นการแสดงออกของยีน OPG mRNA ใน mouse osteoblast cells MC3T3-E2 (Chen et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาซ้ำในเซลล์ primary rat osteoblast cells ในครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ RANKL, OPG และ RANKL/OPG ratio

ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า puerarin ซึ่งเป็นสารหลักที่พบในกวาวเครือขาว สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกวัยอ่อน คือ ALP โดยผ่าน ER ได้ ซึ่งเซลล์สร้างกระดูก osteoblast-like UMR106 cells ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถแสดงออก ER α และ ER β และสามารถตอบสนองต่อเอสโตรเจนและไฟโตเอสโตรเจนได้ (Li et al. 2005) จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ICI182780 สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน Osterix, ALP และ Osteocalcin ได้ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการกระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูก (osteoregulatory actions) โดยสารไฟโตเอสโตรเจนและสารสกัดกวาวเครือขาวผ่าน ER คล้ายกับการออกฤทธิ์ของ E₂ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ทำการทดลองในเซลล์ primary osteoblasts และ osteoblast cell lines ว่า (Zhang et al. 2007; Li et al. 2005) puerarin ที่ความเข้มข้น 10–100 μ mol/l สามารถกระตุ้นการออกฤทธิ์ของ ALP เพิ่มขึ้น และกระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูก (mineralizing nodules) ใน primary rat osteoblasts ผ่าน phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway

โดยสรุปการทดลองนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า สารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบได้ในกวาวเครือขาว เช่น พูวาริน และเจนิสเทอีน สามารถกระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูกได้โดยไปกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกวัยอ่อนไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกเจริญวัย ดังเห็นได้จากการการแสดงออกของยีน ALP mRNA และไปยับยั้งการสลายกระดูก โดยไปเพิ่มการแสดงออกของยีน OPG จึงทำให้ RANKL/OPG ratio ลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้จึงช่วยสนับสนุนศักยภาพของกวาวเครือขาวที่จะพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนต่อไปในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลในเซลล์ osteoblast เพียงฝ่ายเดียว เพื่อให้ได้คำตอบที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้นควรศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวและสารไฟโตเอสโตรเจนที่มีพบในกวาวเครือขาวต่อเซลล์ osteoclast ด้วย และด้วยข้อเสนอแนะของ US-FDA ที่ว่า ในการพัฒนาและผลิตสารที่จะใช้ในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนในมนุษย์ ต้องทำการทดสอบในสัตว์ทดลองอย่างน้อย 2 ชนิด และด้วยลักษณะโครงสร้างกระดูกในหนูแตกต่างจากคน ดังนั้นจึงควรทำการทดลองในสัตว์อื่น เช่น ลิง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และควรที่จะมีแผนความร่วมมือกับบริษัทเอกชนเพื่อที่จะพัฒนากวาวเครือขาวไปเป็นยาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนในคนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Anandarajah AP. 2008. Role of RANKL in bone disease. *Trend in Endocrinology and Metabolism* 20:88-94.
- Canavan T P, Doshi NR. 1999. Endometrial cancer. *American Family Physician*. 59: 3069 – 3077.
- Celic S, Katayama Y, Chilco PJ, Martin TJ, Findlay DM. 1998. Type I collagen influence on gene expression in UMR106-06 osteoblast-like cells is inhibited by genistein. *Journal of Endocrinology* 158:377-388.
- Charoenphandhu N, Wongdee K, Krishnamra N. 2010. Is prolactin the cardinal calciotropic maternal hormone? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21: 395–401.
- Chen X, Garner SC, Quarles LD, Anderson JJ. 2003. Effects of genistein on expression of bone markers during MC3T3-E1 osteoblastic cell differentiation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14:342-349.
- Cherdchewasart W, Sriwatcharakul S. 2007. Major isoflavonoid content of the 1-year cultivated phytoestrogen – rich herb, *Pueraria mirifica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 7: 2527- 2533.
- Cherdshewasart W, Kitisama Y, Malaivijitnond S. 2007. Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. *Journal of Reproduction and Development* 53: 385-393.
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289: 1501–1504.
- Fontanges E, Fontana A, Delma P. 2004. Osteoporosis and breast cancer. *Joint Bone Spine*. 71: 102– 110.
- Kanis JA, Melton LJ, Christian JC, Khaltaeu N. 1994. The diagnosis of osteoporosis. *Osteoporosis International* 9: 1137 – 1147.
- Karin NJ, Farach-Carson MC. 2004. In vitro regulation of osteoblast activity. In *Bone Formation Vol. 1; Topics in Bone Biology*. Bronner F and Farach-Carson MC (ed.). Tokyo: Springer, 18-43.
- Kasperk C. et al. 1995. Human blood cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:2511-2517.
- Komori T. 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry* 99: 1233–1239.
- Kong YY, et al. 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304-309.
- Li L, Liu Q, Jiang M, Chen H, Wang S. 2004. Inhibitory effect of puerarin on osteoclastic bone resorption in vitro. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* 26: 1830–1833.
- Li L, Liu Q, Zhang Y, Cui Y, Gong H. 2005. Effects of puerarin on the proliferation and alkaline phosphatase activity of UMR-106 cells. *Chinese Journal of New Drugs* 14: 1291–1294.

- Lissin LW, Cooke JP. 2000. Phytoestrogen and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology* 35: 1403–1410.
- Midura RJ, McQuillan DJ, Benham KJ, Fisher LW, Hascall VC. 1990. A rat osteogenic cell line (UMR106-01) synthesizes a highly sulfated form of bone sialoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 265:5285-5291.
- Ohta H, Makita K, Komukai S, Nozawa S. 2002. Bone resorption versus estrogen loss following oophorectomy and menopause. *Maturitas*. 43: 27 – 33.
- Ou G, Charles L, Matton S, Rodner C, Hurley M, Kuhn L, Gronowicz G. 2010. Fibroblast growth factor-2 stimulates the proliferation of mesenchyme-derived progenitor cells from aging mouse and human bone. *Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 65: 1051–1059.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology* 143: 420–430.
- Pan W, et al. 2005. Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *Journal of Cell Biochemistry* 94:307-316.
- Pongchaiyakul C, Apinyanurak C, Soontrapa S et al. 2006. Prevalence of osteoporosis in Thai men. *Journal of Medical Association of Thailand*. 89: 160-169.
- Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC. 2003. Phytoestrogen genistein acts as estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *Journal of Cell Biochemistry* 89: 633-646.
- Riggs BL. 1982. Changes in bone mineral density of proximal femur and spine with aging: Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndrome. *Journal of Clinical Invest* 70: 716 – 733.
- Simonet WS, Lacey DL, Danstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R et al. 1997. Oostopotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319.
- Smith MR. 2006. Treatment-related osteoporosis in men with prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 12: 6315s-6319s.
- Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pockwinse SM. 2004. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23: 4315–4329.
- Sulak PJ. 1997. Endometrial cancer and hormone replacement therapy: Appropriate use of progestin to oppose endogenous and exogenous. *Endoc Met Clin North America*. 26: 399 – 412.

- Teitelbaum SL. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504–1508. Tham, D.M., Gardner, C.D., Haskell, W.L., 1998. Clinical review 97: potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83: 2223–2235.
- Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K., Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2007. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevent bone loss in orchidectonized rats. *Maturitas*. 56: 322-331.
- Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2008. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas*. 59(2):137-148
- Zaidi M. 2007. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature Medicine* 13: 791–801.
- Zhang Y, Zeng X, Zhang L, Zheng X. 2007. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/Akt pathway in rat calvaria osteoblasts. *Planta Medica* 73: 341–347.

ส่วนผนวก
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1. บทความในวารสารวิชาการนานาชาติ

- Malaivijitnond S. 2012. Medical applications of phytoestrogens from *Pueraria mirifica* Thai herb. *Frontiers of Medicine*. 6(1):8-21
- Tiyasatkulkovit W, Charoenphandhu N, Wongdee K, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Malaivijitnond S. 2012. Upregulation of osteoblastic differentiation marker mRNA expression in osteoblast-like UMR 106 cells by puerarin and phytoestrogens from *Pueraria mirifica*. *Phytomedicine*. 19(13):1147-1155. (IF2011=3.268)

2. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

- Engkananuwat P, Sananmuang T, Tungmunnithum D, Malaivijitnond S. 2012. Puerarin can increase bone mass in estrous female rats. The 7th AOSCE Congress, Kuala Lumpur Malaysia. 3-8 March 2012. Pp.85.
- Malaivijitnond S, Tiyasatkulkovit W, Charoenphandhu N. 2013. A comparative molecular event between rat and monkey bone cells in response to phytoestrogenic activity. The 17th International Congress of Comparative Endocrinology. 15-19 July 2013. Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Barcelona, Spain, O43.
- Malaivijitnond S, Urasopon N., Tiyasatkulkovit W., Kittivanichkul D., Charoenphandhu N. 2014. Anti-osteoporotic effects of phytoestrogens containing plant *pueraria mirifica*: in vitro and in vivo approaches. The 7th Intercongress symposium of the AOSCE. 18-23 March 2014. National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan.

เอกสารแนบ (ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์)