

คุณสมบัติในการสมานแผลและความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของชีวสาร
จากแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14
Wound Healing Property and Cytotoxicity against Normal Lymphocytes
from Biocompounds Produced by *Brevibacillus laterosporus* SA14

วารางคณา จุ่งลก^{1*} ลัดลาวัลย์ สนิท² วราภรณ์ หมื่นสัน² และมณฑล เลิศคณาวณิชกุล^{3*}
Warangkana Chunglok^{1*}, Ladlawan Sanit², Waraporn Meensan² and Monthon Lertcanawanichakul^{3*}

บทคัดย่อ

ชีวสารจากแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 มีฤทธิ์ต้าน methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดบาดแผลแบบเรื้อรัง จึงได้สนใจศึกษาฤทธิ์ของชีวสารในการสมานรอยแผลของเซลล์ผิวหนัง (HaCaT) โดยวิธี wound closure assay และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติโดยวิธี MTT assay ปรากฏว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่เตรียมจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ได้เร็วกว่าเซลล์ HaCaT ที่บ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อลูเรีย-เบอร์ทานี นอกจากนี้พบว่าชีวสารที่ระดับความเข้มข้น 10-80 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติและสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาว จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำชีวสารไปเป็นต้นแบบใช้ในการพัฒนาเป็นสารสำหรับการรักษาบาดแผลได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : การสมานแผล ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว *Brevibacillus laterosporus* SA14

¹ ผศ.ดร., สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

² นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

³ รศ.ดร., สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

* Corresponding author : e-mail: lmonthon@wu.ac.th Tel 075-672104 ext. 2180

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

Abstract

Biocompounds from *Brevibacillus laterosporus* SA14 possessed inhibitory activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), a major cause of chronic wounds. The effects of the biocompounds for wound healing of skin cells (HaCaT) was studied using wound closure assay. Cytotoxicity of biocompounds against white blood cell (WBC) was also monitored using MTT assay. It was found that biocompounds from *Brev. laterosporus* SA14 prepared by precipitation with 80% ammonium sulfate at a concentration of 40 µg protein/ml causes the movement of HaCaT cells faster than HaCaT cells cultured in Luria-Bertani medium. Interestingly, the biocompounds at concentration of 10-80 µg/ml did not show cytotoxic effect to WBC and can stimulate WBC proliferation. These biocompounds have a potential to be used as a prototype compound for the treatment of wounds in the future.

Keywords : Wound Healing, Cytotoxicity *Brevibacillus laterosporus* SA14

บทนำ

การสมานแผล (Wound healing) เป็นกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อตามธรรมชาติที่ซับซ้อน ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดเพื่อการสมานแผลกันเป็นจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นทั้งจากพืช เช่น สารสกัดจากว่านหางจระเข้ [1] สารสกัดจากใบบัวบก [2] รวมไปถึงชีวสารจากแบคทีเรียบางชนิดที่อาจนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้ เช่น ชีวสารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (LS) สามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบ กระตุ้นการผลิต Tumor necrosis factor α (TNF- α) และกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ ของ neuroblastoma cell line (Neuro-2a), chicken embryos and bovine embryos [3] ส่วนเอนไซม์โปรติเอส (protease) ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน ที่แยกทำบริสุทธิ์ได้มาจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brevibacillus laterosporus* G4 ในระดับความเข้มข้น 1302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg protein/ml) สามารถพ่ายยัติตัวกลมได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง แต่หากเป็นสารสกัดหยาบ โปรตีน (crude protein) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน จะฆ่าหนอนพยาธิตัวกลมได้ภายในเวลา 12 ชั่วโมง [4] และแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* บางสายพันธุ์ผลิต acrySTALLIFEROUS protein ซึ่งเป็นสารคล้ายโปรตีนมีฤทธิ์ในการต้านแมลงวันและยุงลายได้ [5] สำหรับแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้มีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้าน methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [6] ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการเกิดบาดแผลเรื้อรัง แต่ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการสมานแผลหรือความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เพราะในการนำสารออกฤทธิ์ไปใช้จริงต้องคำนึงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของชีวสารที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ในการสมานแผลและความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้พัฒนาเป็นยารักษาบาดแผลต่อไป

วิธีการวิจัย

การเตรียมชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14

เพาะเลี้ยง *Brev. laterosporus* SA14 (ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB) (Scharlau, Spain) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (มล.) ในขวด Duran ขนาดบรรจุ 1000 มล. บ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (Cocono, Korea) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Sorvall 5 C) นำส่วนใสที่เรียกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth) และอาหารเหลว LB ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนโปรตีนชีวสารด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตะกอนไปละลายด้วย 0.5 M Phosphate Buffer Saline, PBS (Na_2HPO_4 8.9 กรัมต่อลิตร (ก./ล.), KH_2PO_4 6.8 ก./ล.) และทำการ dialysis (Pierce, France) เก็บส่วนใสไว้สำหรับการทดสอบวัดความเข้มข้นของโปรตีนในชีวสารด้วยวิธี Bradford (Biorad, USA) โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) (Merck, Germany) แล้วแบ่งเก็บชีวสารไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT

เลี้ยงเซลล์ HaCaT (p 40-46) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA, Austria) ซึ่งมีองค์ประกอบของ ที่มีส่วนผสมของซีรัมลูกวัว 10% (10% fetal bovine serum, FBS) (Invitrogen, USA), ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน/สเตรปโตมัยซิน 1% (1% penicillin/streptomycin) (PAA, Austria) และกลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM glutamine) (PAA, Austria) ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (CO incubator; Thermo Electron corporation, Germany) 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% และความชื้น 95 % บ่มเลี้ยงไว้ 24-48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาทำการทดสอบ

การทดสอบความสามารถในการสมานแผลโดยศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT

แยกเซลล์ HaCaT โดยการย่อยด้วยทริปซิน (trypsinization) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture dish) ซึ่งมีพื้นที่ 21 ตารางเซนติเมตร ให้มีปริมาณ 3×10^5 เซลล์ ต่อ 1 culture dish บ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้น 95% วัคซีนเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ จากนั้นชุดเซลล์ออกให้พื้นที่ว่าง ล้างเซลล์ด้วย PBS ประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่หลุดหลุดออกมา แล้วจึงเติม DMEM (2% FBS, 1% penicillin/streptomycin) ลงไปนำไปบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนในชีวสารต่าง ๆ (10 ถึง 80 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) โดยทำเจือจางแบบสองเท่าเป็นลำดับ ลงไปใน culture dish สำหรับกลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ซึ่งไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเชื้อ และ PBS ในการทดสอบ ส่วนควบคุมผลบวกใช้ Allantoin (Sigma, USA) (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในการทดสอบ สังเกตการเคลื่อนที่ของเซลล์พร้อมถ่ายภาพเซลล์ที่เคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่ได้ชุดเซลล์ออก เมื่อเวลา 30 นาที 3 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

นำเลือดที่ได้รับบริจาคมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (PAA, Austria) ที่มีองค์ประกอบของ 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin และ 2 mM glutamine ที่ไม่มี Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในสัดส่วน 1:2 เติม Ficoll-Hypaque gradients (Lymphoprep: Robbin Scientific Corporation, Norway) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรของ ต่อปริมาตรเลือด 8 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ล้างด้วย PBS นำเซลล์ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ ครบถ้วน ทำการทดสอบ 3 ครั้ง ๆ ละ 2 ขั้ว

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

การศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยวิธี MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนเซลล์ 1×10^5 เซลล์ต่อพื้นที่ 1.88 ตารางเซนติเมตร (24-well plate) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีองค์ประกอบต่างๆ ครบถ้วน บ่มเลี้ยงร่วมกับชีวสารจากเชื้อ *Brev. laterosporus* SA 14 และอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ (10 ถึง 80 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) บ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และ ความชื้น 95% เติม MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลท์ เป็นผลิตภัณฑ์ formazan เติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลาย formazan วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Dynex/MRX microplate reader, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรแล้วหักลบค่าที่ได้ออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร ทำการทดสอบ 3 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ โดยคำนวณจากสูตร ร้อยละของการมีชีวิตรอด = (ค่าดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ค่าดูดกลืนแสงของควบคุมผลลบ) $\times$ 100

ผลการวิจัย

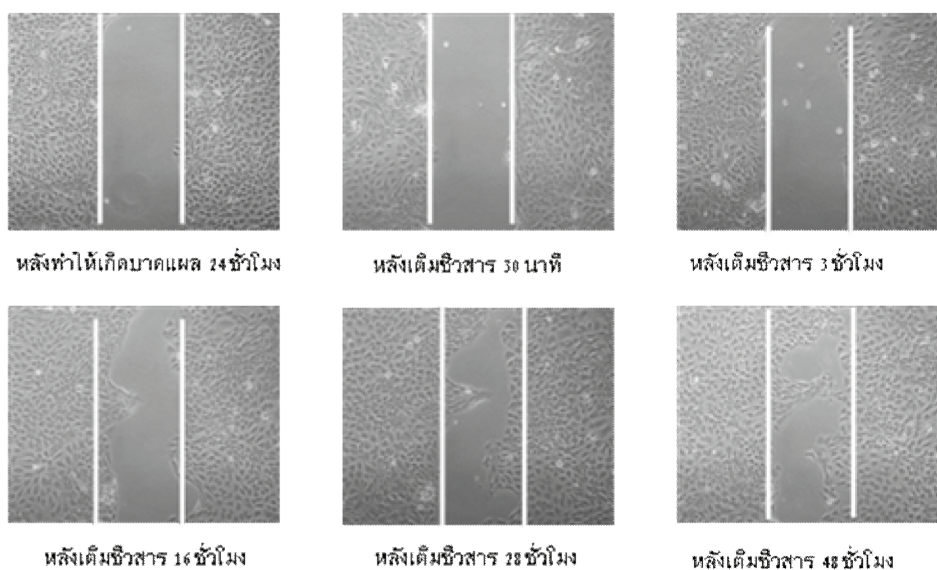
ความสามารถในการสมานแผลโดยการศึกษากลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT

จากการนำชีวสารที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) 40 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่มาปิดบาดแผลเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที และมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ไปจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 1 ส่วนสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เตรียมเช่นเดียวกับตะกอนของน้ำเลี้ยงเชื้อทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และมีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 28 ชั่วโมง ไปจนถึงเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 2 ส่วน PBS ไม่ทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาปิดบาดแผล ดังแสดงในภาพที่ 3 และ Allantoin ซึ่งใช้เป็นควบคุมผลบวกทำให้เซลล์ HaCaT มีการเคลื่อนที่เข้ามาเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และเห็นการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4

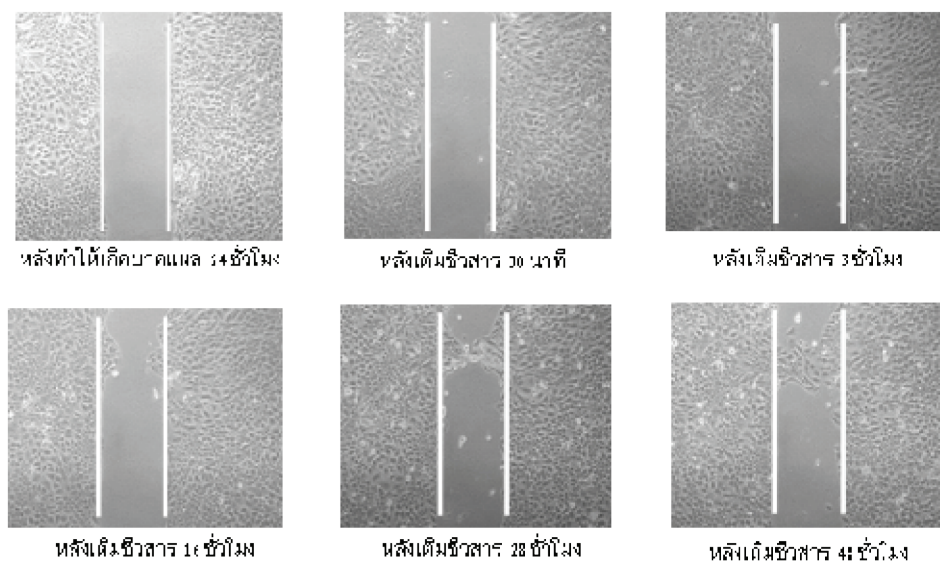
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยวิธี MTT assay

จากการนำชีวสารดังกล่าวในข้างต้นมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยดูการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อใช้ชีวสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าชีวสารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10-80 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว แต่มีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 5

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

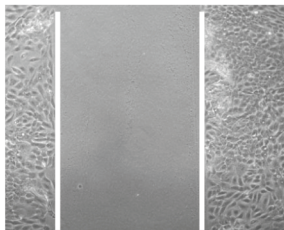


ภาพที่ 1 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยชีวสารที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA 14 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิกรัม) ใน 2% FBS

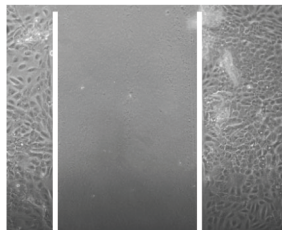


ภาพที่ 2 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ใน 2% FBS

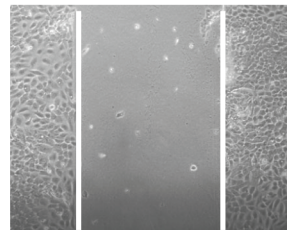
จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557



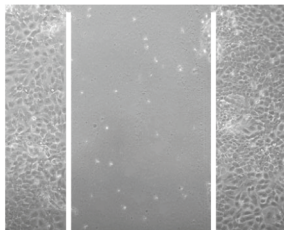
หลังทำให้เกิดบาดแผล 24



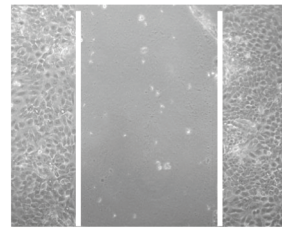
หลังเติมซีวสาร 30 นาที



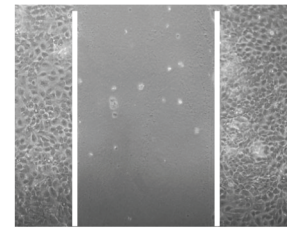
หลังเติมซีวสาร 3 ชั่วโมง



หลังเติมซีวสาร 16 ชั่วโมง

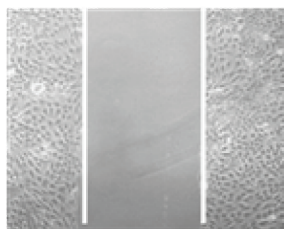


หลังเติมซีวสาร 28 ชั่วโมง

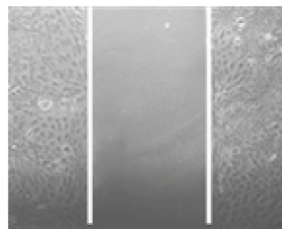


หลังเติมซีวสาร 48 ชั่วโมง

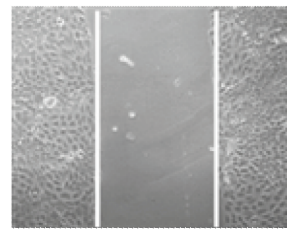
ภาพที่ 3 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วย PBS ใน 2% FBS



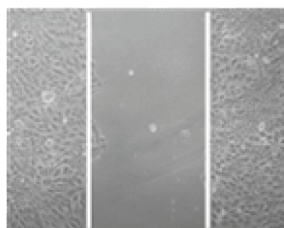
หลังทำให้เกิดบาดแผล 24 ชั่วโมง



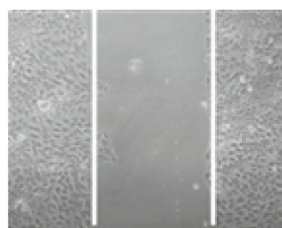
หลังเติมซีวสาร 30 นาที



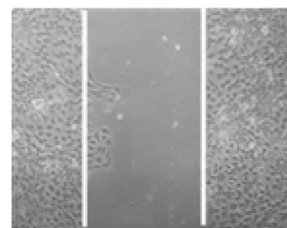
หลังเติมซีวสาร 3 ชั่วโมง



หลังเติมซีวสาร 16 ชั่วโมง



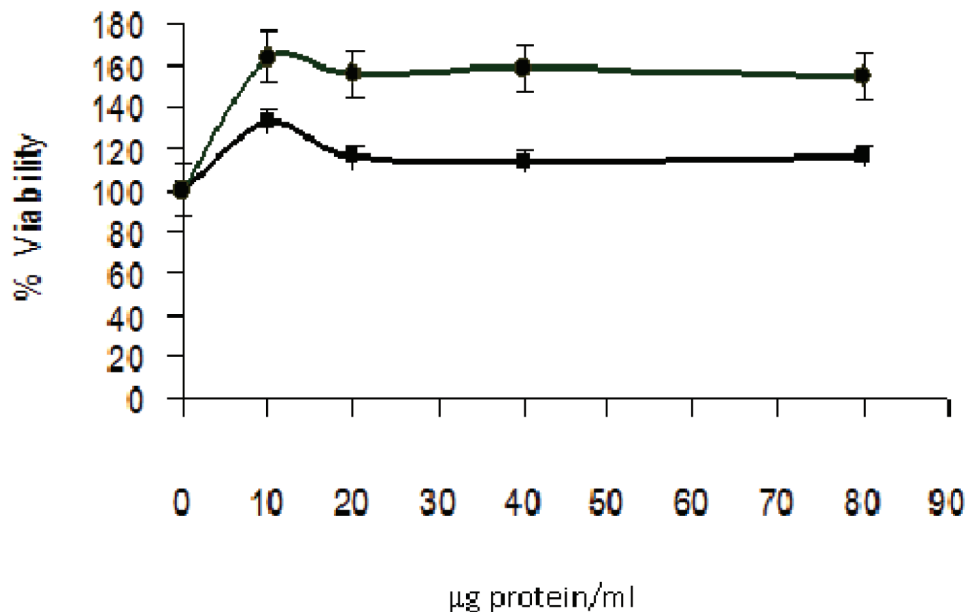
หลังเติมซีวสาร 28 ชั่วโมง



หลังเติมซีวสาร 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 4 การเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วย Allantoin ใน 2% FBS

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557



ภาพที่ 5 การมีชีวิตของเซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อทดสอบด้วยชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (●) และสารสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (■)

สรุปผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การนำชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบความสามารถในการสมานแผลของเซลล์ HaCaT ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g protein/ml}$) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ 2% FBS พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่เตรียมจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์ HaCaT เริ่มมีการเคลื่อนที่เข้ามาเร็วที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ซึ่งน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่เกิดบาดแผลได้เร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาพที่ 1 และ 2) จากผลการทดสอบข้างต้นแสดงให้เห็นว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ HaCaT เคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่เกิดบาดแผลได้อย่างชัดเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบของ 2% FBS เนื่องจากการจำกัดปริมาณของปัจจัยสนับสนุนการเจริญ (growth factor) ใน FBS ไว้ การศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเมื่อมีการอักเสบ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียทำให้ epithelial cell ได้รับความเจ็บและจะส่งผลคือ ทำให้เกิดการซ่อมแซมและสมานบาดแผลอย่างรวดเร็วเพื่อที่จะปิดบาดแผลที่เกิดขึ้นโดยทำให้เกิดการเคลื่อนที่ (migration) และกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ epithelial cell จนกระทั่งบาดแผลปิด [7] จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ พบว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่เตรียมจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ และสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเช่นกัน แต่ชีวสารดังกล่าว

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2557

ยังทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติเพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งมีรายงานว่าเม็ดเลือดขาวจากคนปกติสามารถถูกกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้จาก bacterial antigen ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* [8] ดังนั้นคุณสมบัติของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT และไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ จึงอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นสารต้นแบบสำหรับการรักษาบาดแผลได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (WU56106) และขอขอบพระคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่สนับสนุนวัสดุ-อุปกรณ์บางอย่างในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] นวลศรี รักอาริยะธรรม และอัญญา เจนวนิธิสุข. (2546). แอนติออกซิเจน : สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย. เชียงใหม่ : นพบุรีการพิมพ์.
- [2] Schmidt, E., Nelson, J. and Fillmore, J. (2004). Synthesis of tyrosine derivatives for saframycin MX1 biosynthetic studies. **Tetrahedron Letters**. 45, 3921-3924.
- [3] Li, W.I., Brackett, B.G. and Halper, J. (2005). Culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* stimulates proliferation of Embryonic Cells. **Experimental Biology and Medicine**. 230 (7), 494-500.
- [4] Huang, X., Tian, B., Niu, Q., Yang, J., Zhang, L. and Zhang, K. (2005). An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. **Research in Microbiology**. 156(5-6), 719-727.
- [5] Cohen, S., Cahan, R., Ben-Dov, E., Nisnevitch, M., Zaritsky, A. and Firer, M.A. (2007). Specific targeting to murine myeloma cells of Cyt1Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*. **Journal of Biological Chemistry**. 282(39), 28301-28308.
- [6] กฤษณวัน นาคบุตร กิ่ง ดาววีระกุล และอภิญญา ชูพันธ์. (2550). การศึกษาคุณสมบัติของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียหมายเลข SA14, SA15 หรือ SA16 ที่มีฤทธิ์ต้านสแตปไฟโลคอคคัสออเรียส ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วทบ. เทคนิคการแพทย์). สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ นครศรีธรรมราช : มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.
- [7] Karrasch, T. and Jobin, C. (2009). Wound Healing Responses at the Gastrointestinal Epithelium : a Close Look at Novel Regulatory Factors and Investigative Approaches. **Gastroenterology**. 47(12), 1221-1229.
- [8] Al-Attayah, R.J. and Mustafa, A.S. (2009). Mycobacterial antigen-induced T helper type 1 (Th1) and Th2 reactivity of peripheral blood mononuclear cells from diabetic and non-diabetic tuberculosis patients and *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guérin (BCG)-vaccinated healthy subjects. **Clinical Experimental Immunology**. 158(1), 64-73.