

รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารตัวอย่างต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7)

ตัวอย่างสาร: Bamboo Mouthwash

รายละเอียดของตัวอย่าง: สารเหลวสีน้ำตาลเข้ม

วันที่ทดสอบตัวอย่าง: 26 มกราคม 2569

วิธีทดสอบ: MTT และ Griess test

1. การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay

1.1 ทำการเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 1×10^5 cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 เติมหาอาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบตามความเข้มข้น 5%, 2%, 1% และ 0.5% จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 ทำการเติมสารละลาย 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อให้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เปลี่ยน MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มาซาน (Formazan)

1.4 เมื่อครบกำหนดเวลาทำการละลายผลึกฟอร์มาซานด้วย DMSO และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570/630 nm โดยค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของผลึกฟอร์มาซานซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) ของสารทดสอบด้วยวิธี Griess test

2.1 ทำการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ใน 96 well plate ที่ความหนาแน่นเซลล์ 1×10^5 cells/well แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วทำการล้างเซลล์ในหลุมด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นทำการบ่มด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบของสารทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นมีความปลอดภัยต่อเซลล์มากกว่า 80% และทำการเจือจางลง 2 เท่า แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS (Lipopolysaccharide) ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL

2.3 ทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกมาปริมาตร 25 µL แล้วเติม Sulfanilamide reagent ปริมาตร 25 µL แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายทำหน้าที่เปลี่ยนไนไตรท์เป็นกรดไนตริก

2.5 เติมนีเตรีน reagent ปริมาตร 25 µL แล้วบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายทำหน้าที่จับกับกรดไนตริกแล้วเกิดเป็นสารประกอบเอโซ (Azo) ที่มีสีชมพูอมม่วง

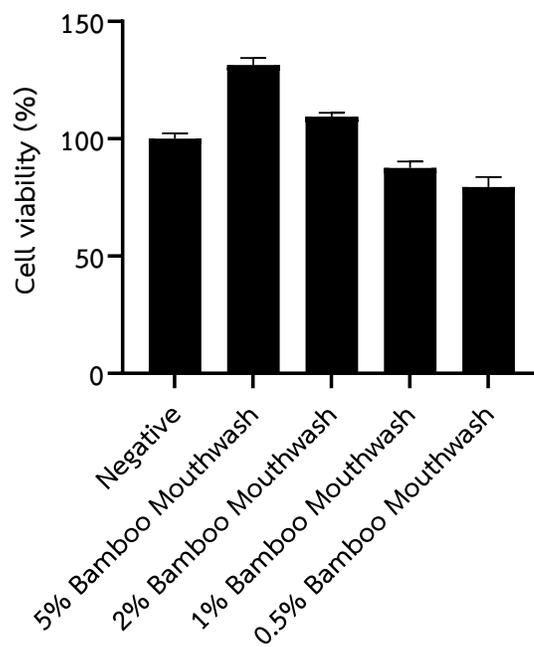
2.6 ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยความเข้มข้นของสีชมพูอมม่วงที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณของไนไตรท์ในตัวอย่างทดสอบ

2.7 แทนค่าที่ได้เทียบกับสมการของกราฟมาตรฐานของสารไนไตรท์ (Nitrite) เพื่อหาปริมาณการหลั่งไนไตรท์จากเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารทดสอบ

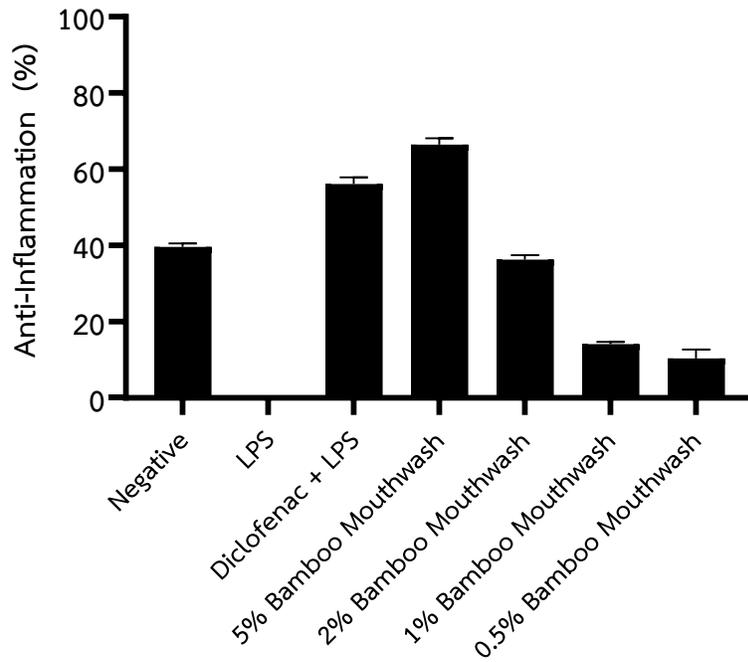
ผลการทดสอบ

ผลการประเมินความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) หลังการได้รับ Bamboo Mouthwash ในความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าผลิตภัณฑ์มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกันตามความเข้มข้น โดยกลุ่มควบคุมมีค่า cell viability ประมาณ 100% ขณะที่ Bamboo Mouthwash ความเข้มข้น 5% แสดงค่าความมีชีวิตของเซลล์สูงสุดประมาณ 130–135% บ่งชี้ถึงแนวโน้มการส่งเสริมการอยู่รอดหรือการเจริญของเซลล์ ส่วนความเข้มข้น 2% มีค่า cell viability ประมาณ 110% ซึ่งยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในทางตรงกันข้าม ความเข้มข้น 1% และ 0.5% ส่งผลให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงมาอยู่ที่ประมาณ 85–90% และ 75–80% ตามลำดับ โดยสรุป Bamboo Mouthwash แสดงผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent effect) โดยความเข้มข้น 5% ให้ผลดีที่สุดในการเพิ่ม cell viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1)

ผลการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) พบว่ากลุ่มควบคุม (Negative control) มีค่าการยับยั้งการอักเสบอยู่ที่ประมาณ 40% ขณะที่การกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับ diclofenac ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก แสดงค่าการต้านการอักเสบเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 55–60% สำหรับกลุ่มที่ได้รับ Bamboo Mouthwash พบว่าความเข้มข้น 5% ให้ฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงที่สุด โดยมีค่าประมาณ 65–70% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมบวกอย่างชัดเจน รองลงมาคือความเข้มข้น 2% ที่มีค่าประมาณ 35–40% ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมลบ ในขณะที่ความเข้มข้น 1%, 0.5% และ 0.25% แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบลดลงตามลำดับ โดยมีค่าประมาณ 15%, 10% และต่ำกว่า 10% ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า Bamboo Mouthwash มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent effect) โดยความเข้มข้น 5% ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งกระบวนการอักเสบภายใต้สภาวะที่กระตุ้นด้วย LPS (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ภายหลังจากบ่มด้วย Bamboo Mouthwash เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 แสดงกิจกรรมต้านการอักเสบของเซลล์ (Anti-inflammation) ภายหลังจากผ่านการบ่มด้วย Bamboo Mouthwash เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สรุปผลการทดสอบ

Bamboo Mouthwash แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ขึ้นกับความเข้มข้น โดยความเข้มข้น 5% ให้ผลดีที่สุด ทั้งในด้านการเพิ่มความมีชีวิตของเซลล์และการต้านการอักเสบภายใต้การกระตุ้นด้วย LPS ขณะที่ความเข้มข้นที่ต่ำลงให้ประสิทธิภาพลดลงตามลำดับ สะท้อนถึงศักยภาพของผลิตภัณฑ์ในด้านความปลอดภัยและฤทธิ์ต้านการอักเสบ