



ผลของกรตเบทูลินิกต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันของ
เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร



ผลของกรดเบตูลินิกต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์
ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

THE EFFECT OF BETULINIC ACID ON HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL
PROLIFERATION, OSTEOGENIC AND ADIPOGENIC DIFFERENTIATION



By

MISS Sasithon SENAMONTREE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (BIOLOGY)

Department of BIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2021

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ ผลของกรดเบตูลินิกต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น
เซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์
ของมนุษย์

โดย ศศิธร เสนามนตรี

สาขาวิชา ชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิภาห์ ตุ่มน้อย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อติศรี เจริญพานิช)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณิมนารักษ์ อยู่คงแก้ว)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

59303207 : ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ กรดเบทูลินิก เซลล์ไขมัน เซลล์สร้างกระดูก

นางสาว ศศิธร เสนามนตรี: ผลของกรดเบทูลินิกต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง กรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5-50 μM ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ UE7T-13 กรดเบทูลินิกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase, การสะสมแคลเซียม, และการแสดงออกของยีนกระดูก ในขณะที่กรดเบทูลินิก 5- 20 μM ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glycerol 3-phosphate dehydrogenase, การสะสมไขมัน, และจำนวนของหยดไขมัน นอกจากนี้กรดเบทูลินิกยังส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันสีน้ำตาลซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการเผาผลาญพลังงาน โดยเซลล์ไขมันสีน้ำตาลจะมีหยดไขมันขนาดเล็กกว่าเซลล์ไขมันสีขาวซึ่งทำหน้าที่ในการสะสมไขมัน จากผลการศึกษาพบว่ากรดเบทูลินิก 15 และ 20 μM เพิ่มสัดส่วนของหยดไขมันขนาดเล็ก ($<1 \mu\text{m}^2$) ในขณะที่ลดสัดส่วนของหยดไขมันขนาดใหญ่ ($\geq 2 \mu\text{m}^2$) จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค qRT-PCR พบว่ากรดเบทูลินิกยับยั้งการแสดงออกของยีน *C/EBP- α* ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว ในขณะที่ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *PGC-1 α* และ *UCP-1* ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล กรดเบทูลินิกยังยับยั้งการหลั่ง Adiponectin และ Leptin โดยปริมาณการหลั่งลดลงมากกว่าร้อยละ 24 และที่น่าสนใจ กรดเบทูลินิกเพิ่มการดูดซึมกลูโคสและกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ ในระหว่างที่เซลล์ถูกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน จึงสรุปได้ว่ากรดเบทูลินิกยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว ในขณะที่เพิ่มการแสดงออกของเซลล์ไขมันสีน้ำตาล โดยส่งผลในระดับการแสดงออกของยีน, เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไขมัน, การสะสมไขมัน, ขนาดของหยดไขมัน, และการดูดซึมกลูโคส นอกจากนี้กรดเบทูลินิกยังส่งเสริมการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน, การทำงานของเอนไซม์, และการสะสมแคลเซียม จึงเป็นไปได้ที่จะนำเอากรดเบทูลินิกมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติของสมดุลในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์

59303207 : Major (BIOLOGY)

Keyword : mesenchymal stem cells betulinic acid osteoblast adipocyte

MISS SASITHON SENAMONTREE : THE EFFECT OF BETULINIC ACID ON HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL PROLIFERATION, OSTEOGENIC AND ADIPOGENIC DIFFERENTIATION THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR DR. ADISRI CHAROENPANICH

The effects of betulinic acid (BetA) on the proliferation, osteogenic differentiation, and adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) were examined in this work. The results indicated that BetA 0-50 μM had no effect on the viability of UE7T-13 cells after 24 hours. During osteogenesis, BetA increased alkaline phosphatase (ALP) activity, calcium deposition, and osteogenic marker genes. BetA 5-20 μM inhibited the development of human mesenchymal stem cells into adipocytes. It inhibited glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity, total lipid content, and lipid droplet formation. Additionally, BetA stimulated the development of brown adipocytes. Brown adipocytes regulate metabolic processes and have smaller lipid droplets than white adipocytes. BetA concentrations of 15 and 20 μM increased the ratio of small lipid droplets ($<1 \mu\text{m}^2$) while decreasing the ratio of large lipid droplets ($\geq 2 \mu\text{m}^2$). The qRT-PCR results indicated that BetA significantly suppressed the expression of *C/EBP- α* , a white adipocyte marker, and elevated brown adipocyte markers *PGC-1 α* and *UCP-1*. BetA also suppressed adiponectin and leptin secretion by more than 24%. Notably, BetA boosted hMSC glucose absorption and metabolic activity during adipogenesis. This result indicated that BetA inhibited white adipocyte differentiation in hMSCs while inducing brown adipocyte differentiation. BetA had an effect on the expression of mRNA, enzyme activity, lipid accumulation, lipid droplet size, and glucose uptake. Additionally, BetA promoted osteogenic development of human mesenchymal stem cells (hMSCs) by increasing mRNA expression, enzyme activity, and calcium deposition. BetA demonstrated potential for the prevention and treatment of illnesses caused by an imbalance between osteogenesis and adipogenesis.

กิตติกรรมประกาศ

ผลของกรตเบทูลินิกต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา จากงบประมาณแผ่นดิน ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ 2562 ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณหน่วยงานและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศรี เจริญพานิช ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสั่งสอนให้ความรู้ ให้กำลังใจ แนะนำการเรียนรู้ และการทำวิจัยอย่างเอาใจใส่เสมอมา อีกทั้งยังสั่งสอนและให้แง่คิดในการดำเนินชีวิต รวมถึงการเป็นแบบอย่างที่ดี ทำให้ข้าพเจ้าได้เรียนรู้ทั้งด้านวิชาการ การทำงานวิจัย และการดำเนินชีวิต และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิภาห์ ตุ่มน้อย ที่ให้เกียรติเป็นประธานทั้งในการสอบพิจารณาหัวข้อวิทยานิพนธ์ และการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์สถิติ รวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณิมนรารห์ อยู่คงแก้ว กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ที่นอกจากจะให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ในขั้นตอนของการสอบพิจารณาหัวข้อแล้ว ยังให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และข้อเสนอแนะต่างๆ ในการจัดทำเล่มวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งแง่คิดและข้อเสนอแนะในประเด็นที่นำเสนอในงานวิจัยในอนาคตอีกด้วย และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและภาควิชาชีววิทยา ซึ่งเป็นเหมือนบ้านหลังที่สองของข้าพเจ้าที่คอยให้การสนับสนุนไม่ว่าจะเป็นทุนการศึกษา และการสนับสนุนการเดินทางไปนำเสนอผลทางวิชาการ ทำให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสเรียนรู้และเปิดโลกทัศน์ในด้านงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวนงนุช กำลังแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ และนายจำปา เกาต์วง บุคลากรฝ่ายสนับสนุนของภาควิชาชีววิทยา ผู้มีส่วนช่วยเหลือในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมไปถึงขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัตว์ ได้แก่ นางสาวพรวิภา พวงบุบผา, นางสาวจิตติพร หลักฐาน, นางสาวกมลวรรณ ชาตรี, นางสาวจุฑาทิพย์ ทับทิมหอม, นางสาววิษญาดา มุรินทร์สาคร, นางสาวจิตรานุช สุรกุล, นางสาวกษมวรรณ ผลประสาร, นายฉัตรธรรม เพ็ชรคง, นายพัศวีร์ ศรีบุญเอียด, นางสาวสรวิวรรณ ชูเดช, นางสาวฉัตรนันท ตาละลักษมณ์, นางสาวกวิณฑิพย์ วิสาละศิลป์ และนางสาวสุภาณี ดวงแก้ว ที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันในการทำงานวิจัย ทำให้ห้องปฏิบัติการของเราเต็มไปด้วยบรรยากาศของความรักใคร่กลมเกลียวกัน รวมถึงขอขอบคุณนางสาวณัฐลิตา พัทพ์ ที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือสำหรับทำ Real-time PCR

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้การสนับสนุน และคอยเป็นกำลังใจในการเรียนและการทำสิ่งที่รักเสมอ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
ขอบเขตการศึกษา.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1. เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells : MSC).....	4
2. การเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Osteogenesis)	6
3. การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipogenesis).....	8
4. โรคที่เกี่ยวข้องกับการขาดความสมดุลกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้าง กระดูกและเซลล์ไขมัน.....	13
5. กรดเบทูลินิก (betulinic acid)	17
6. การทดสอบกิจกรรมเมตาบอลิกของเซลล์.....	20
7. เทคนิค Real-time PCR.....	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	27
อุปกรณ์.....	27

เครื่องมือ	28
สารเคมี.....	29
เซลล์เพาะเลี้ยง	30
อาหารเลี้ยงเซลล์	30
วิธีการทดลอง	31
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	41
1. ผลของกรดเบทูลินิกต่ออัตราการรอดชีวิตและกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์	41
2. กรดเบทูลินิกชักนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก.....	43
3. กรดเบทูลินิกส่งผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์	45
4. กรดเบทูลินิกส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน.....	50
5. ผลของกรดเบทูลินิกต่อการหลั่ง Adipokine ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน.....	62
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล	64
ภาคผนวก.....	70
คำอธิบายคำย่อ	107
รายการอ้างอิง	109
ประวัติผู้เขียน.....	131

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ความเป็นพิษของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ของมนุษย์ (72 ชั่วโมง)	18
ตารางที่ 2	แสดงข้อมูลคุณสมบัติของ primer sequence ของยีน osteogenic และ adipogenic differentiation marker ที่ใช้ในการศึกษา	22
ตารางที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของโปรตีนมาตรฐาน	75
ตารางที่ 4	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของแคลเซียมมาตรฐาน	77
ตารางที่ 5	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อหาค่า IC-50 ของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	82
ตารางที่ 6	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่ได้รับ BetA 3 วัน	83
ตารางที่ 7	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับ BetA 3 วัน	84
ตารางที่ 8	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่ได้รับ BetA 3 วัน	85
ตารางที่ 9	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่ได้รับ BetA 7 วัน	86
ตารางที่ 10	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับ BetA 7 วัน	87
ตารางที่ 11	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่ได้รับ BetA 7 วัน	88
ตารางที่ 12	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Dunnett' C เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่ได้รับ BetA 10 วัน	89
ตารางที่ 13	แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับ BetA 10 วัน	90

ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่ได้รับ BetA 10 วัน.....	91
ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ ALP ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่เวลา 7 วัน	92
ตารางที่ 16 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการสะสมแคลเซียมของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่เวลา 14 วัน.....	93
ตารางที่ 17 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Nonparametric tests โดยใช้สถิติ Mann-Whitney tests เพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ GPDH ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 7 วัน	94
ตารางที่ 18 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการสะสมไขมันของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Oil-red O.....	95
ตารางที่ 19 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการจำนนวนหยดไขมันของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red....	96
ตารางที่ 20 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของหยดไขมันขนาดเล็ก ($< 1 \mu\text{M}^2$) ในเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red	97
ตารางที่ 21 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของหยดไขมันขนาด $\geq 1 \mu\text{M}^2$ และ $< 2 \mu\text{M}^2$ ในเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red	98
ตารางที่ 22 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของหยดไขมันขนาดใหญ่ $\geq 2 \mu\text{M}^2$ ในเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red	99
ตารางที่ 23 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3, 7, และ 10 วัน.....	100
ตารางที่ 24 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Dunnett'C เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3, 7, และ 10 วัน	103

ตารางที่ 25 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Nonparametric tests โดยใช้สถิติ Mann-Whitney tests เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3, 7, และ 10 วัน 104

ตารางที่ 26 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง Adiponectin ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM 105

ตารางที่ 27 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง Leptin ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM..... 106

ตารางที่ 28 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Nonparametric tests โดยใช้สถิติ Mann-Whitney tests เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง Leptin และ IL-6 ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM.. 106



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 Betulinic acid.....	17
ภาพที่ 2 แผนภาพในการถ่ายภาพไตกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์.....	36
ภาพที่ 3 กรดเบทูลินิกเข้มข้น 10-50 μM ไม่ส่งผลต่ออัตราการตายของเซลล์ UE7T-13	41
ภาพที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหารที่มี BetA 0-20 μM ในอาหาร CGM, ADM, และ ODM วันที่ 3 วัน, วันที่ 7 วัน, และ วันที่ 10 วัน (** $p < 0.01$)	42
ภาพที่ 5 กรดเบทูลินิกเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ALP ในเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ODM (** $p < 0.01$).....	43
ภาพที่ 6 การสะสมแคลเซียมของเซลล์ UE7T-13 เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับกรดเบทูลินิกเข้มข้น 5-15 μM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).....	44
ภาพที่ 7 Alizarin red แสดงให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกส่งเสริมการสะสมแคลเซียมของเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 14 วัน.....	44
ภาพที่ 8 การทำงานของเอนไซม์ GPDH ของเซลล์ UE7T-13 ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 7 วัน (* $p < 0.05$)	45
ภาพที่ 9 การสะสมหยดไขมันและค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย oil-red o เมื่อเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM และ ADM ที่มีกรดเบทูลินิก 0-20 μM เป็นเวลา 21 วัน (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 46	
ภาพที่ 10 ภาพถ่ายไตกล้องฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อย้อมหยดไขมันด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ Nile red 47	
ภาพที่ 11 กรดเบทูลินิก 10-20 μM ยับยั้งจำนวนหยดไขมัน/ต่อพื้นที่ ของเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ADM ที่มี BetA 0-20 μM เป็นเวลา 21 วัน (** $p < 0.01$)	48
ภาพที่ 12 สัดส่วนขนาดของหยดไขมันในเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ADM ที่มี BetA เข้มข้น 5-20 μM เวลา 21 วัน (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).....	48
ภาพที่ 13 การใช้น้ำตาลของเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร CGM และ ADM ที่มี BetA 0-20 μM 10 และ 14 วัน (* $p < 0.05$)	49
ภาพที่ 14 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันในเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3 วัน (** $p < 0.01$).....	51

ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 3 วัน	52
ภาพที่ 16 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ในอาหาร ODM 7 วัน (**p< 0.01).....	53
ภาพที่ 17 กรดเบทูลินิกส่งเสริมการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM 14 วัน (*p< 0.05, **p< 0.01)	54
ภาพที่ 18 การแสดงของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 3 วัน (**p< 0.01).....	55
ภาพที่ 19 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว ในอาหาร ADM ที่เวลา 7 วัน (**p< 0.01).....	56
ภาพที่ 20 การแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว ในอาหาร ADM 14 วัน (**p< 0.01).....	56
ภาพที่ 21 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น Brown adipocytes ในอาหาร ADM ที่เวลา 7 วัน (**p< 0.01).....	57
ภาพที่ 22 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น Brown adipocytes ในอาหาร ADM ที่เวลา 14 วัน (*p< 0.05).....	58
ภาพที่ 23 การแสดงออกของยีนกลุ่ม Adipokine ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 7 วัน (**p< 0.01)	59
ภาพที่ 24 การแสดงออกของระดับ mRNA ยีนในกลุ่ม Adipokine ของเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 14 วัน (*p< 0.05).....	60
ภาพที่ 25 การแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งกลูโคส ที่วันที่ 7 (**p< 0.01).....	61
ภาพที่ 26 ยีนขนส่งกลูโคสแสดงออกลดลงในเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก	61
ภาพที่ 27 ปริมาณการหลั่ง Adiponectin, IL-6, และ Leptin สะสมของเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ADM ที่มี BetA (*p< 0.05, **p< 0.01).....	63
ภาพที่ 28 ผลของกรดเบทูลินิกต่อกลไกการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์.....	69
ภาพที่ 29 กราฟโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง	75

ภาพที่ 30 กราฟแคลเซียมมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณแคลเซียมในตัวอย่าง..... 77



บทที่ 1 บทนำ

การเพิ่มขึ้นของกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์ และก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพตามมา เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 รวมถึงโรคกระดูกพรุน เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ไขมันที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้กระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกลดลง (Fazeli et al., 2013)

การรักษาโรคอ้วน และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในปัจจุบัน ใช้วิธีการปรับพฤติกรรม การกินควบคู่ไปกับการให้ยารักษา แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากยาที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบันมักส่งผลข้างเคียงต่อร่างกาย เช่น Orlistat เป็นยาที่ออกฤทธิ์ลดการดูดซึมสารอาหารของลำไส้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง Gastric และ Pancreatic lipase ผลข้างเคียงคือ อุดจากระเป็นมัน ถ่ายเหลว ปวดท้อง และยังพบว่าในผู้ป่วยบางรายมีอาการขาดวิตามินที่ต่ออาศัยไขมันในการดูดซึมอีกด้วย (Khan et al., 2012; Padwal et al., 2003; Rucker et al., 2007) และ Thiazolidinediones (TZD) ออกฤทธิ์ลดกรดไขมันอิสระในเลือด โดยการเพิ่มการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อไขมัน และการสะสมไขมันของเซลล์ แต่ในระยะยาวพบว่าส่งผลให้เกิดการแตกหักของกระดูก และโรคกระดูกพรุนในผู้ป่วย (Dobnig et al., 2006; Gerdhem et al., 2005; Kume et al., 2005; Mccarthy et al., 2004; Sanguineti et al., 2008)

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจกรดเบทูลินิก (Betulinic acid : BetA) เป็นสารสกัดจากธรรมชาติในกลุ่ม Pentacyclic triterpenoid สามารถพบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส เชื้อมาลาเรีย การอักเสบ รวมถึงการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis และที่น่าสนใจคือในประเทศจีนและเกาหลีใต้ มีการนำสารสกัดจากต้น Elderberry (*Sambucus williamsii* Hance) ซึ่งมีกรดเบทูลินิกเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญ มาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูก (Fu et al., 2016) นอกจากนี้มีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกสามารถยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์ Pre-adipocyte ของหนู (Kim & Go, 2017) และชักนำเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างกระดูก (Osteoblast) ของหนู ให้เกิดการทํางานและเพิ่มการสะสมแคลเซียมฟอสเฟตในมวลกระดูก อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการสลายของกระดูกที่ถูกชักนำโดยเซลล์มะเร็งในหนูได้ (Lo et al., 2010; Park et al., 2014)

เซลล์ที่ถูกเลือกใช้ในงานวิจัยนี้คือ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cell : MSC) ของมนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย (Adult stem cell) สามารถแยกได้จากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (Mesoderm) เช่น ไขกระดูก และเนื้อเยื่อไขมัน มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้เกือบทุกชนิด รวมถึงเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) และเซลล์ไขมัน (Adipocyte) (Sekiya et al., 2004) จากคุณสมบัติที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่กรดเบทูลินิก จะสามารถชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันได้ อย่างไรก็ตามองค์ความรู้เกี่ยวกับผลของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ยังมีน้อย ดังนั้นงานวิจัยในครั้งจึงเป็นครั้งแรกของการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์ ซึ่งเป็นการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ร่างกายมนุษย์โดยลดการใช้งานสัตว์ทดลอง และเพื่อเป็นแนวทางในการนำเอากรดเบทูลินิกและเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์ มาประยุกต์ใช้ในการรักษาสำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับความผิดปกติของความสมดุลกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Osteogenesis) และเซลล์ไขมัน (Adipogenesis) ได้จริงในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์
2. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และการสะสมแร่ธาตุของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์
3. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันและการสะสมไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์
4. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อกลไกการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลของกรดเบทูลินิกต่อการเจริญและการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์ เพื่อจะสามารถนำเอากรดเบทูลินิกและเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์ มาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการขาดความสมดุลกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์ไขมันได้จริงในอนาคต

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ เซลล์ไลน์ UE7T-13 เพื่อหาค่า IC_{50} ในสภาวะเซลล์เจริญ จากนั้นเลือกความเข้มข้นของกรดเบทูลินิก 5- 20 μM เพื่อศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ในอาหาร Complete growth medium (CGM), Osteogenic differentiation medium (ODM), และ Adipogenic differentiation medium (ADM) จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมัน โดยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ การสะสมแคลเซียมและหยดไขมันของเซลล์ และศึกษาการแสดงออกของยีน Osteogenic differentiation และ Adipogenic differentiation ในระดับ mRNA และการหลั่ง Adipokine



บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells : MSC)

เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) คือ เซลล์อ่อนที่ยังไม่มีหน้าที่เจาะจง มีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation) และสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ร่างกายชนิดอื่น ๆ ได้ (Differentiation) แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ (1) เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (Embryonic stem cell) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นเซลล์จากรก และ (2) เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย (Adult stem cells) สามารถเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ได้อย่างจำกัดกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells : MSC) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวเต็มวัย (Adult stem cells) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (Mesoderm) (Friedenstein et al., 1974) เช่น เนื้อเยื่อไขมัน เลือด ผิวหนัง และไขกระดูก มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast-like cells) มีลักษณะรูปร่างเรียวยาวคล้ายกระสวย สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ในเนื้อเยื่อชั้นกลาง (Mesoderm) ได้หลากหลายชนิด เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น เซลล์สร้างกระดูกอ่อน (Chondroblast) เซลล์กล้ามเนื้อ (Myocyte) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Vascular smooth muscle cell) เซลล์ประสาท (Neuron) รวมถึงเซลล์ไขมัน (Adipocyte) และ เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) ยกเว้นเซลล์ในระบบเลือด (Chamberlain et al., 2007; Jackson et al., 2012; James, 2013) จากคุณสมบัติดังกล่าวเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ จึงมักถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ เช่น เซลล์สร้างกระดูก และเซลล์เนื้อเยื่อไขมัน

โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากไขกระดูก (Bone marrow) ไขกระดูกเป็นเนื้อเยื่อยืดหยุ่นที่พบภายในบริเวณกระดูกชั้นใน ประกอบไปด้วยเซลล์หลากหลายชนิด เช่น เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (Hematopoietic stem cell) เซลล์ไขมัน รวมทั้งเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ เป็นต้น (Nasef et al., 2007)

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์ UE7T-13 ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ ที่ถูกเติมยีน hTERT และ E7 เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ มีข้อจำกัดคือเมื่อนำมาเลี้ยงใน

ห้องทดลอง พบว่าเป็นเซลล์ที่มีวงรอบในการแบ่งตัวที่จำกัด (finite) และมีอัตราการเจริญต่ำ นักวิจัย จึงได้ทำการพัฒนาเซลล์ไลน์จากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ แต่มีวงรอบในการแบ่งตัวไม่จำกัด (Infinite) โดยการใช้ไวรัสในการใส่ยีน Telomerase reverse transcriptase (hTERT) เข้าไปในเซลล์ hTERT เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการเข้าสู่ภาวะชราภาพของเซลล์ (Ducrest et al., 2002) แต่จากการศึกษาพบว่า hTERT ตัวเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มีรอบการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น จึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้ hTERT ร่วมกับ Human papillomavirus E6 และ E7 (HPV) พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ได้รับยีน telomerase reverse transcriptase ร่วมกับ human papillomavirus E6 และ E7 (hMSC- hTERT-E6/E7) มีรอบการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นจนถือได้ว่าเป็นเซลล์อมตะ (Immortalized) โดยไม่มีผลต่อความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ไปเป็นเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์สร้างกระดูก เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูกอ่อน เป็นต้น จึงทำให้ UE7T-13 เป็นเซลล์ที่มีวงรอบในการแบ่งตัวไม่จำกัด ในขณะที่ยังคงคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ คือสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่จำเพาะได้หลายชนิด (Abdallah et al., 2006; Mori et al., 2005) เซลล์ UE7T-13 จึงมักถูกนำไปใช้ในการศึกษาที่ต้องการทราบการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นทั้งเซลล์ในสร้างกระดูกและเซลล์ไขมัน (Kuroda et al., 2017; Sugimoto et al., 2017; Yokota et al., 2014)

MC3T3-E1 เป็นเซลล์ไลน์จากกระดูกสันหลังของหนู C57BL/6 ที่เกิดใหม่ อยู่ในระยะเซลล์ต้นกำเนิดกระดูก (Pre-osteoblast) จากการศึกษาพบว่า MC3T3-E1 มีการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) สูง และสามารถชักนำให้มีการสะสมแคลเซียมได้ จึงเป็นเซลล์ที่นิยมใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Beck et al., 1998; Wang et al., 1999) ในขณะที่เซลล์ที่นิยมใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน คือเซลล์ไลน์ 3T3-L1 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากหนู C57BL/6 เช่นกัน และอยู่ในระยะเซลล์ต้นกำเนิดไขมัน (Pre-adipocyte) (Green, 1974) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าเซลล์ทั้ง 2 เป็นเซลล์ที่เริ่มเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะแล้ว และไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น แตกต่างจากเซลล์ UE7T-13 ซึ่งอยู่ในสถานะเซลล์ต้นกำเนิดที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง

การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ในไขกระดูก (BMSC) มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด โดยเมื่อ BMSC เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกมากขึ้น ส่งผลให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน

ลดลง ในขณะที่เมื่อ BMSC เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกลดลง ปริมาณของเซลล์ไขมันในไขกระดูกก็จะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (Lee et al., 2014) ทั้งนี้ความสัมพันธ์ดังกล่าวมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเนื่องจาก หากร่างกายสูญเสียความสมดุลของกระบวนการทั้งสองจะก่อให้เกิดโรคตามมา เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคกระดูกพรุน เป็นต้น

2. การเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Osteogenesis)

การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เป็นกระบวนการของการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดกระดูก และเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ตามลำดับ พร้อมทั้งเกิดการสะสมแคลเซียม โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ β -glycerol-phosphate, Ascorbic acid-2-phosphate, และ Dexamethasone (Barry & Murphy, 2004) โดย β -glycerol-phosphate เป็นแหล่งของหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารจำเป็นต่อการสะสมแร่ธาตุ Ascorbic acid-2-phosphate ส่งเสริมให้เกิดการหลั่ง Collagen type 1 ซึ่งเป็น Extracellular matrix ของเซลล์สร้างกระดูก และ Dexamethasone เป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ *Runx2* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และชักนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase และเกิดการสะสมแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูก (Langenbach & Handschel, 2013; Maehata et al., 2007)

2.1 สารชีวโมเลกุลที่มีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

กระบวนการการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน โดยมีสารชีวโมเลกุลหลายชนิดที่เข้ามาบทบาทที่สำคัญ เช่น

(1) Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) หรือที่รู้จักกันดีในชื่อ Core-binding factor subunit alpha-1 (CBFA 1) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เช่น Type I collagen, alkaline phosphatase, osteopontin, osteonectin และ osteocalcin เป็นต้น ทั้งนี้จากงานวิจัยพบว่าหนูทดลองที่ขาดโปรตีน RUNX2 จะไม่พบเซลล์สร้างกระดูก (Franceschi et al., 2003; Kern et al., 2001; Komori, 2009)

(2) Osterix (OSX) หรือ Transcription factor Sp7 เป็นยีนที่ถูกควบคุมการแสดงออกด้วย RUNX2 ทำหน้าที่จับกับ RUNX2 มีบทบาทในการส่งเสริมการควบคุมการแสดงออก

ของยีนอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Cao et al., 2005; Xu et al., 2009)

(3) Bone morphogenetic proteins (BMPs) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างกระดูก และรักษาความสมดุลของกระดูก ทั้งนี้ยังพบว่า BMPs เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเชื่อมติดกันของรอยแตกหักของกระดูก โดยทำงานผ่าน BMPs/Smad1/5/8 pathway ชักนำให้เกิดการแสดงออกของ RUNX2 และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ชักนำให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูกเพิ่มขึ้น (Chen et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Retting et al., 2009)

(4) Transforming growth factor beta (TGF- β) เป็น โปรตีนซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเคลื่อนตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงสภาพ และการอยู่รอดของเซลล์ต่างๆ หลายชนิด ทั้งนี้ TGF- β เป็นไซโตไคน์ (Cytokine) ที่พบได้มากที่สุดในเรื่องกระดูก และมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการรักษาความสมดุลกระดูก มีบทบาทในการเพิ่มเซลล์สร้างกระดูกโดยกระตุ้นผ่าน TGF- β /Smad 2/3 pathway ให้เกิดการแสดงออกของ RUNX2 เช่นเดียวกับ BMPs (Attisano & Wrana, 2002; Zhao et al., 2009)

(5) WNTs เป็นไกลโคโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ผ่าน Wnt/ β -catenin pathway กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ Osteogenic transcription factor และนอกจากนี้ยังสามารถจับกับ Lrp5 ชักนำให้เกิดการแสดงออกของ Alkaline phosphatase เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Alfieri et al., 2010; Caira et al., 2006; Kang et al., 2007; Macdonald et al., 2009; Sritharen et al., 2017)

(6) β -catenin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของ Osteogenic transcription factor ผ่าน Wnt/ β -catenin pathway และส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase (Chen & Long, 2013)

(7) Alkaline phosphatase (ALP) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย้ายหมู่ฟอสเฟตในโมเลกุลหลายชนิด จึงมีบทบาทสำคัญในการสะสมแคลเซียม ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเซลล์สร้างกระดูก จากผลการศึกษาในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่ขาดเอนไซม์ ALP จะพบความผิดปกติในการสะสมแคลเซียม (Golub & Boesze-Battaglia, 2007)

2.2. การตรวจสอบการเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

โดยการตรวจสอบการเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกนั้น สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก การวัดการสะสมแคลเซียมของเซลล์ และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

Alkaline phosphatase activity เป็นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการย้ายหมู่ฟอสเฟตช่วยในการสะสมแร่ธาตุในกระดูก ซึ่งถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยอาศัยหลักการคือ ALP จะเข้าทำปฏิกิริยา Hydrolysis กับ p-Nitrophenyl phosphate (pNPP) (ใสไม่มีสี) ให้เปลี่ยนไปเป็น Inorganic phosphate (Pi) และ p-Nitrophenol (pNP) (สีเหลือง) ซึ่งสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 nm (Birmingham et al., 2012; Lorenz, 2011)

การตรวจวัดการสะสมแคลเซียมของเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกระดูก แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Calcium colorimetric assay โดยอาศัยคุณสมบัติของ O-cresolphthalein ที่ทำปฏิกิริยากับแคลเซียมได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 570 nm จากนั้นนำมาคำนวณปริมาณแคลเซียมโดยเปรียบเทียบกับกราฟแคลเซียมมาตรฐาน (Hokazono et al., 2009) และเชิงคุณภาพโดยย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย Alizarin red (Birmingham et al., 2012; Gregory et al., 2004)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อกลไกการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในระดับ mRNA โดยติดตามการแสดงออกของยีนในระยะเริ่มต้น (Early markers) ได้แก่ *Wnt*, β -catenin และ *ALP* และระยะท้าย (Late markers) ได้แก่ *ALP*, *RUNX2*, *OC*, และ *OPN* โดยใช้เทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sun et al., 2006)

3. การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipogenesis)

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์สามารถถูกชักนำให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันเมื่อถูกเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของ Dexamethasone, Indomethacin, และ Insulin โดย Dexamethasone ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ Glucocorticoid ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ในขณะที่ Indomethacin เป็นยาต้านการอักเสบชนิด Nonsteroidal ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ โดยกระตุ้นการทำงานของยีน Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR γ*) ซึ่งเป็น Transcription

factor ที่มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน และ Insulin เป็นองค์ประกอบสำคัญส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยทำหน้าที่ในการนำพาน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ เพื่อสะสมในรูปของไขมัน จากการรายงานพบว่าเซลล์ 3T3-L1 ของหนูที่ได้รับ Insulin จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันมากขึ้น (Kim & Ntambi, 2000; Klemm et al., 2001; Zhang et al., 2012) ทั้งนี้เซลล์ไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามคุณสมบัติและหน้าที่ ได้แก่ ไขมันสีขาว (White adipocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ไขมันที่ทำหน้าที่ในการเก็บสะสมไขมันจะมีลักษณะไขมันขนาดใหญ่ในเซลล์ และไขมันสีน้ำตาล (Brown adipocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ไขมันที่ทำหน้าที่ในการใช้พลังงาน จะมีลักษณะหยดไขมันขนาดเล็กๆ จำนวนมากภายในเซลล์ (Tiraby et al., 2003; Virtanen et al., 2009)

3.2. สารชีวโมเลกุลที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipogenesis)

สารชีวโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน ประกอบไปด้วยสารชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น

(1) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ซึ่งจัดเป็น transcription factors หลักของกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อไขมัน โดยทำงานร่วมกับ C/EBP- α ชักนำให้เกิดการแสดงออกของ Adipocyte markers อื่นๆ นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการสะสมไขมัน และการเผาผลาญกลูโคสอีกด้วย โดยจากการศึกษาในหนูทดลองที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพื่อชักนำให้เกิดโรคอ้วนและภาวะต้านฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin resistance) พบว่าหนูที่ถูก Knockout ยีน *PPAR γ* ในเนื้อเยื่อไขมัน จะมีการสะสมไขมันลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่มียีน *PPAR γ* (Jones et al., 2005; Park et al., 2017)

(2) CCAAT-enhancer-binding proteins alpha (C/EBP- α) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยยีน *C/EBP- α* เป็น Adipogenic transcription factors ทำหน้าที่ควบคุม Lipid-metabolizing enzymes และ Adipocyte markers อื่นๆ รวมถึง มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองของฮอร์โมน Insulin โดยจากการทดลองในเซลล์ 3T3-L1 พบว่าในเซลล์ที่มีความบกพร่องในการแสดงออกของ *C/EBP- α* จะมีการแสดงออก

ของ *PPAR γ* และการสะสมไขมันลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการตอบสนองต่อฮอร์โมน Insulin ลดลงอีกด้วย (Farmer, 2006; Lowe et al., 2011)

(3) Fatty acid binding protein 4 (FABP4) หรือ aP2 (Adipocyte Protein 2) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการพากรดไขมันเข้าสู่เซลล์ แสดงออกมากในเซลล์ไขมัน หรือ Macrophages จากการทดลองในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง และหนูที่เป็นโรคอ้วนพบว่าการแสดงออกของ FABP4 มากกว่าหนูปกติ สอดคล้องกับผลการศึกษาในมนุษย์ พบว่าปริมาณ FABP4 ในเลือดเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีค่า BMI สูงทั้งในเพศหญิงและเพศชาย (Cao et al., 2013; Qian et al., 2010)

(4) Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha (PGC-1 α) ทำหน้าที่เป็น Transcriptional coactivator กับ *PPAR γ* ที่ควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญพลังงาน มีบทบาทสำคัญคือเปลี่ยนแปลงไขมันสีขาวซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมไขมัน ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นไขมันสีน้ำตาล ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสลายพลังงานและการสร้างความร้อนในร่างกาย และนอกจากนี้ยีน *PGC-1 α* ยังชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *UCP-1* (Tiraby & Langin, 2003)

(5) Uncoupling protein 1 (UCP-1) เป็นโปรตีนที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย พบได้มากในไขมันสีน้ำตาล ทำหน้าที่เกี่ยวกับการถ่ายโอนโปรตอน (H^+) เข้าสู่ภายในของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไขมัน และทำให้เกิดความร้อนถูกชักนำให้แสดงออกโดย *PGC-1 α* พบการแสดงออกมากในเซลล์ไขมันสีน้ำตาล จึงมักถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันสีน้ำตาล (Bertholet et al., 2017; Fedorenko et al., 2012; Ricquier & Bouillaud, 2000)

(6) Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) นิยมใช้บ่งชี้ การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล โดยสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *UCP-1* มากขึ้น นอกจากนี้ (Tseng et al., 2008)

(7) Myogenic Factor 5 (MYF5) เป็นตัวบ่งชี้สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล และเซลล์กล้ามเนื้อของเซลล์ต้นกำเนิด โดยจากงานวิจัยพบว่าเนื้อเยื่อไขมันสีน้ำตาลจะพบการแสดงออกของยีน *MYF5* มากกว่าในเนื้อเยื่อไขมันสีขาว (Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014)

(8) PR domain containing 16 (PRDM16) มีทำหน้าที่ในการควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล และการเผาผลาญไขมันทำให้เกิดการใช้พลังงานของเซลล์ไขมัน (Ishibashi & Seale, 2015; Seale et al., 2008)

(9) Adipsin เป็น cytokine ที่หลั่งมาจากเซลล์ไขมัน สามารถเรียกได้อีกอย่างว่า Adipokine ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเผาผลาญไขมัน จึงมักถูกใช้เป็น Late marker ของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน จากผลการศึกษาในหนูทดลอง พบว่าในภาวะที่ได้รับอาหารไขมันสูงหนูที่ขาด Adipsin พบการสะสมไขมันลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ (Lo et al., 2014)

(10) Adiponectin เป็น Cytokine ที่ผลิตโดยเซลล์ไขมัน มีบทบาทในกระบวนการเผาผลาญพลังงาน โดยการเพิ่มขึ้นของ PPAR γ สามารถชักนำการแสดงออกของ Adiponectin เพิ่มขึ้น และปริมาณของ Adiponectin ในเลือดเพิ่มขึ้น (Maeda et al., 2001)

(11) Leptin เป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ควบคุมความหิวและระดับไขมันในร่างกาย โดยหลั่งจากเนื้อเยื่อไขมัน เมื่อ MSC เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น พบว่า *Leptin* จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น จึงมักถูกนำมาใช้เป็น Late marker ของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน เช่นเดียวกับ Adipsin และนอกจากนี้ยังพบว่าในหนูที่เป็นโรคอ้วนจะมีระดับ *Leptin* ในเลือดสูงกว่าหนูปกติ (Bornstein et al., 2000; Gemmis et al., 2006)

(12) Leptin-receptor (LEP-R) เป็น Hormone receptor ของ Leptin ทำให้ Leptin สามารถออกฤทธิ์ต่อ Hypothalamus ในการควบคุมความอยากอาหาร จากการศึกษาภาวะเบาหวานในหญิงตั้งครรภ์ พบว่าในหญิงตั้งครรภ์ที่มีปริมาณ Leptin-receptor สูง มีความเสี่ยงในการพบภาวะเบาหวานน้อยกว่าในหญิงตั้งครรภ์ที่มี Leptin-receptor ต่ำกว่า (Sommer et al., 2016; Yue et al., 2016)

(13) Interleukin-6 (IL-6) เป็นอีก 1 cytokine ที่มีความสำคัญอย่างใกล้ชิดกับความผิดปกติของภาวะดื้ออินซูลิน และโรคเกี่ยวกับระบบเผาผลาญ (Bao et al., 2015) ผลการวิจัยในหนูทดลองพบว่า IL-6 ส่งผลต่อสถานะความสมดุลของกลูโคส และความไวต่ออินซูลิน (Stanford et al., 2012)

(14) Glucose transporters 1 (GLUT1) และ Glucose transporters 4 (GLUT4) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ โดย GLUT1 จะพบได้มากในเซลล์ทั่วไป รวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยง ในขณะที่ GLUT4 จะพบได้มากในเซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมัน (Pragallapati & Manyam, 2019)

3.3. การตรวจสอบการเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน สามารถทำได้ด้วยการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์, การสะสมไขมัน, และการแสดงออกของยีน ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน

การตรวจวัด Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Glycerol 3-phosphate ในเซลล์ไขมัน ทำให้เกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะของเซลล์ไขมัน การตรวจวัด GPDH activity โดยอาศัยคุณสมบัติของ GPDH ในการทำปฏิกิริยา Hydrolysis เปลี่ยน NADH (สีเหลือง) ให้เป็น NAD⁺ (สีใส) จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยติดตามปริมาณที่ลดลงของ NADH (Sottile & Seuwen, 2001)

การสะสมไขมันภายในเซลล์ สามารถตรวจวัดได้ด้วยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ Nile red และสีย้อม Oil-red O โดยตรวจวัดจำนวนเซลล์ไขมันต่อพื้นที่ และขนาดของเซลล์ไขมันด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ Nile red โดยอาศัยคุณสมบัติของ Nile red ในการทำปฏิกิริยากับไขมันภายในเซลล์ เมื่อได้รับพลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 450-500 nm จะเกิดการเรืองแสง ทั้งนี้ Nile red สามารถใช้ได้ทั้งในเซลล์ที่ยังมีชีวิตและเซลล์ตาย แต่ข้อจำกัดคือที่กำลังขยายสูงภาพที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของบริเวณที่ถูกย้อมได้ เนื่องจากสีฟลูออเรสเซนต์เสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว (Greenspan et al., 1985; Jaiswal et al., 2000; Majka et al., 2014) ในขณะที่สีย้อม Oil-red O อาศัยหลักการที่สีย้อมสามารถละลายในไขมันได้ดีกว่าในสารละลายสีย้อม คือ Isopropanol ดังนั้นเมื่อย้อมเซลล์จะพบว่าหยดไขมันมีลักษณะเป็นสีแดง เมื่อถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายสูง จะสามารถแยกความแตกต่างของหยดไขมันได้อย่างชัดเจน ข้อจำกัดคือที่กำลังขยายต่ำจะไม่สามารถเห็นรายละเอียดของหยดไขมันได้ และสามารถย้อมได้เฉพาะเซลล์ตายเท่านั้น (Bäckesjö et al., 2006)

การแสดงออกของยีนที่มีบทบาทต่อ Adipogenic differentiation ในระดับ mRNA โดยทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันสีขาว ทั้งในระยะเริ่มต้น เช่น *PPAR γ -2* และ *C/EBP- α* และระยะท้าย เช่น *PPAR γ -2*, *C/EBP- α* , *Adipsin*, *FABP4*, *Adiponectin*, *Leptin*, และ *Leptin-receptor* นอกจากนี้ยังทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันสีน้ำตาล ทั้งในระยะเริ่มต้น คือ *MYF5* และ *PGC-1 α* รวมถึงระยะท้าย คือ *BMP7*, *MYF5*, *PRDM16*, *PGC-1 α* , และ *UCP-1* (Devoto et al., 2000; Gemmis et al., 2006; Qian et al., 2010; Steensberg et al., 2002)

4. โรคที่เกี่ยวข้องกับการขาดความสมดุลกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมัน

ในสภาวะปกติร่างกายจะมีกลไกที่ซับซ้อนในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกหรือเซลล์ไขมัน แต่เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้นจะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น

4.1. โรคอ้วน

โรคอ้วน เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายประการด้วยกัน เช่น การรับประทานอาหารที่มีไขมันหรือน้ำตาลสูง สภาวะทางอารมณ์ ฮอร์โมน หรือพันธุกรรม ทั้งนี้ผู้ที่เป็โรคอ้วนจะพบว่ามีการสะสมไขมันในร่างกายมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณช่องท้องและรอบอวัยวะในช่องท้อง โดย World Health Organization (WHO) ได้ให้คำจำกัดความโรคอ้วนไว้ว่าผู้ที่มีค่าการวัดดัชนีมวลร่างกาย (Body mass index: BMI) มากกว่า 30 โดยค่าดัชนีมวลร่างกายคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักและส่วนสูง โดยใช้สูตร $BMI = \frac{\text{น้ำหนักตัว (kg)}}{\text{ส่วนสูง (m)}^2}$ จากรายงานของ WHO พบว่าในปี 2016 ร้อยละ 13 ของประชากรโลกเป็นโรคอ้วน (โดยแบ่งเป็น ร้อยละ 11 ในเพศชาย และร้อยละ 15 ในเพศหญิง) (Who., 2018a)

จากการศึกษาพบว่าหนูที่เป็นโรคอ้วนจะมีระดับ Leptin ในเลือดสูงกว่าหนูปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อค่า BMI สูงขึ้น จำนวนเซลล์ไขมันในร่างกายจะเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Tchoukalova et al., 2008; Van Harmelen et al., 2003) และยังพบว่าโรคอ้วนมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับโรคกระดูกพรุน โดยพบว่าค่า BMI มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับค่า BMD (Bone Mineral Density: ความหนาแน่นกระดูก) กล่าวคือเมื่อค่า BMI สูงขึ้นจะพบว่าค่า BMD ลดต่ำลง (Kim et al., 2010; Zhao et al., 2007)

โรคอ้วนนอกจากจะส่งผลเสียด้านรูปร่างและบุคลิกภาพ ยังก่อให้เกิดผลเสียทางสุขภาพมากมาย โดยเป็นสาเหตุที่อาจนำไปสู่ โรคเบาหวานชนิดที่ 2, โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน, โรคมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้, และ โรคหลอดเลือดสมอง เป็นต้น (Arnold et al., 2016; Cauchi et al., 2008; Sowers, 2003; Wilson et al., 2002) และนอกจากนี้ยังพบว่าโรคอ้วนเพิ่มความเสี่ยงของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อ COVID-19 อีกด้วย (Dietz & Santos-Burgoa, 2020; Kassir, 2020)

แนวทางในการรักษานอกจากจะต้องปรับเปลี่ยนพฤติกรรม ควบคู่กับการใช้ยาควบคุม น้ำหนัก และผ่าตัด โดยกลไกในการออกฤทธิ์ของยาควบคุมน้ำหนักแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

- (1) ยาที่ออกฤทธิ์ในการลดความอยากอาหาร
- (2) ยาที่ออกฤทธิ์ในการเพิ่มการเผาผลาญพลังงานในร่างกาย
- (3) ยาที่ออกฤทธิ์ลดการดูดซึมสารอาหารของลำไส้

อย่างไรก็ตามเนื่องจากยาควบคุมน้ำหนักส่วนใหญ่ มักจะส่งผลข้างเคียงต่อร่างกาย เช่น Orlistat เป็นยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ลดการดูดซึมสารอาหารของลำไส้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ Gastric และ Pancreatic lipase ผลข้างเคียงคืออุจจาระเป็นมัน ถ่ายเหลว ปวดท้อง เป็นต้น ทั้งนี้ผู้ป่วยบางรายพบอาการขาดวิตามินที่ต้องอาศัยไขมันในการดูดซึมอีกด้วย (Khan et al., 2012; Padwal et al., 2003; Rucker et al., 2007)

4.2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes)

โรคเบาหวาน คือโรคที่ร่างกายมีสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเป็นสาเหตุมาจากความบกพร่องที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนอินซูลิน หรือที่เรียกว่า ภาวะดื้ออินซูลิน โดยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากโรคอ้วนและการขาดการออกกำลังกาย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของไขมันชักนำให้เกิดภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin resistance) ทำให้ตับอ่อนเกิดการ ทำงานบกพร่อง นำไปสู่การเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Holmbäck, 2019) โดยอันตรายที่ถึงชีวิตมักเกิดจากการที่โรคเบาหวานก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น โรคหัวใจ โรคไตวายเรื้อรัง พบว่าจะมีอัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานร่วมด้วย สูงกว่าผู้ไม่เป็นโรคเบาหวาน

จากการรายงานของ WHO ในปี 1980 พบว่าประชากรโลก 108 ล้านคนเป็นโรคเบาหวาน และเพิ่มขึ้นเป็น 422 ล้านคน ในปี 2014 คิดเป็นร้อยละ 8.5 ของประชากรที่มีอายุมากกว่า 18 ปี ทั้งนี้พบว่าในปี 2016 มีผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวาน 1.6 ล้านคน ร้อยละ 2.6 ของประชากรโลกที่คาดว่ามีสาเหตุมาจากโรคเบาหวาน (Bourne et al., 2013; Who., 2018b) นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณร้อยละ 95 ของผู้ป่วยโรคเบาหวานป่วยเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานมักพบว่ามีค่าความหนาแน่นกระดูก หรือ BMD ต่ำกว่าคนปกติ จึงมีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุน และเกิดการแตกหักของกระดูกได้ง่าย (Abdulameer et al., 2012; Leslie et al., 2012; Vestergaard, 2007)

Thiazolidinediones (TZD) เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคเบาหวานปัจจุบัน ซึ่งทำหน้าที่เป็น PPAR γ agonize ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยการเพิ่มขึ้นของ PPAR γ ชักนำให้ Adipogenic markers อื่นๆ แสดงออกเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการสะสมไขมันในเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกที่ส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันอิสระในกระแสเลือดลดลง ส่งผลให้ความต้านทานอินซูลินลดลง แต่จากการศึกษาพบว่าการใช้ TZD ในระยะยาวส่งผลให้เกิดการแตกหักของกระดูก และโรคกระดูกพรุนในผู้ป่วย เนื่องจาก PPAR γ ส่งผลในทางลบต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ จากผลกระทบบดดังกล่าวจึงทำให้การรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในปัจจุบันมุ่งความสนใจไปที่การลดปริมาณกรดไขมันอิสระในเลือดด้วยการปรับความสมดุลของกระบวนการเผาผลาญ โดยการเพิ่มขึ้นของไขมันดีน้ำตาลซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีบทบาทในการเผาผลาญพลังงาน แทนการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อไขมันสีขาว (Dobnig et al., 2006; Gerdhem et al., 2005; Kume et al., 2005; McCarthy et al., 2004; Sanguineti et al., 2008)

4.3. โรคกระดูกพรุน (osteoporosis)

โรคกระดูกพรุน คือโรคที่มีลักษณะความหนาแน่นและมวลของกระดูก (Bone Mineral Density: BMD) ต่ำกว่ามาตรฐาน โครงสร้างกระดูกถูกทำลาย เกิดจากการลดลงของการสะสมแร่ธาตุภายในกระดูก โดยเฉพาะกระดูกข้อมือ กระดูกสันหลัง และกระดูกสะโพก ซึ่งอาจจะเกิดจากกระบวนการสร้างกระดูกลดลง หรือกระบวนการสลายกระดูกเพิ่มขึ้น หรือเกิดจากทั้ง 2 กระบวนการควบคู่กัน ก่อให้เกิดความเปราะบางและเสี่ยงต่อการแตกหักของกระดูก แม้โรคกระดูกพรุนไม่ทำให้เกิดการเสียชีวิตทันที แต่ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตเป็นอย่างมาก เกณฑ์ที่ใช้บ่งบอกถึงภาวะของกระดูก คือ ค่าความหนาแน่นกระดูกเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูกสูงสุดในวัยหนุ่มสาว เรียกค่านี้ว่า T-Score โดยบอกเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD : standard deviation) คนที่มีค่า T-Score อยู่ระหว่าง -1 ถึง -2.5 SD จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มกระดูกบาง และในคนที่มีค่า T-Score ต่ำกว่า -2.5 SD ถูกจัดในกลุ่มกระดูกพรุน

ในปี ค.ศ. 2004 กระทรวงสาธารณสุขและบริการมนุษย์สหรัฐอเมริกา (U.S. Department of Health and Human Services) ได้จำแนกโรคกระดูกพรุนออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะการเกิดดังนี้

1) โรคกระดูกชนิดปฐมภูมิ (Primary osteoporosis) คือโรคกระดูกพรุนที่มีสาเหตุมาจากอายุ หรือลักษณะทางพันธุกรรม เช่น โรคกระดูกพรุนโดยไม่ทราบสาเหตุ (Idiopathic primary osteoporosis) พบในเด็กช่วงอายุ 8-14 ปี, โรคกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือน (Postmenopausal osteoporosis), และ โรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ (Senile osteoporosis) เป็นต้น

2) โรคกระดูกชนิดทุติยภูมิ (Secondary osteoporosis) คือ โรคกระดูกพรุนที่มีสาเหตุมาจากโรคชนิดอื่น เช่น โรคกระดูกพรุนในผู้ป่วยฮอร์โมนเพศต่ำ โรคกระดูกพรุนในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับต่อมไทรอยด์ และโรคกระดูกพรุนที่เกิดจากการลุกลามของมะเร็ง (U.S. Department of Health and Human Services, 2004) นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจาก โรคอ้วนและโรคเบาหวานอีกด้วย (Kim et al., 2010; Vestergaard, 2007; Zhao et al., 2007)

โดยโรคกระดูกพรุนมีสาเหตุมาจากการที่ร่างกายสูญเสียความสมดุลในการสร้างและสลายกระดูก เนื่องจากเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันมีเซลล์ต้นกำเนิดชนิดเดียวกัน คือเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ดังนั้นในกระบวนการสร้างกระดูกหากมีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันมากเกินไป จึงทำให้เกิดการสร้างกระดูกลดลง และก่อให้เกิดการแตกหักของกระดูกมากขึ้น (Abdallah, 2017; Lee et al., 2014)

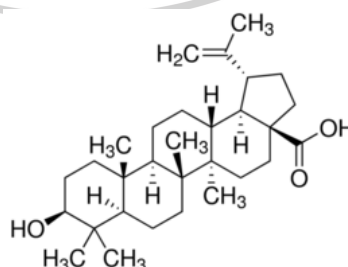
ยาที่ใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุนในปัจจุบัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการสลายกระดูก และเพิ่มกระบวนการสร้างกระดูก ตัวอย่างของยาที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ยาในกลุ่ม Bisphosphonates มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสลายกระดูก โดยการขัดขวางการเจริญพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast) และกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ Apoptosis นิยมใช้รักษาโรคกระดูกพรุนในหญิงวัยหลังหมดประจำเดือน แต่ในระยะยาวพบว่าก่อให้เกิดการแตกหักอย่างรุนแรงของกระดูก (Kennel & Drake, 2009) นอกจากนี้ยังมี Calcitonin ซึ่งเป็นฮอร์โมนเปปไทด์ที่ถูกผลิตขึ้นจากต่อมไทรอยด์ ทำหน้าที่ในการควบคุมปริมาณแคลเซียมในเลือดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ osteoclast ลดการสลายกระดูกได้ Calcitonin ที่ใช้มักมาจากปลาแซลมอน เนื่องจากออกฤทธิ์แรงกว่า Calcitonin ในมนุษย์ แต่เนื่องจากเป็นโพลีเปปไทด์จึงไม่สามารถให้ทางปากได้ ดังนั้นจึงให้ในลักษณะของการฉีดพ่นทางจมูก อย่างไรก็ตามจากการวิจัยพบว่า Calcitonin ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก (Overman et al., 2013; Sun et al., 2014) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการได้รับฮอร์โมนเปปไทด์แปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย และยาอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับคามนิยมเช่นกัน คือ Strontium ranelate เป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนที่มีคุณสมบัติในการลด

การสลายของกระดูก แต่เมื่อใช้เป็นระยะเวลาานานมักก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดดำ (Osborne et al., 2010)

สรุปได้ว่าเมื่อร่างกายมีจำนวนเซลล์ไขมันเพิ่มมากขึ้น จะมีค่า BMI สูงขึ้น ในขณะที่เมื่อค่า BMI สูงจะพบว่าค่า BMD ลดต่ำลง กล่าวคือมีมวลกระดูกลดลง (Kim et al., 2010; Zhao et al., 2007) สอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์ทดลอง ที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของยีน *PPAR γ -2* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อไขมัน ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของ Wnt/ β -catenin pathway ซึ่งเป็น Pathway ที่ควบคุมการเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Akune et al., 2004; Kawaguchi et al., 2005) ในภาวะปกติของร่างกายจะสามารถรักษาสมดุลระหว่างกระบวนการการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์ไขมัน ได้อย่างดี แต่อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายขาดความสมดุลระหว่างกระบวนการทั้งสองจะนำมาซึ่งสาเหตุของการเกิดโรค เช่น ในสภาวะที่ร่างกายได้รับอาหารที่มีไขมันสูง (Hariri & Thibault, 2010) หรือสภาวะที่ร่างกายขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน (Lizcano & Guzmán, 2014; Mauvais-Jarvis, 2011) จากการศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยที่เป็นโรคกระดูกพรุน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ไขมันในไขกระดูก (Justesen et al., 2001) ในกรณีนี้นักวิจัยจึงทำการศึกษาค้นคว้าของกรดเบทูลินิกซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ที่จะสามารถรักษาความสมดุลดังกล่าว โดยไม่ส่งผลข้างเคียงต่อร่างกายของมนุษย์

5. กรดเบทูลินิก (betulinic acid)

กรดเบทูลินิก (3 β , hydroxy-lup-20 (29)-en-28-oic acid : BetA) เป็นสารสกัดจากธรรมชาติในกลุ่ม Pentacyclic triterpenoid จัดเป็นสารชีวสังเคราะห์ Secondary metabolites ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากการคุกคามของเชื้อโรค โดยมีโครงสร้างดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Betulinic acid

(National Center for Biotechnology Information)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329773146> (Accessed July 24, 2017)

กรดเบทูลินิกสามารถพบได้ทั่วไปในพืชผักต่างๆ พบมากในพืชตระกูล *Sambucus* sp. เช่น *Sambucus williamsii* Hance (Elderberry), *Sambucus nigra* Linn, *Sambucus formosana* Nakai เป็นต้น โดยพืชสกุลนี้สามารถพบกระจายอยู่ทั่วไปในยุโรป เอเชียและแอฟริกาเหนือ

จากงานวิจัยของ Fujioka และคณะ (1994) พบว่ากรดเบทูลินิกและอนุพันธ์ มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ HIV สอดคล้องกับการศึกษาของ Evers และคณะ (1996) ที่ชี้ให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกสามารถใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อ HIV-1 และ HIV-2 ในระยะแรกและการป้องกันเชื้อไวรัส HIV ทั้งนี้ Steele และคณะ (1999) พบว่า กรดเบทูลินิกสามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ในระดับปานกลางถึงดี ต่อมา Woldemichael และคณะ (2003) พบว่ากรดเบทูลินิกมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า กรดเบทูลินิกสามารถฆ่าเซลล์มะเร็ง แต่เป็นพิษน้อยในเซลล์ปกติของมนุษย์ ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเป็นพิษของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ของมนุษย์ (72 ชั่วโมง)

Cell Type	IC ₅₀ *		อ้างอิง
	(µg/ml)	เทียบเท่า (µM)	
HDFC (เซลล์ผิวหนังของมนุษย์)	10.2	22.3	(Zuco et al., 2002)
PBL (เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสะเลือด)	>50	> 100	(Zuco et al., 2002)
HL-60 (มะเร็งเม็ดเลือดขาว)	2.60	5.69	(Faujan et al., 2010)
A549 (มะเร็งปอด)	8.4	18.39	(Ahmad et al., 2010)
CAVO3 (มะเร็งรังไข่)	9.4	20.58	(Ahmad et al., 2010)

* หมายถึง: IC₅₀ = The half maximal inhibitory concentration

ในประเทศจีนและเกาหลีใต้ พืชตระกูล *Sambucus* sp. มักถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาอาการปวดและโรคทางกระดูก จากงานวิจัยของ Xie และคณะ (2005) พบว่าสารสกัดจากต้น *Sambucus williamsii* Hance (Elderberry) ซึ่งมีกรดเบทูลินิกเป็นองค์ประกอบสำคัญ สามารถยับยั้งการสลายกระดูกในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่ได้

การศึกษาของ Lo และคณะ (2010) ได้ทำการทดลองในเซลล์ MC3T3-E1 pre-osteoblasts ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากหนู โดยทำการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่ากรดเบทูลินิกที่ความเข้มข้น 5 - 20 µM ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ และเมื่อ

ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Osteogenic marker) และการสะสมแคลเซียมของเซลล์ พบว่ากรดเบทูลินิก สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Osteogenic marker และการสะสมแคลเซียมของเซลล์ แสดงให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกมีฤทธิ์ในการส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สร้างกระดูก และส่งเสริมการสร้างกระดูก สอดคล้องกับการทดลองของ Choi และคณะ (2016) ที่ทำการศึกษาในเซลล์ชนิดเดียวกันและในหนูทดลอง พบว่ากรดเบทูลินิกที่ความเข้มข้น 5 - 15 μM ชักนำให้เซลล์ต้นกำเนิดกระดูก เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยพบการแสดงออกของยีน Osteogenic marker และการสะสมแคลเซียมที่มากขึ้น นอกจากนี้กรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 μM ยังสามารถเสริมฤทธิ์ BMP-2 ในการชักนำให้เกิดการสะสมแคลเซียมของเซลล์ MC3T3-E1 pre-osteoblasts และเสริมฤทธิ์ BMP-2 ให้เกิดกระดูกนอกบริเวณกระดูกปกติ (ectopic bone) ในหนูทดลอง

Kim และ Go (2017) ได้ทำการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ 3T3-L1 pre-adipocytes ซึ่งเป็นเซลล์ไขมันจากหนู พบว่าที่ความเข้มข้น 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ประมาณ 2.2 - 21.9 μM) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทำการศึกษาต่อพบว่าที่ความเข้มข้น 5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ประมาณ 10.9 - 21.9 μM) กรดเบทูลินิกสามารถลดการสะสมไขมัน ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกรดเบทูลินิกที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ประมาณ 21.9 μM) สามารถลดการสังเคราะห์กรดไขมันของเซลล์ 3T3-L1 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Brusotti และคณะ (2017) ที่ทำการศึกษาในเซลล์ชนิดเดียวกัน พบว่ากรดเบทูลินิกสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน และส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ MC3T3-E1

ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำเอากรดเบทูลินิก มาประยุกต์ใช้ในการป้องกัน รวมไปถึงการรักษาโรค ที่เกิดจากความผิดปกติของความสมดุลระหว่างการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากเซลล์ร่างกายของมนุษย์ และหนูทดลอง นั้นมีความแตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกของมนุษย์ โดยการทดสอบกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์ การวัดการพัฒนาไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์เนื้อเยื่อไขมัน ด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ การตรวจสอบการ

สะสมแคลเซียมและไขมันของเซลล์ รวมถึงวัดการแสดงออกของยีน Osteogenic และ Adipogenic marker ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time PCR และการหลั่ง Adipokine เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน

6. การทดสอบกิจกรรมเมตาบอลิกของเซลล์

การทดสอบกิจกรรมเมตาบอลิกของเซลล์ เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในช่วงเวลาหนึ่งๆ โดยเทคนิคที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันคือ MTT assay โดยอาศัยหลักการคือ เซลล์ที่มีชีวิต จะมีกิจกรรมเมตาบอลิกซึ่งจะสามารถรีดิวซ์ MTT (สีเหลือง) ให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ Formazan (สีม่วง) แต่เนื่องจากสารที่ได้อยู่ในรูปของผลึก จึงจำเป็นต้องเติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อละลายผลึก จากนั้นจึงจะสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นแสง 570 nm (Riss et al., 2016)

แต่เนื่องจาก DMSO เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้เซลล์ที่ผ่านการทำ MTT assay ตาย และไม่สามารถนำมาศึกษาต่อได้ ทำให้เทคนิคดังกล่าวไม่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งต้องอาศัยความต่อเนื่องของชุดทดลอง ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเทคนิค Alamar blue assay ขึ้นมาโดยอาศัยหลักการคล้ายๆกัน คือ เซลล์ที่มีชีวิตจะรีดิวซ์ Resazurin (สีน้ำเงิน) ให้เปลี่ยนเป็น Resorufin (สีม่วงหรือสีชมพู) โดยสามารถดูดสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 570 และ 600 nm ได้โดยตรงจากนั้นสามารถคำนวณออกมาเป็นร้อยละของจำนวนของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Riss et al., 2016) อีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับในวงกว้างว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง และถูกใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางชีวการแพทย์ (Rampersad, 2012)

7. เทคนิค Real-time PCR

Real-time PCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ซึ่งจะสามารถบอกปริมาณ mRNA ของยีนที่ต้องการทราบ โดยสกัด mRNA จากเซลล์ที่ต้องการศึกษา แล้วนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA เนื่องจาก cDNA จะมีความเสถียรและสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า จากนั้นใช้ primer ที่ถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ต้องการศึกษา เมื่อนำมาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Real-time PCR โดยอาศัยหลักการในการติดตามการเกิดปฏิกิริยา PCR ด้วยการตรวจวัดสารเรืองแสงที่จะเข้าทำปฏิกิริยาเกิดการเรืองแสง เมื่อมีปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้น (Gemmis et al., 2006) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน

osteogenic และ adipogenic marker ที่ช่วงเวลาต่างๆ ได้ทำการคัดเลือกยีนที่ต้องการศึกษา โดยมีรายละเอียดของ Primer ของยีนที่ต้องการศึกษาดังที่แสดงในตารางที่ 2



ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลคุณสมบัติของ primer sequence ของยีน osteogenic และ adipogenic differentiation marker ที่ใช้ในการศึกษา

Gene	Primer Sequence (forward/reverse)	Length	Tm - Primer	GC	Self-complementarity	Self-3' complementarity	Target template	Product length
Housekeeping primer sequences								
GAPDH (Sun et al., 2006)	5'- GTTCCAATATGATTCCACCC-3'	20	53.69	45	4	0	NM_001289746.1 Homo sapiens	487
	5'- AGGGATGATGTTCTGGAGAG 3'	20	53.02	50	4	2	glyceraldehyde3phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 4, mRNA	
Osteogenic differentiate marker primer sequences								
ALP (Sun et al., 2006)	5'-CCCAAGGCTTCTTCTTG-3'	18	53.17	50	5	1	NM_000478.5 Homo sapiens alkaline phosphatase, liver/ bone/kidney (ALPL), transcript variant 1, mRNA	357
	5'-CTGGTAGTTGTTGTGAGC-3'	18	52.97	50	2	2		
β -catenin (Shi et al., 2017)	5'-GATTTGATGGAGTTGGACATGG-3'	22	57.36	45.45	4	2	NM_001330729.1 Homo sapiens catenin beta 1 (CTNNB1), transcript variant 4, mRNA	218
	5'-TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG-3'	22	57.67	45.45	7	3		
BMP2 (Kochanowska et al., 2007)	5'-ATGGATTCGTGGTGAAGTG-3'	20	57.89	50	3	0	NM_001200.3 Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA	349
	5'-GTGGAGTTCAGATGATCAGC-3'	20	55.94	50	6	6		

Gene	Primer Sequence (forward/reverse)	Length	Tm - Primer	GC	Self-complementarity	Self-3' complementarity	Target template	Product length
RUNX2 (CBFA 1) (Potier et al., 2007)	5'-GTACAGCTTTAAGGATCCCTCAATTC-3'	27	60.2	40.74	7	3	NM_001278478.1 Homo sapiens runt related transcription factor 2 (RUNX2), transcript variant 4, mRNA	86
	5'-TTGCTAATGCTTCGTGTTTCCA-3'	22	59.12	40.91	2	0		
WNT3A (Chen et al., 2016)	5'-ACTACGTGGAGATCATGCC-3'	20	59.25	55	4	3	NM_033131.3 Homo sapiens Wnt family member 3A (WNT3A), mRNA	210
	5'-ATGAGCGTGTCACATGCAAG-3'	20	59.13	50	5	2		
OC (Tsoo et al., 2017)	5'-GGCCTACCTGTATCAATGG-3'	20	58.49	55	4	2	NM_199173.5 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA	106
	5'-TCAGCCAACTCGTACAGTC-3'	20	59.57	55	5	3		
OPN (Sun et al., 2006)	5'-CATGAGAAATTCAGTGAATTTGCT-3'	23	58.26	39.13	4	3	NM_000582.2 Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (SPP1), transcript variant 2, mRNA	186
	5'-CTTGAAGGGTCTGTGGG-3'	19	59.62	63.16	4	0		
Adipogenic differentiate marker primer sequences								
Adipsin (Gemmis et al., 2006)	5'-CCAAGCCCTGACGAGT-3'	19	62.91	63.16	6	5	NM_001317335.1 Homo sapiens complement factor D (CFD), transcript variant 2, mRNA	101
	5'-GGCCTTCTCCACAGCTGT-3'	19	61.95	63.16	8	8		

Gene	Primer Sequence (forward/reverse)	Length	Tm - Primer	GC	Self-complementarity	Self-3' complementarity	Target template	Product length
<i>Adiponectin</i> (El-Sayyad et al., 2016)	5'-TCCTGCCAGTAACAGGGAAG-3'	20	59.02	55	5	5	NM_015999.6 Homo sapiens adiponectin receptor 1 (ADIPOR1), transcript variant 1, mRNA	89
	5'-GGTTGGGGATTACCCGTTTG-3'	20	59.83	55	3	0		
<i>BMP7</i> (Aoki et al., 2011)	5'-GGTCATGAGCTTCGTCAACC-3'	20	58.92	55	6	2	NM_001719.3 Homo sapiens bone morphogenetic protein 7 (BMP7), mRNA	236
	5'-GCAGGAAGAGATCCGATTCC-3'	20	57.84	55	5	4		
<i>C/EBP-α</i> (Qian et al., 2010)	5'-AAGAAGTCGGTGGACAAGAACAG-3'	23	60.74	47.83	3	1	NM_004364.4 Homo sapiens CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA), transcript variant 1, mRNA	70
	5'-TGCGCACCGCGATGT-3'	15	59.66	66.67	6	4		
<i>FABP4 (cP2)</i> (Qian et al., 2010)	5'-GCTTTGCCACCAGGAAGTG-3'	20	59.97	55	4	0	NM_001442.2 Homo sapiens fatty acid binding protein 4 (FABP4), mRNA	281
	5'-ATGGACGCATTCCACCACCA-3'	20	62.14	55	4	0		
<i>GLUT1</i> (Wood et al., 2007)	5'-ATACTCATGACCATCGCGGTAG-3'	22	60.1	50	6	4	NM_006516.4 Homo sapiens solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1), mRNA	93
	5'-AAAGAAGGCCACAAAGCCAAAAG-3'	22	60.16	45.45	4	0		
<i>GLUT4</i> (Hankamolsiri et al., 2016)	5'-CTTCGAGACAGCAGGGGTAG-3'	20	59.54	60	4	0	NM_001042.3 Homo sapiens solute carrier family 2 member 4 (SLC2A4), mRNA	168
	5'-ACAGTCATCAGGATGGCACA-3'	20	59.01	50	6	2		

Gene	Primer Sequence (forward/reverse)	Length	Tm - Primer	GC	Self-complementarity	Self-3' complementarity	Target template	Product length
<i>IL-6</i> (Steensberg et al., 2002)	5'-GGTACATCCTCGACGGGATCT-3'	21	61.69	57.14	4	4	NM_000600.5 Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA	81
	5'-GTGCCTCTTTTGCTGCTTTCAC-3'	21	60.6	52.38	3	0		
<i>LEP-R</i> (Devoto et al., 2000)	5'-GCTATTTTGGGAAGATGT -3'	18	49.37	38.89	3	2	NM_002303.5 Homo sapiens leptin receptor (LEPR), transcript variant 1, mRNA	499
	5'-TGCCTGGGCCTCTATCTC-3'	18	57.7	61.11	4	0		
Leptin (Lecke et al., 2011)	5'-TCCCCTTTGACCCATCTC-3'	19	57.68	57.89	2	0	NM_000230.3 Homo sapiens leptin (LEP), mRNA	110
	5'-GGGAACCTTGTCTGGTCAT -3'	20	57.41	50	5	2		
<i>MYF5</i> (Larsen et al., 2006)	5'-TTCTACGACGGCTCCTGCATA-3'	21	61.02	52.38	4	2	NM_005593.3 Homo sapiens myogenic factor 5 (MYF5), mRNA	64
	5'-CCACTCGGCACAAAAC-3'	18	60.97	61.11	4	1		
<i>PPARγ-2</i> (Gemmis et al., 2006)	5'- CAGTGTGAATTACAGCAAACC-3'	21	55.71	42.86	6	1	NM_015869.4 Homo sapiens peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG), transcript variant 2, mRNA	101
	5'- ACAGTGTATCAGTGAAGGAAT-3'	21	54.27	38.1	5	2		

Gene	Primer Sequence (forward/reverse)	Length	Tm - Primer	GC	Self-complementarity	Self-3' complementarity	Target template	Product length
<i>PGC-1α</i> (Gemmis et al., 2006)	5'- GTTCCCGATCACCATATTCCA-3'	21	57.51	47.62	4	0	NM_001330753.1 Homo sapiens PPAR γ coactivator 1 alpha (PPARGC1A), transcript variant 4, mRNA	101
	5'- GCCGGTCTCTGTAGTGGCTTTGA -3'	21	62.63	57.14	2	1		
<i>PRDM16</i> (Petrovic et al., 2010)	5'-CAGCAGGGTGAAGCCATTC-3'	19	59.5	57.89	5	3	NM_199454.3 Homo sapiens PR/SET domain 16 (PRDM16), transcript variant 2, mRNA	87
	5'-GCCGTGCATCCGCTTGTG-3'	17	59.86	64.71	4	0		
<i>UCP-1</i> (Gemmis et al., 2006)	5'- CTGGAATAGCGCGGTGCTT-3'	19	60.82	57.89	3	1	NM_021833.4 Homo sapiens uncoupling protein 1 (UCP1), mRNA	101
	5'- AATAACACTGGACGTCGGGC-3'	20	60.39	55	6	2		

หมายเหตุ : L = Length, Tm = Melting temperature, A = Self-complementarity, B = Self-3' complementarity และ PL= Product length

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ขนาด 100, 250, 500 mL
2. จานหลุม 96 well plate (Nunclon, 167008)
3. จานหลุม 48 well plate (NEST, 748001)
4. จานหลุม 24 well plate (NEST, 040813)
5. จานหลุม 6 well plate (TPP)
6. ปิเปตพลาสติกปราศจากเชื้อ (Serological pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร (Thermo Scientific Nunc, 170355N)
7. ปิเปตพลาสติกปราศจากเชื้อ (Serological pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร (Thermo Scientific Nunc, 170356N)
8. ปิเปตพลาสติกปราศจากเชื้อ (Serological pipette) ขนาด 25 มิลลิลิตร (NEST, 328001)
9. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร (Tarson, TSP-202090)
10. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
11. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Flasks T-75 cm²) (Nunclon, 085391)
12. ไมโครปิเปตทิป (Pipette tips) ขนาด p10, p20, p100, p200, p1000 และ p5000
13. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด p10, p20, p100, p200, p1000 และ p5000
14. กระบอกตวง
15. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
16. กระดาษกรอง (Membrane filter) ขนาด 0.22 μ M (Whatman™, 7001-004)
17. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Micro Centrifuge tube)
18. ที่กรองอาหาร (Sterilization filter)

เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (บริษัท OLYMPUS, รุ่น CKX53, สหรัฐอเมริกา)
2. กล้องจุลทรรศน์คอนทราสต์แบบคว่ำ (บริษัท Leica, รุ่น DMil, เยอรมัน)
3. เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (microplate reader) (บริษัท PerkinElmer, รุ่น VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader, สหรัฐอเมริกา)
4. เครื่อง cDNA Thermal cycler (บริษัท BioRad, รุ่น T 100, สหรัฐอเมริกา)
5. เครื่อง Real-time PCR (บริษัท Applied Biosystem, รุ่น 7500 Real-time PCR, สหรัฐอเมริกา)
6. เครื่องวัด Luminex (บริษัท Merck รุ่น Luminex 200™ System, เยอรมัน)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety carbinet class II)
8. ตู้บ่มเซลล์ (Incubator) (บริษัท SHELLAB, รุ่น SC06AD-2, สหรัฐอเมริกา)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (บริษัท DAIHAN Scientific, รุ่น WB-11, เกาหลีใต้)
10. ถังแช่แข็งไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen freezer) (บริษัท ANITECH, รุ่น Cryo Master750, ไทย)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (บริษัท Hettich universal, รุ่น D700, เยอรมัน)
12. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (บริษัท Bio-active, รุ่น A066974, ไทย)

สารเคมี

1. กรดเบทูลินิก (Sigma-Aldrich, B8936)
2. MEM alpha Modification, with L-Glutamine (Hyclone, SH30265.02)
3. Oli red O (Sigma-Aldrich, 1320-06-5)
4. Phosphate buffered saline (PBS) (Hyclone)
5. AlamarBlue cell viability assay Kit (Invitrogen™)
6. Pen/Strep (Mediatech/Cellgro, 30-002-CI)
7. L-glutamine (Corning®, SH30034.03)
8. Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, 50-81-7)
9. Dexamethasone (Sigma-Aldrich, 50-02-2)
10. β -Glycerolphosphate (Sigma-Aldrich, 154804-51-0)
11. Trypsin-EDTA (Gibco, 25300-062)
12. h-Insulin (Sigma-Aldrich, 12584-58-6)
13. Indomethacin (Sigma-Aldrich, 53-86-1)
14. Isobutylmethythine (IBMX) (Sigma-Aldrich, 28822-58-4)
15. Phosphatase Substrate (Sigma-Aldrich, 333338-18-4)
16. Bicinchoninic acid disodium salt hydrate (Sigma-Aldrich, 979-88-4)
17. Dihydroxyacetone Phosphate Lithium (Sigma-Aldrich, 102783-56-2)
18. Nile Red (Sigma-aldrich, 19123)
19. FavorPrep Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen, FATRK001)
20. HyperScript™ RT master mix with oligo dt (GeneAll, 601-703)
21. iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, 172-5122)
22. MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel kit (Merck, HADCYMAG-61K-03)
23. Alizarin red S (Gurr)
24. Triton-X 100 (amresco)
25. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Fluka)
26. $ZnCl_2$ (Fluka)

เซลล์เพาะเลี้ยง

UE7T-13 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์จากไขกระดูก ที่ถูกเติมยีน hTERT และ E7 ทำให้เซลล์มีวงรอบในการแบ่งตัวไม่จำกัด ได้รับมาจาก Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB Cell Bank, JCRB1154, Lot #07072007, P41) มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ doubling time ประมาณ 1.5 วัน มีคุณสมบัติเป็นเซลล์อ่อนที่ยังไม่มีหน้าที่เจาะจงสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆได้ (Abdallah et al., 2006; Mori et al., 2005)

อาหารเลี้ยงเซลล์

การศึกษาในสถานะที่เซลล์เจริญ เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหาร Complete growth medium (CGM) (10% FBS, 100 units/ml Penicilin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamine) สถานะที่เซลล์ถูกชักนำให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหาร Osteogenic differentiation medium (ODM) (10% FBS, 100 units/ml Penicilin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamine, 50 µM, Ascorbic acid, และ 5 mM β -Glycerophosphate) และในสถานะที่เซลล์ถูกชักนำให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหาร Adipogenic differentiation medium (ADM) (10% FBS, 100 units/ml Penicilin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 µM Dexamethasone, 10 µg/ml h-Insulin, 100 µM Indomethacin, และ 500 µM Isobutymethyxanthine)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาหาค่าความเข้มข้นของกรดเบทูลินิกที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ ได้ร้อยละ 50 (50% Inhibitory Concentration : IC50) ด้วยวิธี alamar blue assay

เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ UE7T-13 ด้วยเทคนิค Alamar blue assay ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวัดอัตราการรอดชีวิตและการเพิ่มขึ้นของเซลล์ โดยหลักการคือ เซลล์ที่มีชีวิตจะรีดิวซ์ Resazurin (สีน้ำเงิน) ให้เปลี่ยนเป็น Resorufin (สีม่วงหรือสีชมพู) เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงจะสามารถคำนวณหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ ประยุกต์มาจากงานวิจัยของ Sun และคณะ (2006) มีวิธีโดยสังเขปดังนี้ เลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากมนุษย์ (hMSC) จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ในตู้เลี้ยงเซลล์บรรยากาศ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C ในอาหาร Complete growth medium (CGM) จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่จานหลุม เปลี่ยนเป็นอาหารที่ใช้ในการทดสอบ คือ CGM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, และ 50 µM เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง แล้วเติมอาหาร CGM+10% alamarblue 100 µl/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มีด 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายแต่ละหลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 570 และ 600 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณตามสูตรด้านล่าง โดยการเปรียบเทียบ % Reduction ของกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC50 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

$$\% \text{ reduction} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(N_1 \times P_2) - (N_2 \times P_1)} \times 100$$

O₁ = Molar extinction coefficient (E) of oxidized alamarBlue® (Blue) ที่ความยาวคลื่น 570 nm (80586)

O₂ = E of oxidized alamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 600 nm (117216)

N₁ = E ของ reduced alamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 570 nm (155677)

N₂ = E ของ reduced alamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 600 nm (14652)

A₁ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม test wells ที่ความยาวคลื่น 570 nm

A₂ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม test wells ที่ความยาวคลื่น 600 nm

P₁ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม blank (positive control well) ที่ความยาวคลื่น 570 nm

P₂ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม blank (positive control well) ที่ความยาวคลื่น 600 nm

2. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ จากไขกระดูกมนุษย์ด้วยวิธี Alamar blue assay

Alamar blue assay นอกจากสามารถใช้ในการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แล้วยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษากิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ได้อีกด้วย โดยทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 1 โดยทำการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเจริญของเซลล์ที่เวลานานขึ้นเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM บ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุมบรรยากาศ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งเซลล์มีประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่หลุม จากนั้นเติมอาหาร CGM, ODM, และ ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM เมื่อครบ 3 วัน ดูอาหารในหลุมออก ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นเติม 10% Alamar blue ในอาหาร CGM 100 μl /หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายแต่ละหลุมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 570 และ 600 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (BIO-RAD) ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเติมอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่มีกรดเบทูลินิกที่ความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงต่อจนครบเวลา 3, 7 และ 10 วัน แล้วนำมาวัดด้วยวิธี Alamar blue assay อีกครั้ง คำนวณหากิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ โดยการเปรียบเทียบ % Reduced ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม นำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณตามสูตร (Sun et al., 2006)

3. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ ด้วยการวัดปริมาณเอนไซม์ Alkaline phosphatase เทคนิค Alkaline phosphatase activity

ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสะสมแร่ธาตุในกระดูก และเป็น Early marker ของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Golub & Boesze-Battaglia, 2007) โดยเอนไซม์ ALP จะทำปฏิกิริยากับสาร p-Nitrophenyl phosphate (pNPP) (ไม่มีสี) จากนั้น pNPP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น p-Nitrophenol (สีเหลือง) และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm แบบต่อเนื่อง จะสามารถนำมาใช้คำนวณหาปริมาณของ ALP โดยมีวิธีการอย่างง่ายดังนี้ เลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ใน Osteogenic differentiation medium ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ที่ อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ ในจานหลุม 96-well plates เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร ODM ที่มี 10% FBS, 100 units/ml Penicilin,

100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-glutamine, 2 mM L-glutamine, 50 µM Ascorbic acid, และ 5 mM β-Glycerophosphate เป็นเวลา 7 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นเติม lysis buffer (ภาคผนวก) 100 µl นำ plate ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C ทำให้ละลายแล้วนำไปแช่แข็ง 3 รอบ แล้ววาง plate ที่อุณหภูมิห้อง เติม Working solution (1 mg/ml pNPP ใน 1 M Diethanalamine buffer) หลุมละ 100 µl นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วย เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 nm ทุกๆ 5 นาที จนครบ 30 นาที บันทึกค่า การดูดกลืนแสง จากนั้นจึงนำมาคำนวณดังสูตรด้านล่าง (Montazerolghaem et al., 2016) แล้วทำ การปรับค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีนที่วัดด้วยเทคนิค Bicinchoninic acid assay

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{(\Delta A_s - \Delta A_o) \times V_a(\text{ml}) \times df}{18.2 \times V_s(\text{ml})} = \Delta A \times 3.30 \times df$$

$$\text{Unit/mg protein} = \frac{\text{Unit/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

A_o = A_s ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

V_a = ปริมาณสารทั้งหมด (ml)

V_s = ปริมาณสารตัวอย่าง (ml)

18.2 = Millimolar extinction coefficient of pNPP under the assay conditions ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

df = Dilution factor

4. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น เซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ ด้วยการวัด ปริมาณแคลเซียมด้วยเทคนิค Calcium colorimetric assay

Calcium colorimetric assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณการสะสมแคลเซียม ของเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยอาศัย คุณสมบัติของสาร o-cresolphthalein ที่สามารถจับกับแคลเซียมได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 570 nm จะสามารถคำนวณหาปริมาณ แคลเซียมได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟแคลเซียมมาตรฐาน

โดยประยุกต์มาจากงานของ Tu และคณะ (2014) ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ hMSC จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหาร ODM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 ในภาชนะ 24-well plates เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร ODM และใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร CGM เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ เมื่อครบ 14 วัน นำมาทดสอบโดยดูดอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย DPBS 500 $\mu\text{l/well}$ 2 รอบ จากนั้นเติม 0.1 M HCl 250 $\mu\text{l/well}$ แล้วดูดสารละลายใส่ Microfuge tube เติม 0.1 M HCl อีก 250 μl ลงใน well เพื่อล้างเซลล์ที่เหลือ ดูดสารละลายใส่ใน Microfuge tube เติม จากนั้นสกัดแคลเซียมโดยเขย่าหลอด ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 500 g 2 นาที ดูดสารละลาย ด้านบน 10 μl ใส่ลงใน 96-well plates เติม Chromogenic reagent 190 μl นำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm เพื่อวัดปริมาณแคลเซียมเปรียบเทียบกับกราฟแคลเซียม มาตรฐาน

5. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในการชักนำให้เกิดการสะสมแคลเซียมของเซลล์ต้นกำเนิด ชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ โดยการย้อมด้วยสี Alizarin red

การศึกษากการสะสมแคลเซียมโดยการย้อมด้วยสี Alizarin red เป็นการศึกษาการสะสม แคลเซียมเชิงคุณภาพ โดยมีหลักการดังนี้ คือ Alizarin red เป็นสารที่สามารถจับกับแคลเซียมได้เป็น Alizarin red S-calcium complex เห็นเป็นผลึกสีแดงเมื่อมองใต้กล้อง สามารถทำการศึกษาได้โดย เลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ใน ODM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 ในภาชนะ 48-well plates เปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุมที่เลี้ยงใน อาหาร ODM และใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร CGM เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน เมื่อครบ 14 วัน ตรึงเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde บ่มทิ้งไว้ 20 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย 2% alizarin red บ่มทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้าง เซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-5 รอบ หรือจนกว่าสีย้อมส่วนเกินจะหมด จากนั้นบันทึกภาพเซลล์ที่ได้ใต้กล้องจุลทรรศน์ (Gregory et al., 2004)

6. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ด้วยเทคนิค glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity

Glycerol 3-phosphate dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสะสมไขมันภายในเซลล์ จึงนิยมใช้เป็น Early marker ของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน ในการศึกษานี้จะทำการศึกษหาปริมาณการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิกเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อาศัยหลักการคือเอนไซม์ GPDH จะเปลี่ยน Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) ให้เป็น sn-Glycerol 3-phosphate ซึ่งในระหว่างนั้นจะเกิดการรีดิวซ์ NADH ให้เปลี่ยนเป็น NAD⁺ เมื่อนำมาวัดค่าคลื่นแสง ซึ่งเป็นการติดตามปริมาณของ NADH คงเหลือในสารละลาย จะสามารถนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ GPDH ดังสูตรด้านล่าง มีวิธีโดยสังเขปดังนี้ เลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ในอาหาร ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ ในจานหลุม 96-well plates เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร ADM เก็บผลที่เวลา 7 วัน ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นเติมสารละลายที่ทำให้เซลล์แตก (Homogenization Solution) ในขณะที่สารละลายอุณหภูมิ 4°C 100 μl นำไปเก็บที่ -20°C จากนั้นแล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย 3 รอบ ก่อนการวัดค่าตั้ง plate ที่อุณหภูมิห้องให้ละลาย แล้วเติมสารละลายที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่มี 334 μM NADH (enzyme reaction) 90 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C 10 นาที จากนั้นเติม 4 mM DHAP 10 μl เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่นแสง 340 nm ด้วย microplate reader ทุกๆ 5 นาที จนกระทั่งครบ 30 นาที บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (Sottile & Seuwen, 2001) เปรียบเทียบค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Bicinchoninic acid assay

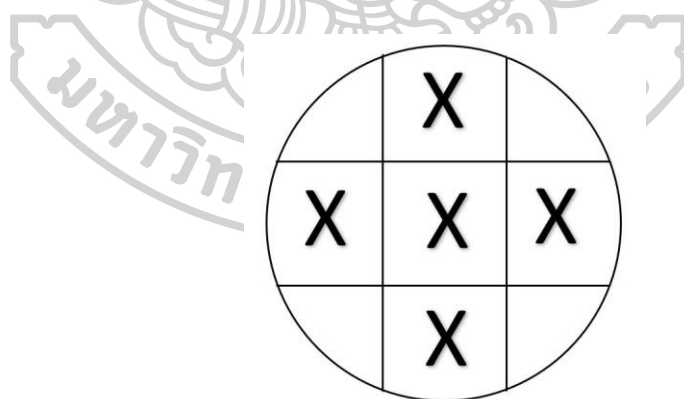
การคำนวณ

$$GPDH (u/ml) = \frac{\Delta A_{340} / \text{min} \times 100 \mu\text{l}}{6.22 \times 10 \mu\text{l}} \times \text{sample dilution}$$

$$\text{Unit/mg protein} = \frac{\text{Unit/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

7. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ ด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ Nile red

Nile red เป็นสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ ที่นิยมใช้ในการย้อมไขมัน ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือสามารถย้อมเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ ในการศึกษาด้วยการย้อมด้วยสี Nile red เป็นการศึกษาเพื่อตรวจสอบจำนวนและขนาดของไขมัน โดยใช้โปรแกรม ImageJ มาใช้ในการวิเคราะห์ ในการทดสอบจะทำการเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหาร ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM โดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 ใน 48-well plates เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร ADM เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน เมื่อครบเวลา 21 วันล้างด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นเติมสีย้อม Nile red 10 $\mu\text{g/ml}$ ในอาหาร DMEM ที่ไม่มี Phenol red บ่มทิ้งไว้ 20 นาที เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBS 2-5 รอบ จนกว่าสีส่วนเกินจะหมด แล้วเติมอาหาร DMEM ที่ไม่มี phenol red บันทึกภาพเซลล์ที่ได้ ใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ความยาวคลื่นแสง 495 nm โดยทำการศึกษาความเข้มข้นละ 3 หลุม และถ่ายหลุมละ 5 ภาพ อย่างมีแบบแผน ภายใต้กล้องที่เลนส์ใกล้วัตถุ 10X และนำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยใช้ฟังก์ชัน Analyze particles เพื่อทำการตรวจวัดขนาดและจำนวนของหยดไขมัน (Deutsch et al., 2014; Jaiswal et al., 2000)



ภาพที่ 2 แผนภาพในการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

8. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ ด้วยเทคนิค oil-red o

Oil-red o เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์ โดยอาศัยความสามารถของสีย้อมที่ละลายได้ดีในน้ำมันมากกว่าใน Isopropanol ประยุกต์มาจากงานของ Bäckesjö และคณะ (2006) โดยได้ทำการเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหาร ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ความเข้มข้นละ 3 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 ใน 48-well plates เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร ADM เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน เมื่อครบเวลา 21 วัน จากนั้นล้างด้วย PBS และตรึงเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น บ่มด้วย 60% Isopropanol 5 นาที จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย Oil red O/60% isopropanol บ่มทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอย่างเบามือ 2-5 รอบ หรือจนกว่าสีส่วนเกินจะหมด บันทึกภาพเซลล์ที่ได้ แล้วเติม 100% Isopropanol 100 μl และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 540 nm

9. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการใช้น้ำตาลของเซลล์ ด้วยเครื่อง Accu-chek

Accu-chek รุ่น guide เป็นอุปกรณ์วัดน้ำตาลในเลือดที่นิยมใช้ เพื่อติดตามปริมาณน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน เพื่อเป็นประโยชน์ในการควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือด โดยจะแสดงค่าออกมาเป็นปริมาณน้ำตาล mmol/L (Kim et al., 2018; Nayak & Herman, 1997) ในงานวิจัยนี้ได้นำเอา Accu-chek guide มาประยุกต์ใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลในอาหาร เพื่อตรวจสอบปริมาณการใช้น้ำตาลของเซลล์ โดยได้ทำการเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหาร CGM และ ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 ในจานหลุม 48-well plates เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร CGM และ ADM เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน เมื่อครบเวลา 10 วัน จึงดูดอาหารเก่าทั้งหมดทิ้ง จากนั้นเติมอาหารที่ใช้เลี้ยง วัดปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหาร จากนั้นดูดอาหารออกมา 20 μl มาวัดปริมาณน้ำตาลคงเหลือ ที่เวลา 4 และ 8 ชั่วโมง

10. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันในระดับ mRNA ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ ด้วยเทคนิค Real time-PCR

การศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Real time-PCR เป็นการศึกษาโดยการติดตามการเกิดปฏิกิริยา PCR ของยีนที่สนใจ โดยในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนใน โดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ Early marker โดยจะทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ยีนกลุ่ม Osteogenic markers คือยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ *ALP*, β -catenin, *BMP2*, *RUNX2*, และ *WNT3A* และยีนกลุ่ม Adipogenic markers คือยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน ได้แก่ *C/EBP- α* , *PPAR γ -2*, *MYF5*, และ *PGC-1 α* และระยะ Late marker โดยทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ (1) Osteogenic marker ได้แก่ *ALP*, *RUNX2*, *OC*, และ *OPN* (2) White adipogenic markers คือยีนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันสีขาว ได้แก่ *PPAR γ -2*, *C/EBP- α* , และ *FABP4* (3) Brown adipogenic markers ยีนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล ได้แก่ *BMP7*, *MYF5*, *PGC-1 α* , *PRDM16*, และ *UCP-1* (4) ยีนในกลุ่ม Adipokine ได้แก่ Adipsin, Adiponectin, *IL-6*, Leptin, และ *LEP-R* และ (5) ยีนในกลุ่ม Glucose transporters ได้แก่ *GLUT1* และ *GLUT4*

โดยมีวิธีโดยสังเขปดังนี้ เลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม ใน 24-well plates ในอาหาร CGM และ ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 และ 15 μM ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เลี้ยงในอาหาร CGM และ ADM เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งครบเวลา 3, 7, และ 14 วัน โดยเลี้ยงความเข้มข้นละ 3 หลุม จากนั้นทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัด FavorPrep Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen, FATRK001) โดย total RNA ที่ได้จะนำมาสังเคราะห์ cDNA ด้วย HyperScript™ RT master mix with oligo dt (GeneAll, 601-703) จากนั้นจึงนำเอา cDNA ที่ได้มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบด้วยเทคนิค RT-real time PCR โดยใช้ตัวยาคือ iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, 172-5122) ทั้งนี้ Primer ที่ใช้ในการศึกษามีรายละเอียดดังตารางที่ 2 โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 วินาที, และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 30 วินาที ประมาณ 40 cycle ด้วยเครื่อง Real-time PCR (บริษัท Applied Biosystem, รุ่น 7500 Real-time PCR, สหรัฐอเมริกา) และคำนวณเพื่อหา $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Choi et al., 2016; Rao et al., 2013)

11. ศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อปริมาณการหลั่ง Adipokine จากเซลล์ไขมันด้วย MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel kit

การศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อปริมาณการหลั่ง Cytokine จากเซลล์ไขมัน หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Adipokine เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีน ในระดับการแสดงออกของโปรตีน โดยการติดตามการหลั่งของ Adipokine ด้วย MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel kit ซึ่ง Adipokine ที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วย Adiponectin, IL-6, และ Leptin โดยทำการเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ใน 48-well plates ในอาหาร ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 และ 15 μM ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร ADM ความเข้มข้นละ 3 หลุม ในการทำการทดลองจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน และเก็บอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ในวันที่ 10, 14, และ 17 จากนั้นนำอาหารที่เก็บได้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 1 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์และเก็บของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่อุณหภูมิ -20 °C โดยมีข้อควรระวังคือ เก็บได้ไม่เกิน 2 เดือน และระวังไม่ให้ละลายเกิน 2 รอบ จากนั้นนำไปวัดปริมาณ Cytokine ด้วย MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel kit โดยอาศัยหลักการ คือ Adipokine ในอาหารจะจับกับ Antibody ที่ถูกเคลือบอยู่บน magnetic beads เมื่อเติมสารเรืองแสงลงไปในช่วงทดลอง สารเรืองแสงจะเข้าทำปฏิกิริยากับ Adipokine ที่จับกับ Antibody และติดอยู่บน Magnetic beads และเมื่อนำไปวัดด้วยเครื่อง Luminex 200™ System (บริษัท Merck, เยอรมัน) เครื่องจะทำการตรวจจับการเรืองแสงและถูกคำนวณออกมาเป็นปริมาณ Adipokine หน่วย pg/ml โดย Adiponectin มีค่าความละเอียดในการวัดเท่ากับ 15 pg/mL ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 6.0 pg/mL และค่ากราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 26 - 400,000 pg/mL, IL-6 มีค่าความละเอียดในการวัดเท่ากับ 0.6 pg/mL ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.4 pg/mL และค่ากราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 0.96-15,000 pg/ml และ Leptin มีค่าความละเอียดในการวัดเท่ากับ 10 pg/mL ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 4.7 pg/mL และค่ากราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 9.6 - 150,000 pg/mL

12. วิธีการวัดปริมาณโปรตีนในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมนุษย์ด้วยเทคนิค Bicinchoninic acid assay

Bicinchoninic acid assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน โดยอาศัยหลักการที่โปรตีนจะเปลี่ยน Cu^{2+} ให้อยู่ในรูป Cu^+ จับกับ Bicinchoninic acid ได้เป็นสารประกอบ Bicinchoninic acid Cu^+ complex ซึ่งมีผลึกสีม่วง สามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 570 nm ด้วย microplate reader ทำการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 จำนวน 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ในจานหลุม 96-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 200 μ l บ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยเติม 100 μ l RIPA Buffer ลงในแต่ละหลุม 100 μ l นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C (แช่แข็ง และทำให้ละลาย 3 รอบ) จากนั้นเติม BCA Reagent 100 μ l ต่อหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับ Standard curve ของโปรตีนมาตรฐาน คำนวณค่าที่ได้ออกมาเป็นปริมาณโปรตีน ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Walker, 1996)

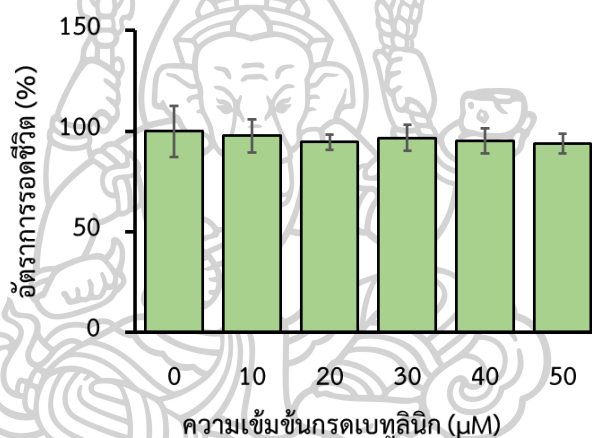
13. การวิเคราะห์สถิติ

งานวิจัยนี้ ใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 27 ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยทดสอบการแจกแจงข้อมูล โดย Shapiro-Wilk test ในกรณีที่ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ ทดสอบโดยใช้คำสั่ง One-way anova สถิติแบบ Tukey ในการทดลองที่มีค่า variances เท่ากัน และ Dunnett's C variances ในการทดลองที่มีค่า variances ไม่เท่ากัน เพื่อหาค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในกรณีที่การแจกแจงข้อมูลไม่ปกติ ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ในการทดสอบความแตกต่างของการทดลอง และทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมด้วย สถิติ Mann Whitney U test โดย $n = 3$ และค่า p-value < 0.05 และ 0.01

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. ผลของกรดเบทูลินิกต่ออัตราการรอดชีวิตและกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์

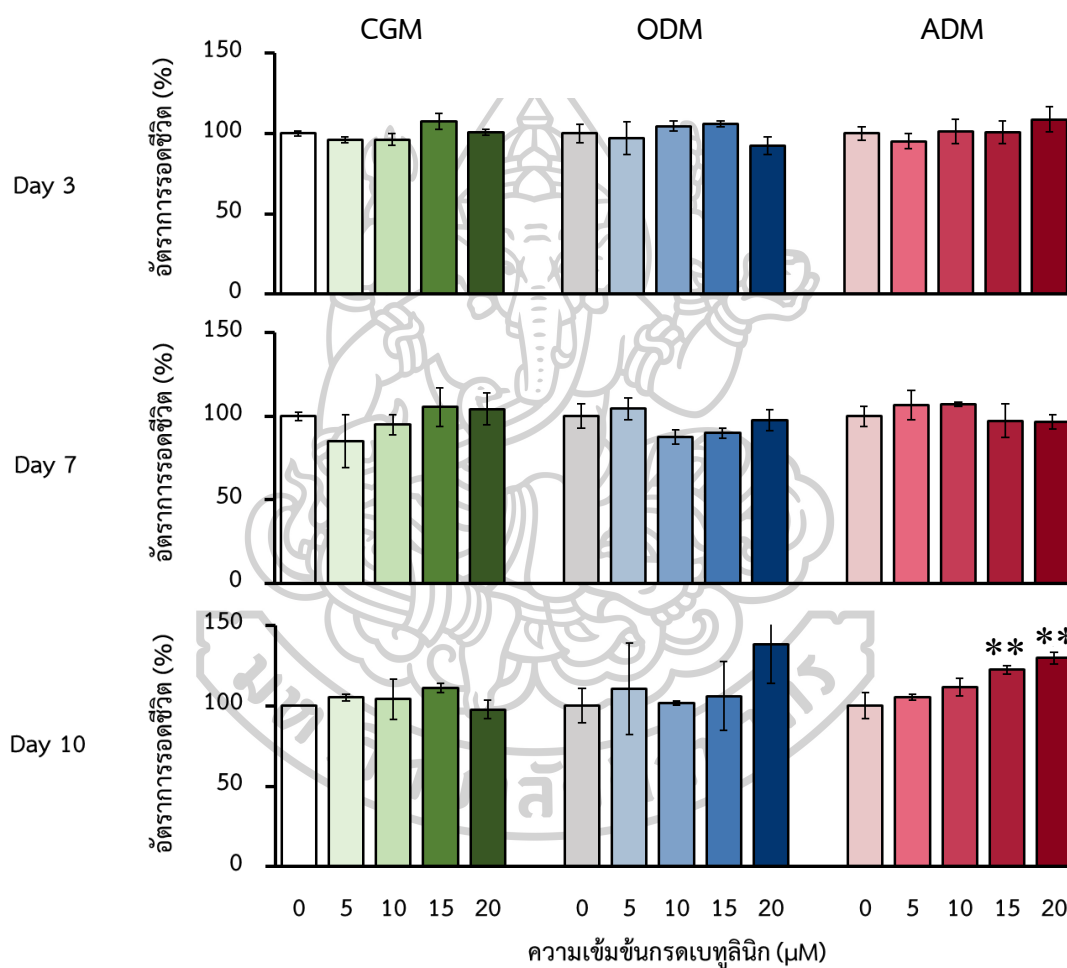
ผลการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ด้วยเทคนิค Alamar blue cell viability เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหารที่มีกรดเบทูลินิกและมี DMSO ที่ใช้ในการละลายกรดเบทูลินิกไม่เกิน 0.05% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับกรดเบทูลินิกความเข้มข้นในช่วง 10 - 50 μM ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กรดเบทูลินิกเข้มข้น 10-50 μM ไม่ส่งผลต่ออัตราการตายของเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นเมื่อทำการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ UE7T-13 ระยะเวลาเพิ่มขึ้น โดยทำการศึกษาในอาหารทั้ง 3 สภาวะ ได้แก่ สภาวะที่เซลล์เจริญในอาหาร Complete growth medium (CGM), สภาวะที่เซลล์ถูกชักนำให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในอาหาร Osteogenic differentiation medium (ODM) และสภาวะที่เซลล์ถูกชักนำให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันในอาหาร Adipogenic differentiation medium (ADM) โดยเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3, 7, และ 10 วัน จากผลการศึกษาความเป็นพิษของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) ประกอบกับผลจากการศึกษาในเซลล์หนู (Choi et al., 2016; Lo et al., 2010) พบว่ากรดเบทูลินิกความเข้มข้นช่วง 5-20 μM ส่งผลที่ดีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยไม่ส่งผลให้เกิดการตายต่อเซลล์ Pre-osteoblaste ของหนู

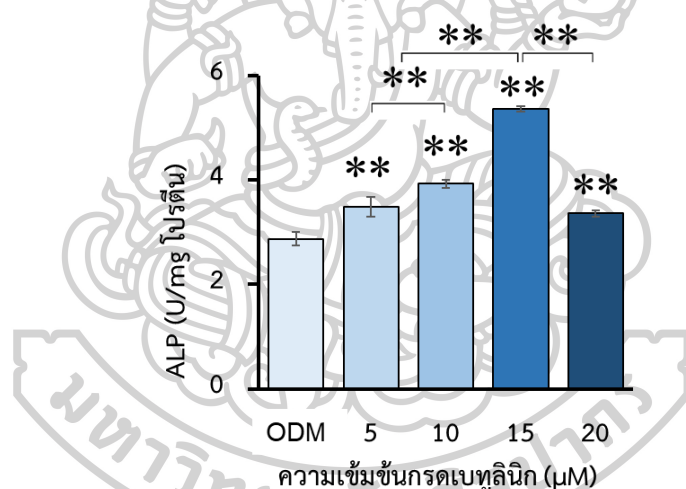
ผู้วิจัยจึงเลือกใช้กรดเบทูลินิกความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, และ 20 μM ในการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์ด้วยเทคนิค AlamarBlue™ Cell Viability assay และในการศึกษาอื่นๆ ต่อไป พบว่าในอาหาร CGM และ ODM ที่ 3, 7, และ 10 วัน และ ADM ที่ 3 และ 7 วัน BetA 5 - 20 μM ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมการเผาผลาญของ hMSC ในขณะที่เวลา 10 วัน ในอาหาร ADM เซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 15 - 20 μM มีกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์เพิ่มขึ้นร้อยละ 22.23 และ 29.51 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหารที่มี BetA 0-20 μM ในอาหาร CGM, ADM, และ ODM วันที่ 3 วัน, วันที่ 7 วัน, และ วันที่ 10 วัน (** $p < 0.01$)

2. กรดเบทูลินิกชักนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก

การศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 μM เมื่อครบ 7 วัน วัดการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase จากผลการศึกษาพบว่า กรดเบทูลินิกเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ชักนำให้การทำงานของเอนไซม์ ALP สูงขึ้นร้อยละ 21.50, 36.84, 86.47, และ 16.97 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) และพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิก 15 μM มีการทำงานของเอนไซม์ ALP สูงที่สุด โดยสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ และกลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิก 10 μM มีการทำงานของเอนไซม์ ALP สูงรองลงมา แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิก 5 และ 20 μM ($p < 0.05$) (ภาพที่ 5)

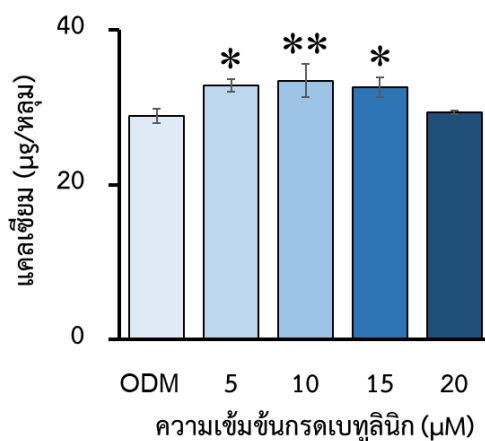


ภาพที่ 5 กรดเบทูลินิกเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ALP ในเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ODM (** $p < 0.01$)

ตัวบ่งชี้สำคัญอีกประการของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก คือการสะสมแคลเซียมของเซลล์ โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการสะสมแคลเซียมเชิงปริมาณ ด้วยวิธี Calcium colorimetric assay และเชิงคุณภาพโดยการย้อมด้วยสี alizarin red

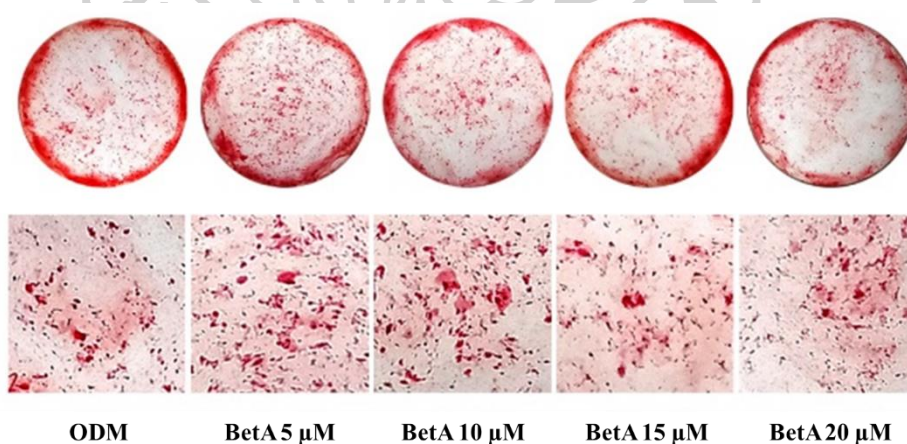
ผลการศึกษาปริมาณการสะสมแคลเซียมของเซลล์ UE7T-13 ที่ได้รับกรดเบทูลินิก โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร ODM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, และ 20 μM เมื่อครบ 14 วัน วัดปริมาณแคลเซียมด้วยสาร O - cresolphthalein (Tu et al., 2014) พบว่ากรดเบทูลินิก

ความเข้มข้น 5, 10, และ 15 μM มีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นร้อยละ 16.03, 18.51, และ 15.27 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับกรดเบทูลินิก และที่น่าสังเกตคือเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 20 μM พบว่ามี ALP activity เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย แต่กลับมีการสะสมแคลเซียมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 6 การสะสมแคลเซียมของเซลล์ UE7T-13 เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับกรดเบทูลินิกเข้มข้น 5-15 μM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

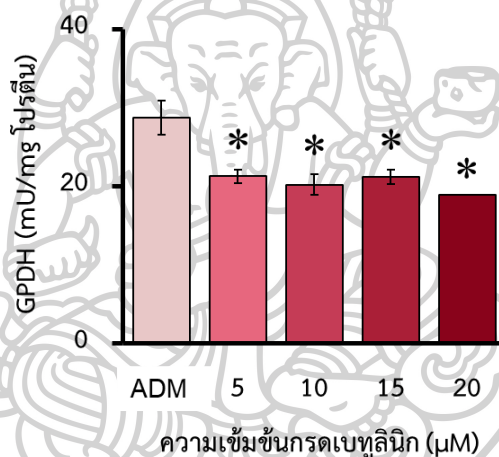
ผลการศึกษาด้วยเทคนิคการย้อมสีด้วย Alizarin red พบว่าที่เวลา 14 วันกรดเบทูลินิกเข้มข้น 5 - 15 μM ชักนำให้เซลล์ UE7T-13 มีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 Alizarin red แสดงให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกส่งเสริมการสะสมแคลเซียมของเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 14 วัน

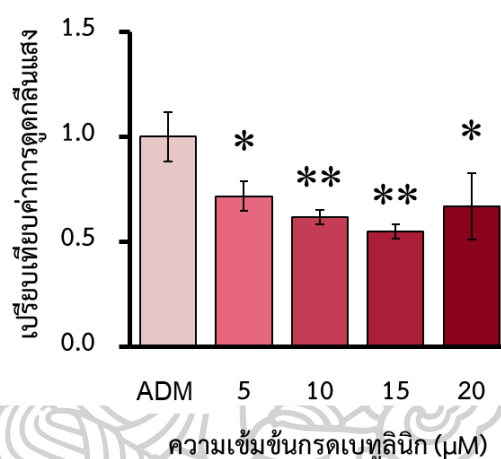
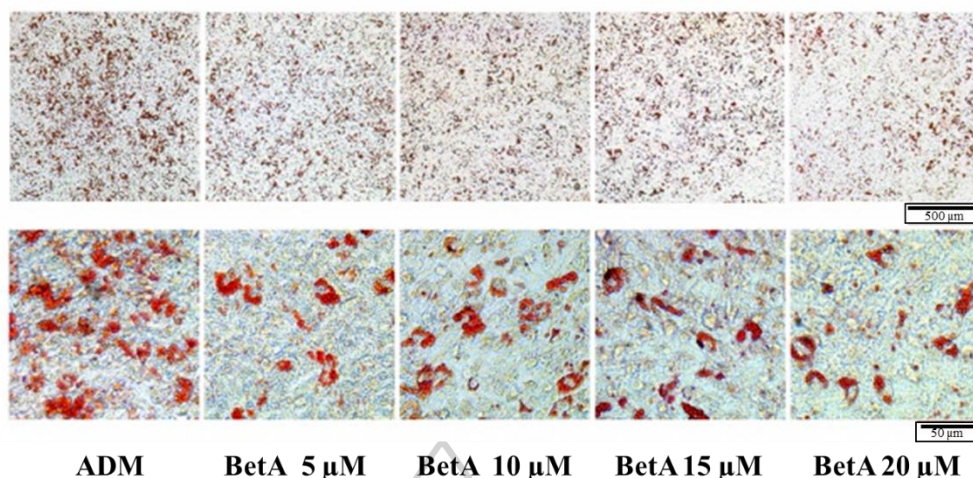
3. กรดเบทูลินิกส่งผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์

เอนไซม์ Glycerol 3-phosphate dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสะสมไขมัน ดังนั้นทิศทางการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ GPDH จึงสามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงไปสภาพเป็นเซลล์ไขมัน โดยเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, และ 20 μM เมื่อครบ 7 วัน ผลการศึกษาพบว่ากรดเบทูลินิกที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ลดการทำงานของเอนไซม์ GPDH ได้ร้อยละ 26.08, 29.77, 26.38, และ 34.42 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง (ภาพที่ 8)



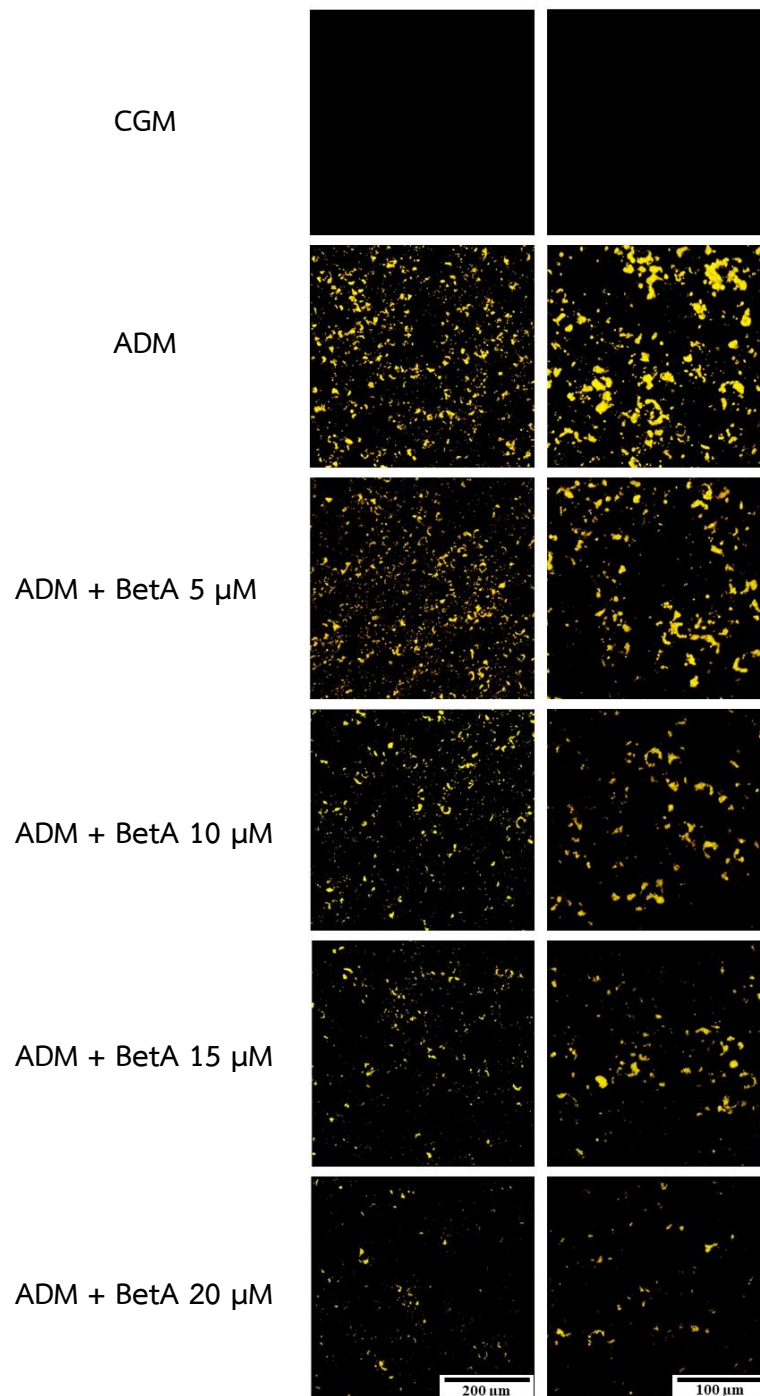
ภาพที่ 8 การทำงานของเอนไซม์ GPDH ของเซลล์ UE7T-13 ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 7 วัน (* $p < 0.05$)

สอดคล้องกับผลการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการสะสมไขมันในเซลล์ UE7T-13 ซึ่งเป็นอีกลักษณะบ่งชี้สำคัญของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร ADM ที่มีกรดเบทูลินิกเข้มข้น 0 - 20 μM เป็นเวลา 21 วัน พบว่ากรดเบทูลินิกที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, และ 20 μM ในอาหาร ADM ชักนำไปให้เซลล์ UE7T-13 ลดการสะสมของไขมันร้อยละ 28.40, 38.41, 45.13, และ 33.06 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 9)

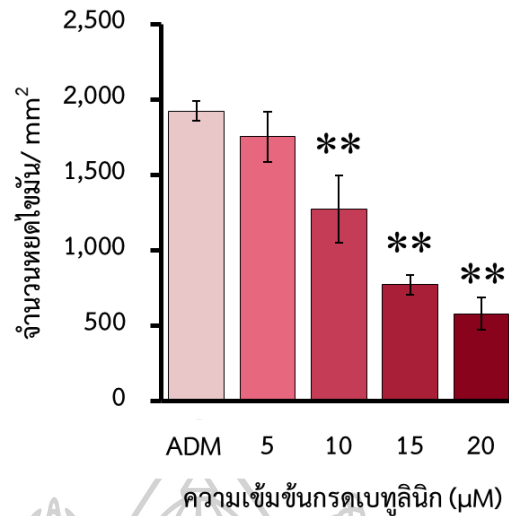


ภาพที่ 9 การสะสมหยดไขมันและค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย oil-red o เมื่อเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM และ ADM ที่มีกรดเบทูลินิก 0-20 μM เป็นเวลา 21 วัน (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

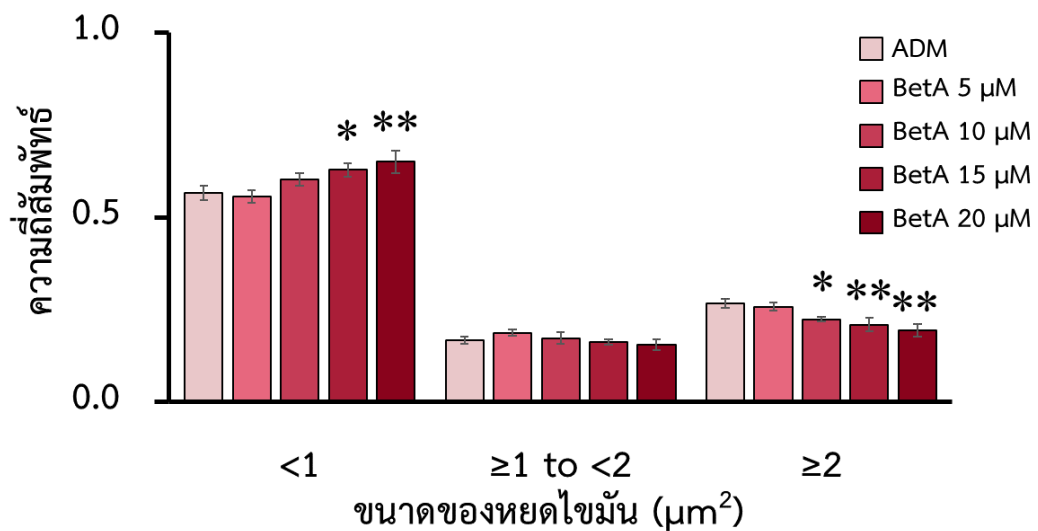
ผลของกรดเบทูลินิกต่อจำนวนและขนาดของหยดไขมัน ด้วยเทคนิคสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ Nile red พบว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกมีจำนวนหยดไขมันน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (ภาพที่ 10) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่ากรดเบทูลินิก 10, 15, และ 20 μM ลดจำนวนหยดไขมันต่อพื้นที่น้อยลงร้อยละ 33.75, 59.86, และ 69.81 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 11) และเมื่อวิเคราะห์ขนาดของหยดไขมัน พบว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 15 และ 20 μM มีสัดส่วนหยดไขมันที่มีขนาดเล็ก (เล็กกว่า 1 μm^2) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสัดส่วนเพิ่มขึ้นร้อยละ 11.03 และ 14.99 ตามลำดับ ในขณะที่กรดเบทูลินิกเข้มข้น 10, 15, และ 20 μM มีสัดส่วนของหยดไขมันใหญ่ (ขนาดใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 2 μm^2) ปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยลดลงร้อยละ 16.18, 21.55, และ 27.42 ตามลำดับ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อย้อมหยดไขมันด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ Nile red



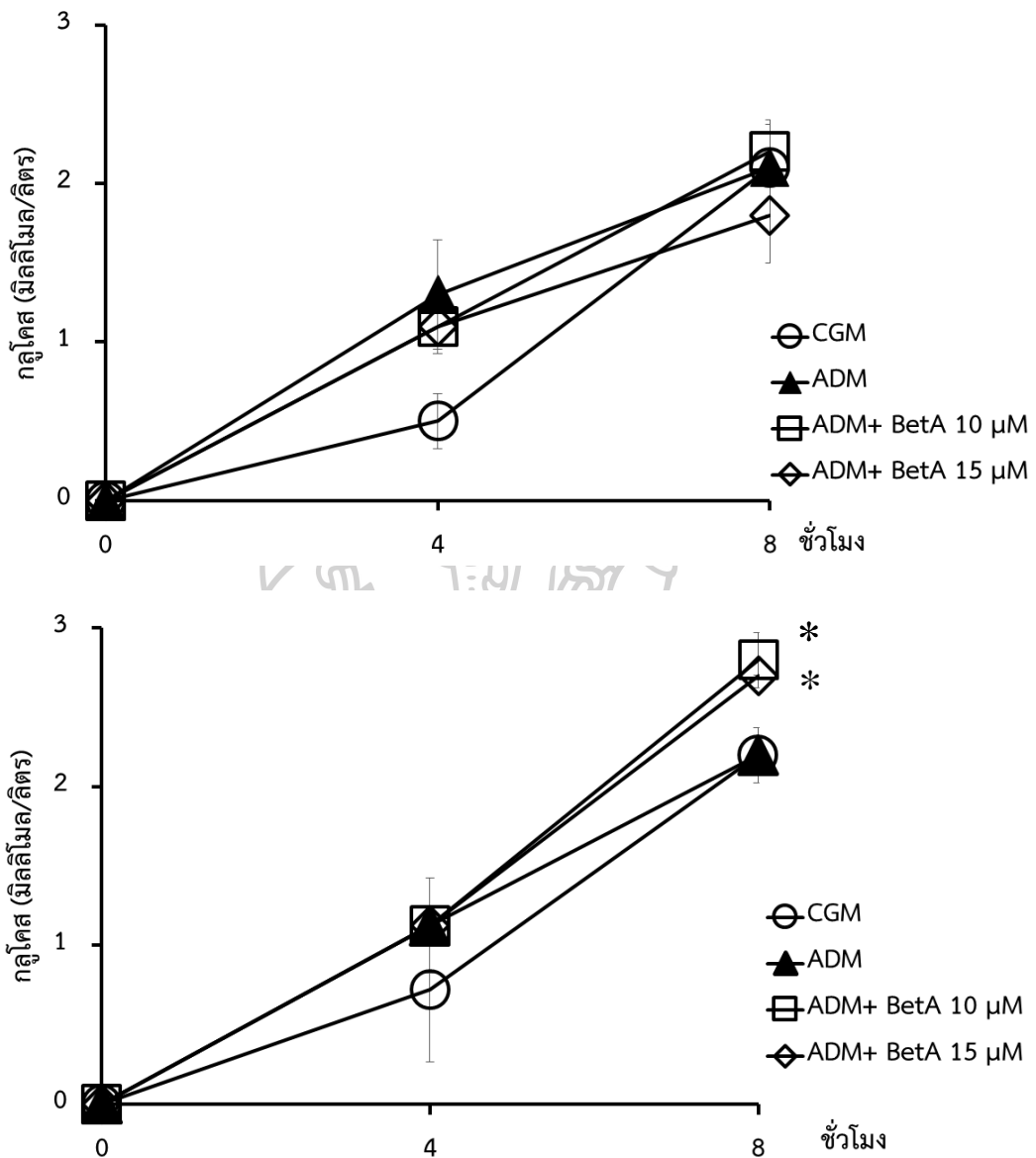
ภาพที่ 11 กรดเบทูลินิก 10-20 µM ยับยั้งจำนวนหยดไขมัน/ต่อพื้นที่ ของเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ADM ที่มี BetA 0-20 µM เป็นเวลา 21 วัน (** $p < 0.01$)



ภาพที่ 12 สัดส่วนขนาดของหยดไขมันในเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ADM ที่มี BetA เข้มข้น 5-20 µM เวลา 21 วัน (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

ผลการศึกษาการใช้น้ำตาลของเซลล์เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่มี BetA เป็นเวลา 10 วัน และ 14 วัน วัดปริมาณน้ำตาลในอาหารหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกเป็นเวลา 14 วัน หลังจากเปลี่ยนอาหาร 8 ชั่วโมง

เซลล์ที่ได้รับ BetA 10 และ 15 μM มีการใช้น้ำตาลในอาหารสูงกว่าควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า BetA เพิ่มอัตราการใช้น้ำตาลเซลล์ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การใช้น้ำตาลของเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร CGM และ ADM ที่มี BetA 0-20 μM 10 และ 14 วัน (* $p < 0.05$)

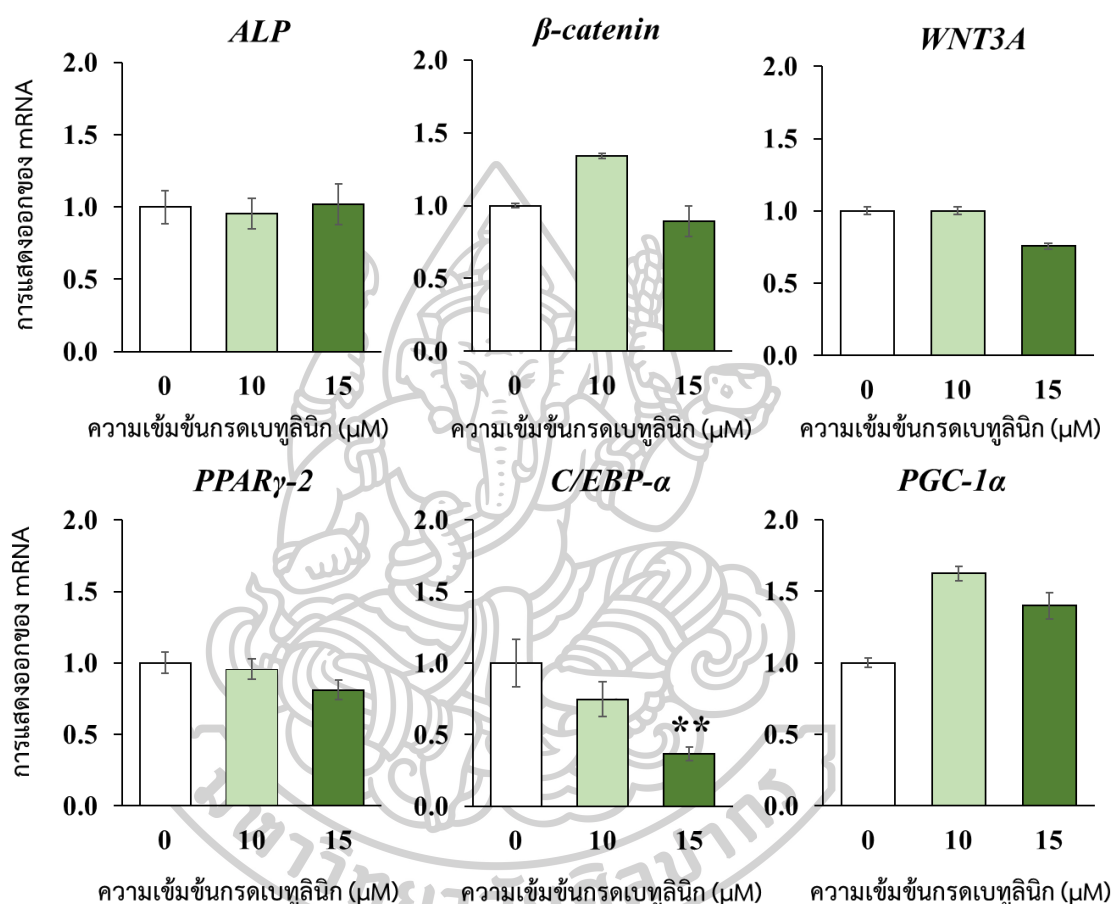
จากผลการศึกษาจึงสามารถสรุปได้ว่ากรดเบทูลินิกยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GPDH และลดการสะสมไขมันทั้งในแง่ของจำนวนและขนาดของหยดไขมัน และส่งผลให้การใช้น้ำตาลของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น

4. กรดเบทูลินิกส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน

จากผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ การสะสมแคลเซียมและหยดไขมันของเซลล์ ทำให้ทราบว่ากรดเบทูลินิกมีคุณสมบัติในการชักนำให้ hMSC เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน ซึ่งจากคุณสมบัติของกรดเบทูลินิกในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันที่เด่นชัดมากกว่าการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ในการนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับทั้ง 2 กระบวนการ โดยให้นำหนักไปที่คุณสมบัติในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันด้วยเทคนิค real time-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาปริมาณ mRNA ของยีนที่สนใจ โดยเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหารทั้ง 3 สภาวะ คือ ในสภาวะที่ชักนำให้เซลล์เจริญ (CGM) ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 และ 15 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร CGM เป็นเวลา 3 วัน, สภาวะที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์กระดูก (ODM) และสภาวะที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน (ADM) ที่มีกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 และ 15 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร ADM เป็นเวลา 3 วัน, 7 วัน, และ 14 วัน โดยเลือกใช้ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็นยีนควบคุม และเลือกยีนที่สนใจจากช่วงระยะที่แตกต่างกันของกระบวนการ Osteogenesis (*ALP*, β -catenin, *BMP2*, *Runx2*, *Wnt3a*, *OC* และ *OPN*) และ Adipogenesis (*Adipsin*, *Adiponectin*, *BMP7*, *C/EBP- α* , *FABP4*, *GLUT1*, *GLUT4*, *Leptin*, *LEP-R*, *PPAR γ -2*, *PGC-1 α* , *PRDM16*, และ *UCP-1*) และหาค่า $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ แสดงค่าที่ได้เป็นค่าการแสดงออกของแต่ละยีนในกลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิกเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

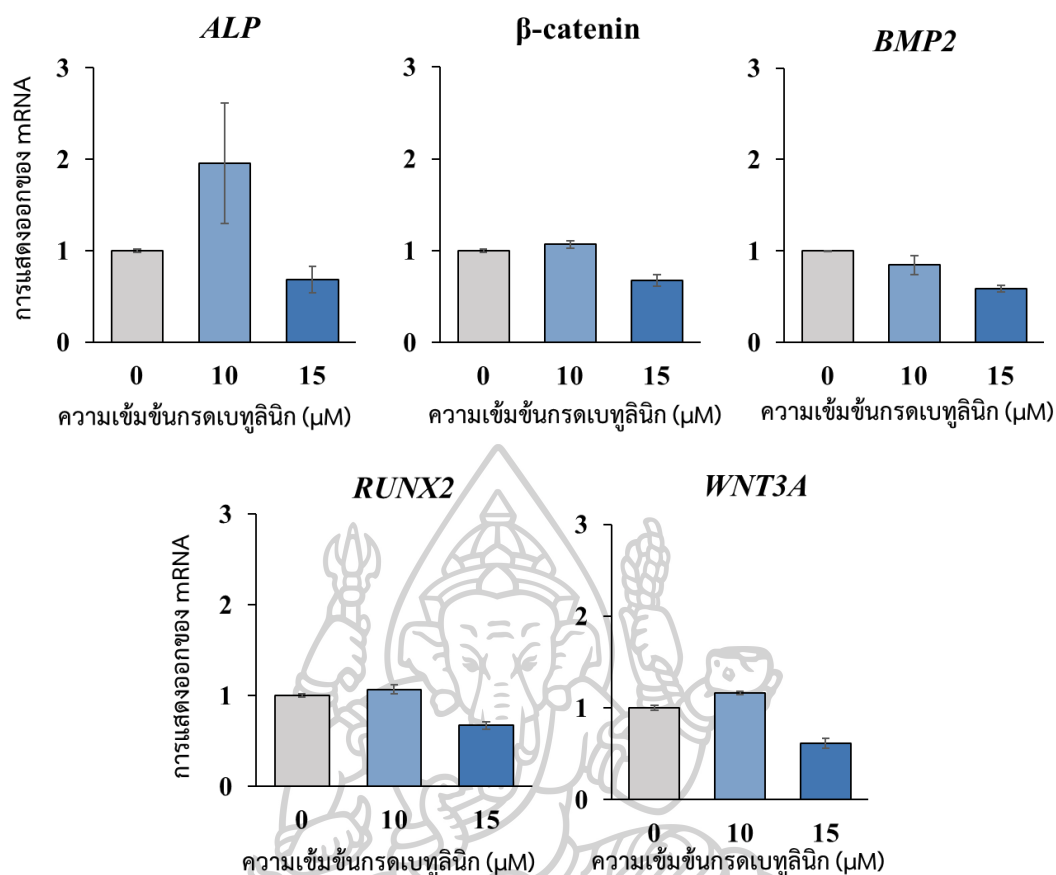
β -catenin เป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของตัวแปรหลักในการถอดรหัส (transcription factor) ในกระบวนการการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Osteogenesis) ผ่าน Wnt/ β -catenin pathway เมื่อการแสดงออกของยีน β -catenin เพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้กระบวนการการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกเพิ่มขึ้น *Wnt3a* เป็นอีกหนึ่งตัวแปรหลักของกระบวนการการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ผลการศึกษาในอาหาร CGM ที่เวลา 3 วัน พบว่ากรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 μM และ 15 μM ไม่ส่งผลต่อการชักนำการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Osteogenic Marker ทั้ง 3 ตัว (*ALP*, β -catenin, และ *Wnt3a*) และเมื่อพิจารณาในส่วนของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อไขมัน (Adipogenic markers genes)

โดย *C/EBP- α* และ *PPAR γ -2* เป็น early marker ของเซลล์ไขมันสีขาว และใช้ *PGC-1 α* เป็น Early marker ของเซลล์ไขมันสีน้ำตาล พบว่ากรดเบทูลินิก 15 μ M ลดการแสดงออกของ *C/EBP- α* โดยลดลง 2.70 เท่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในยีน *PPAR γ -2* และ *PGC-1 α* (ภาพที่ 14)



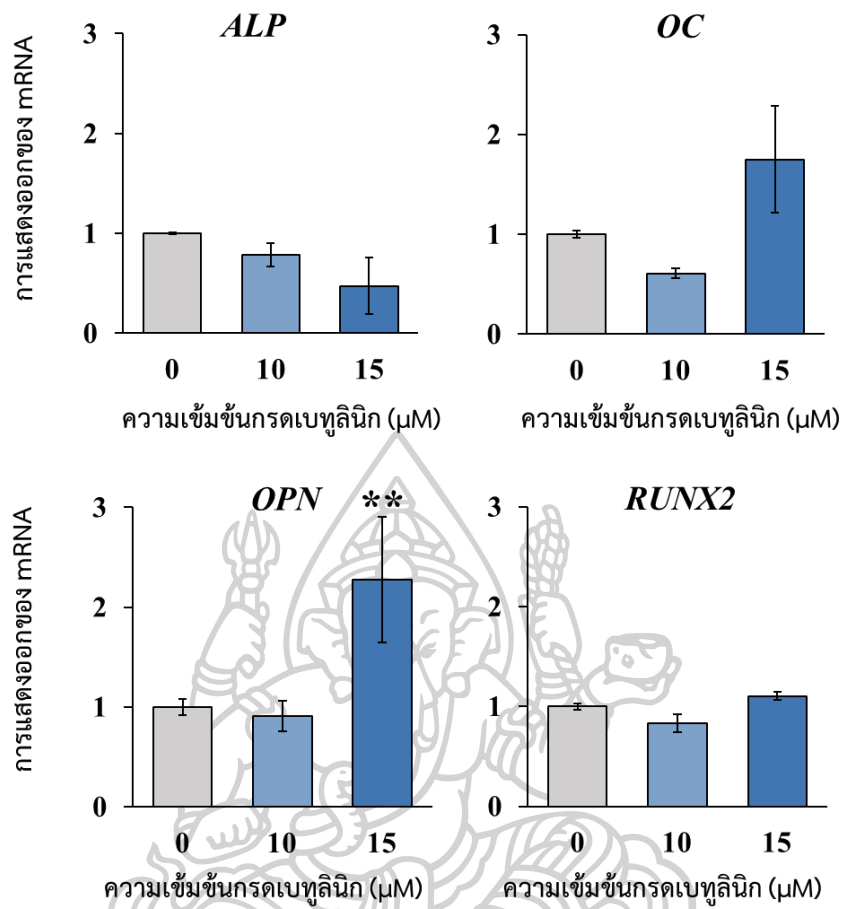
ภาพที่ 14 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันในเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3 วัน (** $p < 0.01$)

ผลการศึกษาในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร ODM พบว่าที่เวลา 3 วัน กรดเบทูลินิกไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นยีนที่มักถูกใช้เป็น early marker ของกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ *ALP*, *β -catenin*, *BMP2*, *RUNX2*, และ *WNT3A* (ภาพที่ 15)

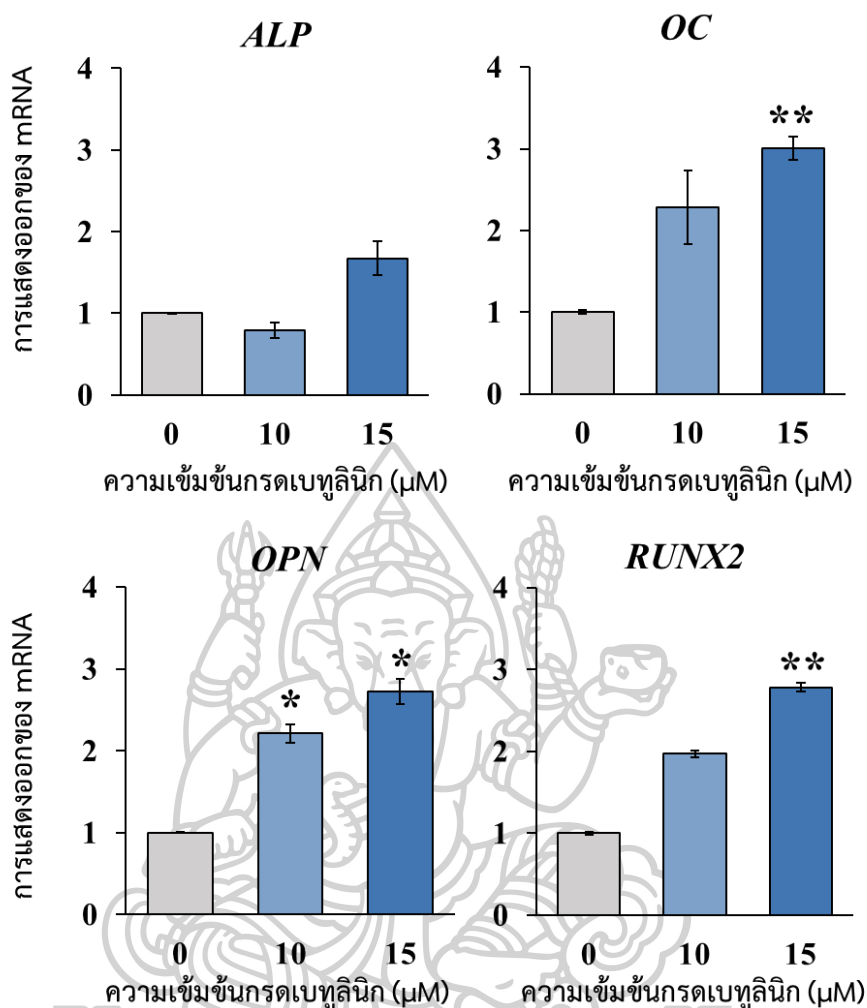


ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 3 วัน

จากนั้นเมื่อทำการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Osteogenic marker ในระยะ Late marker โดยทำการศึกษาที่เวลา 7 และ 14 วัน ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 7 กรดเบทูลินิกไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ALP, RUNX2, และ OC ในขณะที่การแสดงออกของยีน OPN เพิ่มขึ้น 2.27 เท่า ในเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 15 μM (ภาพที่ 16) ผลการศึกษาในวันที่ 14 พบว่ากรดเบทูลินิกความเข้มข้น 15 μM ส่งเสริมการแสดงออกของ RUNX2 และ OC โดยเพิ่มขึ้น 2.78 และ 3.01 เท่า ตามลำดับ และกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 และ 15 μM ส่งเสริมการแสดงออกของ OPN โดยแสดงออกเพิ่มขึ้น 2.21 และ 2.73 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 17)

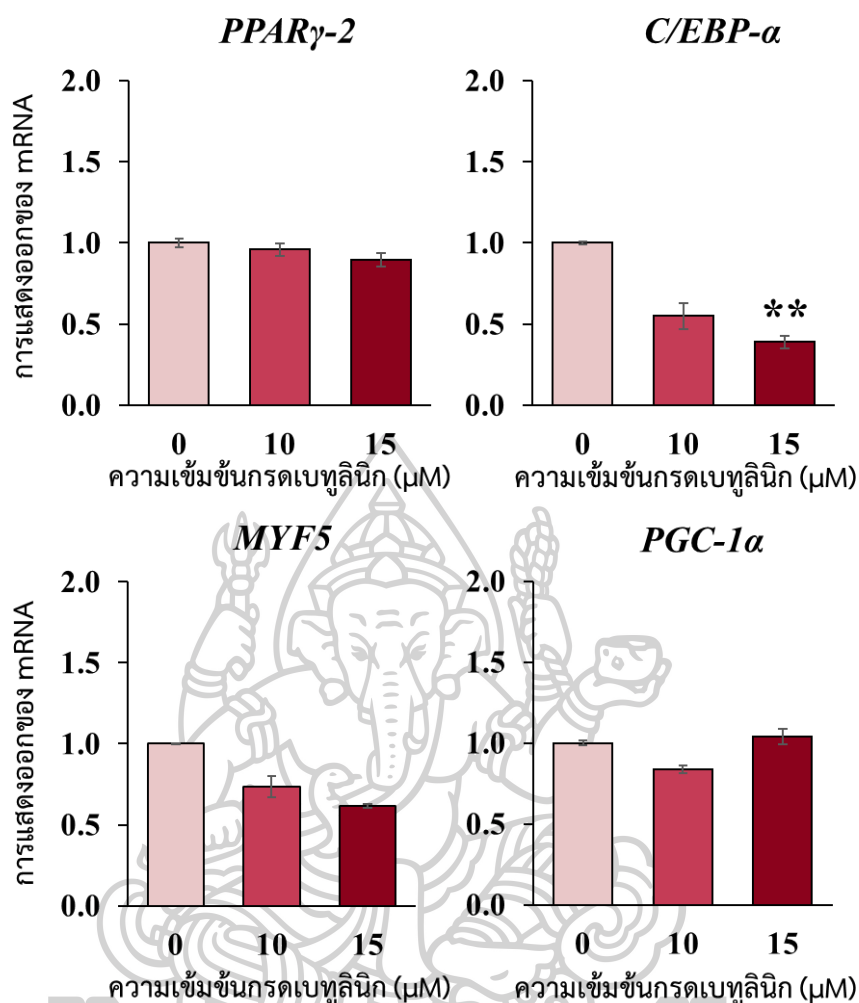


ภาพที่ 16 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ในอาหาร ODM 7 วัน (** $p < 0.01$)



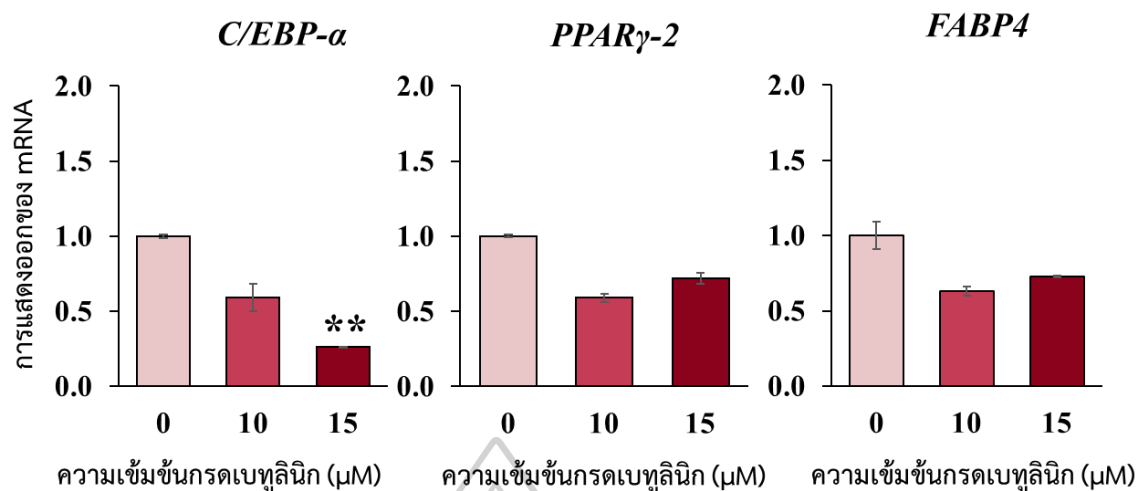
ภาพที่ 17 กรดเบทูลินิกส่งเสริมการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกในเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM 14 วัน (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ hMSC ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันที่เวลา 3 วัน พบว่ากรดเบทูลินิกยับยั้งการแสดงออกของตัวบ่งชี้ในระยะแรกของกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipogenesis) ในส่วนที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นไขมันสีขาว คือ *C/EBP- α* ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยกรดเบทูลินิกเข้มข้น 15 μM ลดการแสดงออกของ *C/EBP- α* ลง 2.57 เท่า ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างในยีนอื่น (ภาพที่ 18)

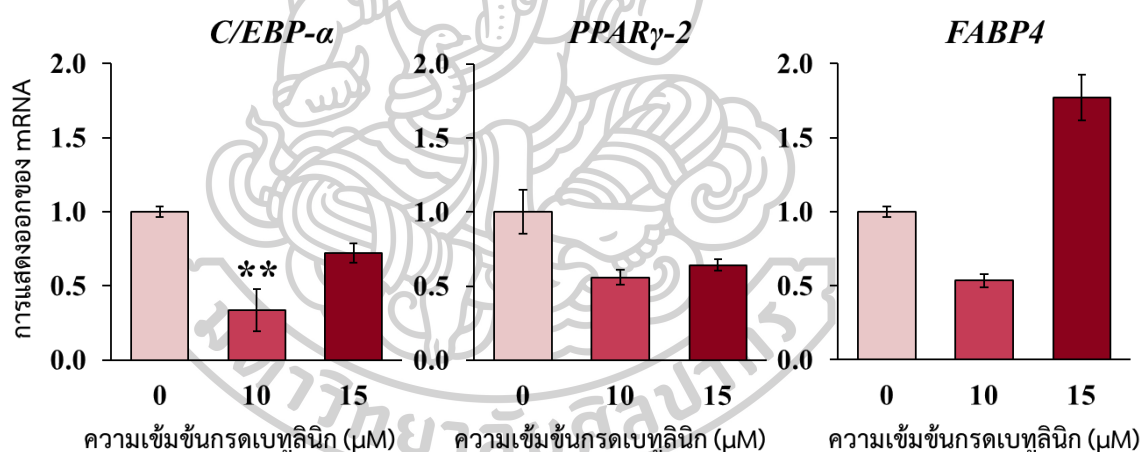


ภาพที่ 18 การแสดงของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 3 วัน (** $p < 0.01$)

สอดคล้องกับการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว ในระยะท้าย ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ผลการศึกษาที่เวลา 7 วัน กรดเบทูลินิก 15 μM ยับยั้งการแสดงออกของ *C/EBP-α* โดยลดลง 3.83 เท่า (ภาพที่ 19) ในขณะที่ 14 วัน เซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 10 μM มีการแสดงออกของ *C/EBP-α* ลดลง 2.97 เท่า (ภาพที่ 20)



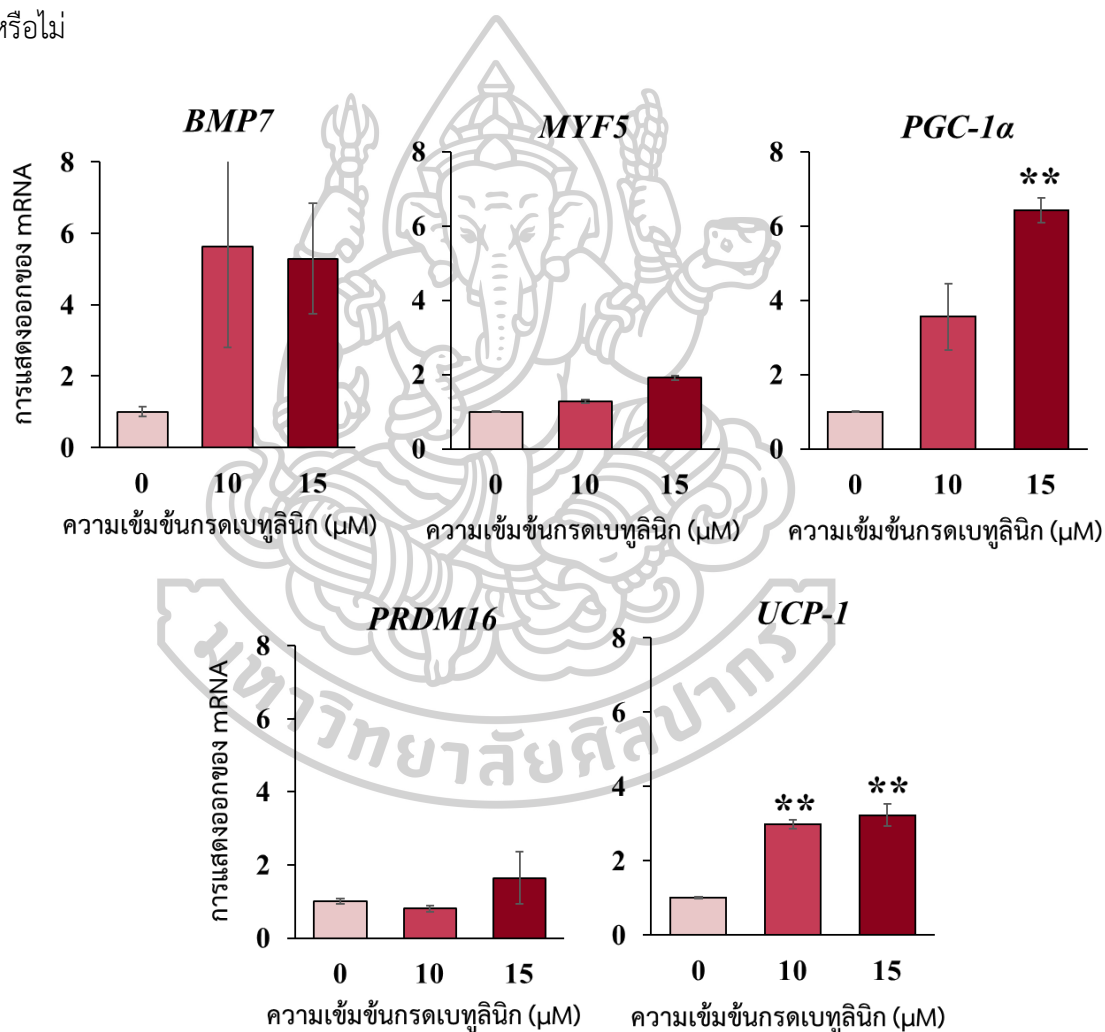
ภาพที่ 19 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว ในอาหาร ADM ที่เวลา 7 วัน (** $p < 0.01$)



ภาพที่ 20 การแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว ในอาหาร ADM 14 วัน (** $p < 0.01$)

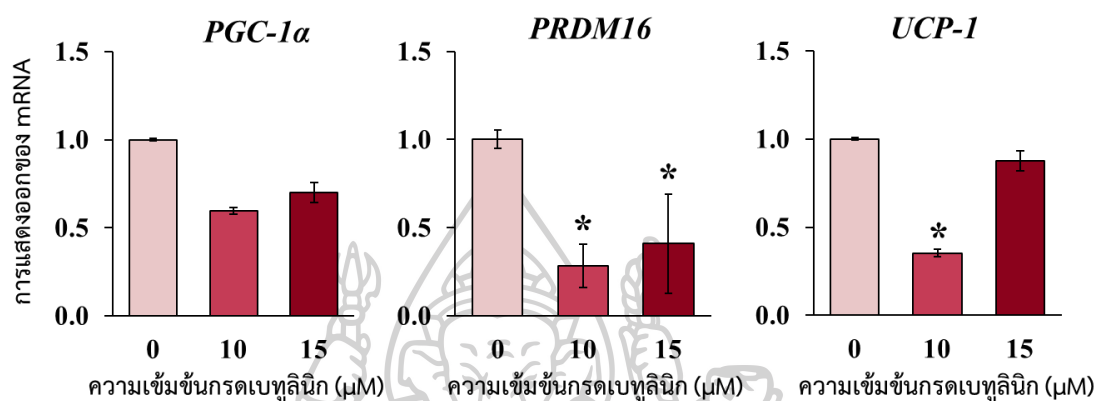
ทั้งนี้เมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีนในกลุ่มไขมันสีน้ำตาล โดยทำการศึกษายีน *BMP7*, *MYF5*, *PGC-1α*, *PRDM16*, และ *UCP-1* ที่เวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่ายีน *PGC-1α* และ *UCP-1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 15 μM โดย *PGC-1α* เพิ่มขึ้น 6.42 เท่า และ *UCP-1* แสดงออกเพิ่มขึ้นเป็น 3.22 (ภาพที่ 21) โดย *UCP-1* เป็นยีนทำหน้าที่เกี่ยวกับการถ่ายโอนโปรตอน (H^+) เข้าสู่ภายในของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย *UCP-1* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมาก

มากในการย่อยสลายไขมัน และทำให้เกิดความร้อน ทั้งนี้ *UCP-1* จะถูกชักนำให้แสดงออกโดยยีน *PGC-1 α* ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า กรดเบทูลินิกส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาลในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ และนอกจากนี้กรดเบทูลินิก 10 และ 15 μM ยังมีการแสดงออกของ *BMP7* เพิ่มขึ้น 5.64 และ 5.29 เท่าตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติ เนื่องจากมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง (โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 2.83 และ 1.55) และนอกจากนี้ค่า Ct ของ *BMP7* มีค่าสูงกว่า 30 จึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่า กรดเบทูลินิกส่งผลต่อการแสดงออกของ *BMP7* ได้จริงหรือไม่



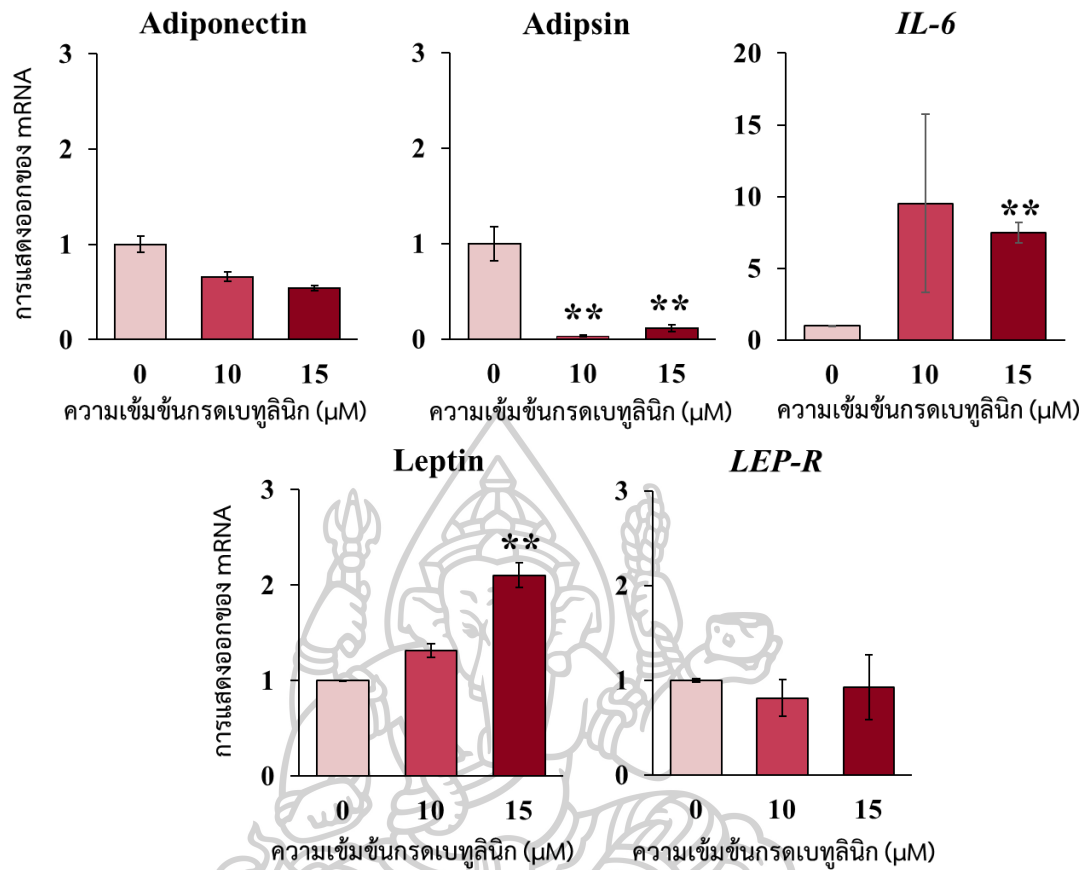
ภาพที่ 21 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น *Brown adipocytes* ในอาหาร ADM ที่เวลา 7 วัน (** $p < 0.01$)

ผลการศึกษากการแสดงออกของยีนในกลุ่มไขมันสีน้ำตาล โดยทำการศึกษายีน *PGC-1 α* , *PRDM16*, และ *UCP-1* ที่เวลา 14 วัน พบว่าการแสดงออกของ *PRDM16* ลดลงเมื่อได้รับกรดเบทูลินิก 10 และ 15 μM โดยลดลง 3.53 และ 2.45 เท่า ตามลำดับ และยังพบว่าการแสดงออกของ *UCP-1* ลดลง 2.84 เท่า ในกลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิก 10 μM (ภาพที่ 22)



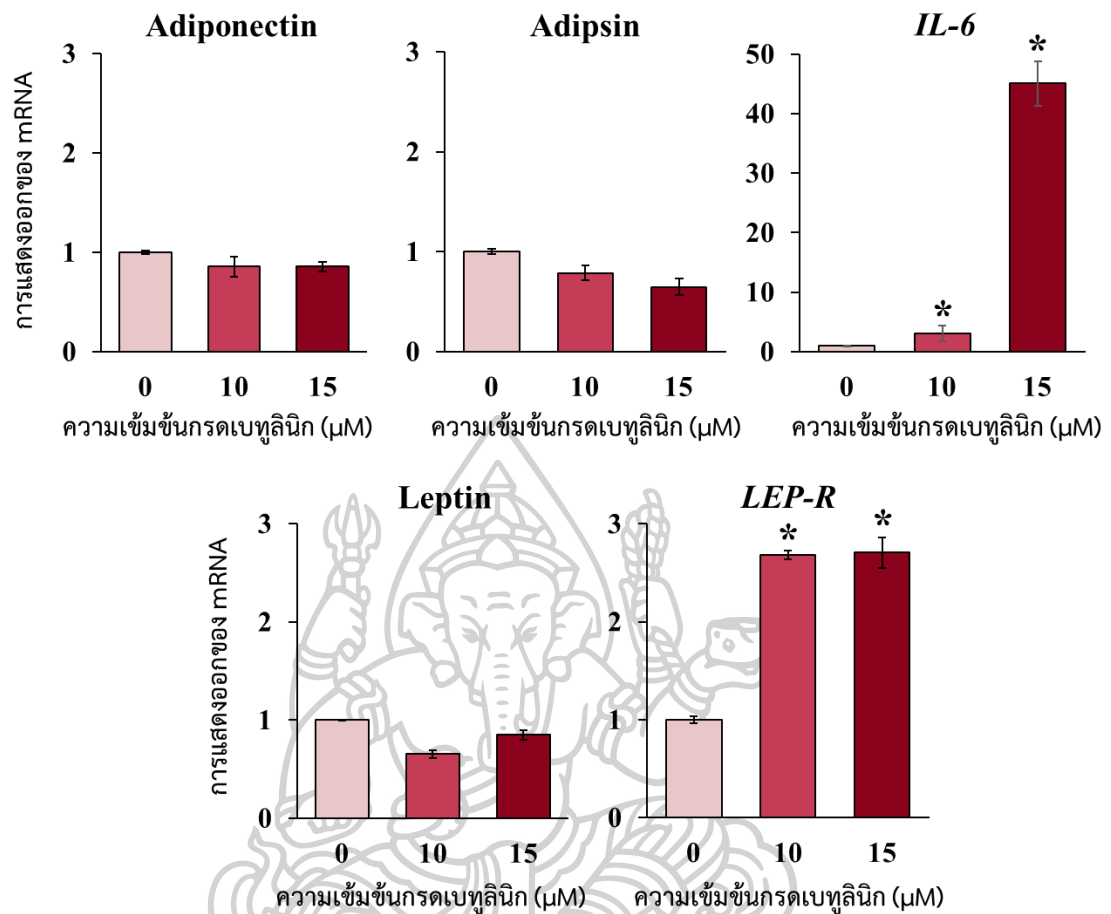
ภาพที่ 22 ผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น *Brown adipocytes* ในอาหาร ADM ที่เวลา 14 วัน (* $p < 0.05$)

ผลการศึกษาในส่วนของยีนในกลุ่ม Adipokine ที่ 7 วัน และ 14 วัน พบว่า ในวันที่ 7 Adipsin มีแสดงออกลดลง 29.42 และ 8.65 เท่า ในกลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิก 10 และ 15 μM ตามลำดับ (ภาพที่ 23) โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในวันที่ 14 (ภาพที่ 24) จากการศึกษาพบว่า เซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกมีการแสดงออกของ *IL-6* เพิ่มขึ้นทั้งในวันที่ 7 และวันที่ 14 โดยวันที่ 7 กรดเบทูลินิก 15 μM เพิ่มการแสดงออกของ *IL-6* 7.48 เท่า (ภาพที่ 23) และวันที่ 14 กรดเบทูลินิก 10 และ 15 μM เพิ่มการแสดงออกของ *IL-6* 3.00 และ 45.03 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 24) และนอกจากนี้ ในวันที่ 7 กลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิก 15 μM มีการแสดงออกของ *Leptin* เพิ่มขึ้น 2.10 เท่า (ภาพที่ 23) ในขณะที่ วันที่ 14 กรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 และ 15 μM ส่งผลให้การแสดงออกของ *LEP-R* เพิ่มขึ้นเป็น 2.68 และ 2.71 เท่า (ภาพที่ 24) โดย *LEP-R* เป็น Hormone receptor ของ *Leptin* ทำให้ *Leptin* สามารถออกฤทธิ์ต่อสมองส่วน Hypothalamus เพื่อควบคุมความอยากอาหาร จากการศึกษาภาวะเบาหวานในหญิงตั้งครรภ์ พบว่าผู้ที่มีปริมาณ *LEP-R* สูง มีความเสี่ยงในการพบภาวะเบาหวานน้อยกว่าผู้ที่มีปริมาณ *LEP-R* ต่ำกว่า



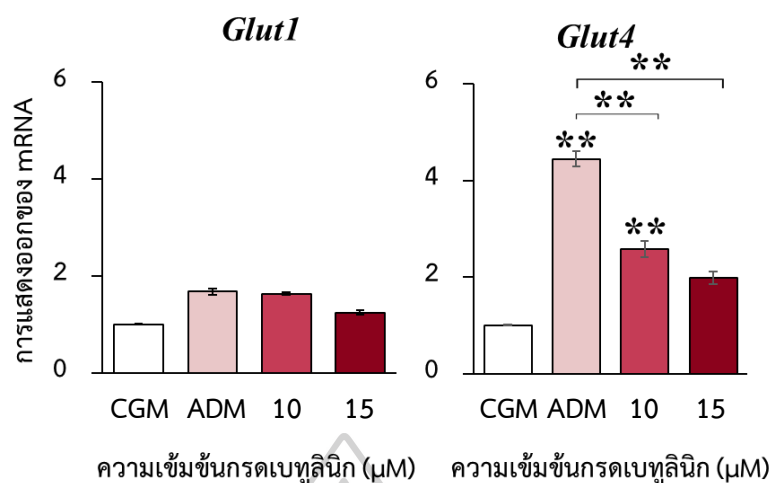
ภาพที่ 23 การแสดงออกของยีนกลุ่ม Adipokine ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 7 วัน (** $p < 0.01$)





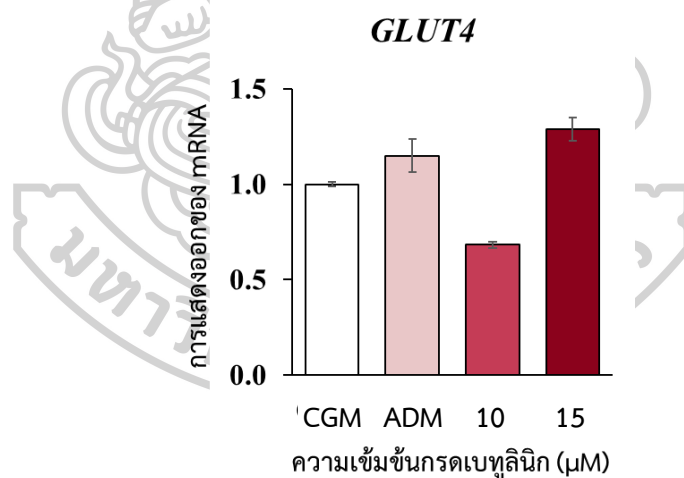
ภาพที่ 24 การแสดงออกระดับ mRNA ยีนในกลุ่ม Adipokine ของเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 14 วัน (* $p < 0.05$)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยทำการศึกษายีน *Glucose transporters 1 (GLUT1)* และ *Glucose transporters 4 (GLUT4)* พบว่า ที่วันที่ 7 มีการแสดงออกของยีน *GLUT4* เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่ชักนำให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่เซลล์เจริญ ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกยังมีการแสดงออกต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับกรดเบทูลินิกอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 การแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งกลูโคส ที่วันที่ 7 (** $p < 0.01$)

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ในวันที่ 14 พบว่าการแสดงออกของยีน *GLUT4* ในเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก มีการแสดงออกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 26)



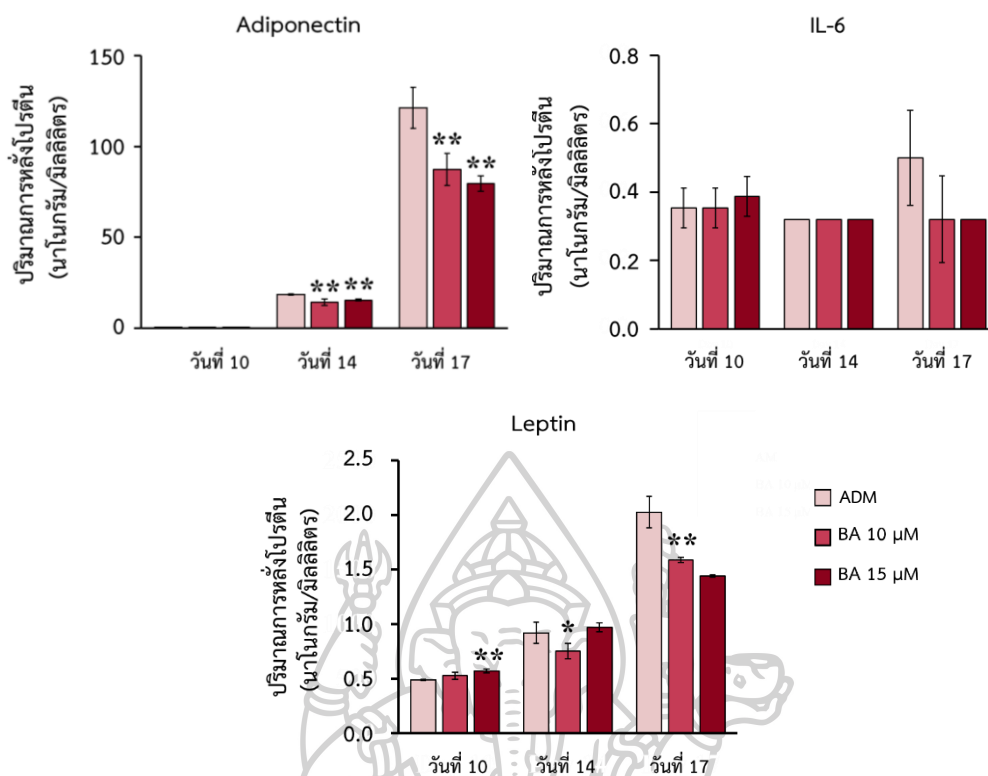
ภาพที่ 26 ยีนขนส่งกลูโคสแสดงออกลดลงในเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก ที่เลี้ยงในอาหาร ADM เป็นเวลา 14 วัน

การศึกษากการแสดงออกของยีนบ่งชี้ว่า กรดเบทูลินิกยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีขาว โดยยับยั้งการแสดงออกของ *C/EBP-α* และส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล ได้ส่งเสริมการแสดงออกของ *PGC-1α* และ *UCP-1* อีกทั้งเพิ่มการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนกระดูกในระยะท้ายอีกด้วย

5. ผลของกรดเบทูลินิกต่อการหลั่ง Adipokine ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน

การศึกษาการหลั่ง Adipokine เป็นการศึกษาเพื่อติดตามการแสดงออกของโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาปริมาณของ Adipokine 3 ชนิด ได้แก่ Adiponectin, IL-6, และ Leptin ซึ่งเป็น Adipokine ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ได้ทำการศึกษา โดยปริมาณ Adipokine ที่ได้เป็นปริมาณ Adipokine สะสมในอาหาร

การศึกษาการแสดงออกของยีนแสดงให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกไม่ส่งผลต่อแสดงออกของยีน Adiponectin ในขณะที่ผลการศึกษาการหลั่ง Adipokine พบว่ากรดเบทูลินิก 10 และ 15 μM ยับยั้งปริมาณการหลั่ง Adiponectin สะสมของเซลล์ hMSC ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร ADM โดยวันที่ 14 มีปริมาณ Adiponectin สะสมลดลงร้อยละ 24.04 และ 16.94 ตามลำดับ ในขณะที่วันที่ 17 ปริมาณ Adiponectin สะสมลดลงร้อยละ 28.04 และ 34.49 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (ภาพที่ 27) จากผลการศึกษาพบว่า วันที่ 10 เซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 15 μM มีปริมาณการหลั่ง Leptin สะสมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในขณะที่วันที่ 14 พบว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิก 10 μM มีปริมาณการหลั่ง Leptin สะสมลดลงร้อยละ 18.52 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และในวันที่ 17 พบว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 10 และ 15 μM มีปริมาณการหลั่ง Leptin สะสมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยลดลงร้อยละ 24.79 และ 30.49 ตามลำดับ ในขณะที่การหลั่ง IL-6 ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง เนื่องจากปริมาณการหลั่ง IL-6 ของเซลล์ที่ถูกเลี้ยง ADM มีปริมาณค่อนข้างต่ำใกล้เคียงค่าต่ำสุดในการตรวจวัด (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 ปริมาณการหลั่ง Adiponectin, IL-6, และ Leptin สะสมของเซลล์ UE7T-13 ที่เลี้ยงในอาหาร ADM ที่มี BetA ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)

จากผลการศึกษการหลั่ง Adipokine ของเซลล์ UE7T-13 ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร ADM ที่มีกรดเบทูลินิก พบว่ากลุ่มที่ได้รับกรดเบทูลินิกมีการหลั่ง Adipokine สะสมน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่ากรดเบทูลินิกสามารถยับยั้งการเจริญเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกของการศึกษาผลของกรดเบทูลินิก (BetA) ในเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ และยังเป็นครั้งแรกของการทำการศึกษาโดยใช้เซลล์ที่อยู่ในระยะเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์จำเพาะได้ทั้งเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมัน ผลการศึกษาพบว่ากรดเบทูลินิกส่งผลในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน และเพิ่มการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยไม่ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์

จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกสามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยพบว่ากรดเบทูลินิก มีค่า IC_{50} ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในเซลล์ HL-60 (มะเร็งเม็ดเลือดขาว) เท่ากับ $5.69 \mu\text{M}$ (Faujan et al., 2010), เซลล์ A549 (มะเร็งปอด) เท่ากับ $18.39 \mu\text{M}$ (Ahmad et al., 2010), และเซลล์ CAVO3 (มะเร็งรังไข่) เท่ากับ $20.58 \mu\text{M}$ (Ahmad et al., 2010) ในขณะที่กรดเบทูลินิก มีค่า IC_{50} ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในเซลล์ HDFC (เซลล์ผิวหนังของมนุษย์) และ PBL (เซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด) ซึ่งเป็นเซลล์ปกติของมนุษย์ มีค่าเท่ากับ $22.3 \mu\text{M}$ และ $>100 \mu\text{M}$ ตามลำดับ

นอกจากนี้การศึกษาความเป็นพิษของกรดเบทูลินิกทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง (MC3T3-E1) กรดเบทูลินิก $0-30 \mu\text{M}$ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ไม่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Choi et al., 2016) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ทำการศึกษาในเซลล์ชนิดเดียวกันที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากรดเบทูลินิก $0-30 \mu\text{M}$ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ไม่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์เช่นเดียวกัน (Lo et al., 2010) สอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ที่ทำการศึกษาในเซลล์ UE7T-13 พบว่ากรดเบทูลินิกมีค่า IC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมง มากกว่า $>50 \mu\text{M}$ จึงสรุปได้ว่ากรดเบทูลินิกมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และแสดงออกถึงความเป็นพิษต่ำกว่าเซลล์ปกติ และกล่าวได้ว่าเป็นสัญญาณที่ดีในการนำเอากรดเบทูลินิกมาประยุกต์ใช้ในมนุษย์ได้

เมื่อทำการศึกษาผลของกรดเบทูลินิก โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ปกติ ($5-20 \mu\text{M}$) ต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกหรือเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ในเซลล์ UE7T-13, การสะสมแร่ธาตุ, และการสะสมไขมันของเซลล์ พบว่ากรดเบทูลินิกเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายหมู่ฟอสเฟตในกระบวนการสะสมแคลเซียมซึ่งเป็นกิจกรรมบ่งชี้ลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก สอดคล้องกับการศึกษาผลของ

กรดเบทูลินิกต่อการสะสมแร่ธาตุของเซลล์ พบว่ากรดเบทูลินิกส่งเสริมการการสะสมแคลเซียมของเซลล์ทั้งในเชิงปริมาณเมื่อทำการวัดด้วยเทคนิค Calcium colorimetric assay และเชิงคุณภาพเมื่อย้อมสีด้วย Alizarin red สอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่ากรดเบทูลินิกเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ALP และการสะสมแคลเซียมในเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกของหนู (MC3T3-E1) เช่นกัน(Choi et al., 2016; Lo et al., 2010) และนอกจากนี้ยังพบอีกว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกความเข้มข้น 20 μM สามารถส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ALP ได้ แต่ไม่พบผลเชิงบวกต่อการสะสมแคลเซียมทั้งในเชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ ในขณะที่ กรดเบทูลินิกความเข้มข้น 5 -15 μM สามารถเพิ่มทั้งการทำงานของ ALP และการสะสมแคลเซียม โดยพบว่าความเข้มข้นที่แสดงผลดีที่สุดคือกรดเบทูลินิก 15 μM และรองลงมาคือ 10 μM

ในขณะที่กรดเบทูลินิกออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycerol 3-phosphate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสะสมหยดไขมันของเซลล์ และเมื่อทำการศึกษาการสะสมไขมันด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ Nile red และย้อมสี Oil-red O เพื่อดูคุณสมบัติของกรดเบทูลินิกต่อการสะสมไขมันเชิงคุณภาพ พบว่าเซลล์ UE7T-13 ที่ได้รับกรดเบทูลินิก นั้นมีการสะสมหยดไขมันภายในเซลล์ลดลงทั้งในแง่ของจำนวนหยดไขมันและขนาดของหยดไขมัน สอดคล้องกับการศึกษาผลการการทำงานของเอนไซม์ GPDH ซึ่งพบว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเบทูลินิกจะมีการทำงานของเอนไซม์ GPDH ลดลง เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาในหนูทดลอง โดยจากการศึกษาในเซลล์ 3T3-L1 พบว่ากรดเบทูลินิกลดการทำงานของ lipogenic enzymes และการสะสมหยดไขมันของเซลล์ Pre-adipocyte ของหนู (Brusotti et al., 2017; Kim & Go, 2017)

จากความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดของการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน และการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งมีเซลล์ต้นกำเนิดมาจากเซลล์ชนิดเดียวกัน คือ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Chamberlain et al., 2007; Jackson et al., 2012; James, 2013) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน จึงส่งผลในทางลบต่อกันและกัน งานวิจัยรายงานข่าวสารที่หลังจากเซลล์ไขมันยังส่งผลโดยตรงในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (Fazeli et al., 2013) ทั้งนี้ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งของ MSC นั้น มีปัจจัยหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง ไม่ว่าจะเป็นสารอาหารที่ร่างกายได้รับ สิ่งแวดล้อมจุลภาค รวมถึงการแสดงออกของยีน

C/EBP- α และ *PPAR γ* เป็นยีนที่เป็นตัวแปรหลักในการถอดรหัสในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยพบว่าการแสดงออกของ *C/EBP- α* และ *PPAR γ* จะชักนำให้ MSC เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันและชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน เช่น Adipsin, Leptin เป็นต้น (Farmer, 2006; Lowe et al., 2011) เมื่อเซลล์ขาด *PPAR γ* พบว่าการแสดงออกของ *C/EBP- α* ลดลงและในทำนองเดียวกันเมื่อ *C/EBP- α* ลดลงก็จะพบว่าแสดงออกของ *PPAR γ* ลดลงเช่นเดียวกัน ส่งผลให้กระบวนการ Adipogenesis ลดลงตามไปด้วย (Rosen et al., 2002) จากการศึกษาในครั้งนี้นับพบว่า ทั้งในสภาวะที่เซลล์เจริญและสภาวะที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน กรดเบทูลินิกออกฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน *C/EBP- α* สอดคล้องกับการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกต่อการทำงานของเอนไซม์ GPDH และการสะสมไขมันของเซลล์ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองในเซลล์ 3T3-L1 พบว่ากรดเบทูลินิกยับยั้งการแสดงออกของ *C/EBP* family transcription factor (Hollis et al., 2012) และ *PPAR γ* (Brusotti et al., 2017)

WNT เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงไปสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ โดย WNT/ β -catenin pathway กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่มีบทบาทในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *RUNX2* หรือ *CBFA-1* (Cai et al., 2016) ซึ่งเป็นตัวแปรหลักในการถอดรหัส ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก นอกจากนี้ WNT/ β -catenin pathway ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยยับยั้งการแสดงออกของ *C/EBP- α* และ *PPAR γ* (Kang et al., 2007; Kawai et al., 2007; Takada et al., 2007) และในขณะเดียวกันการแสดงออกของ *C/EBP- α* และ *PPAR γ* ที่เป็นตัวส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน จะส่งผลยับยั้งการแสดงออกของ *Wnt* และ β -catenin เช่นกัน (Akune et al., 2004; Kawaguchi et al., 2005) นอกจากนี้ *RUNX2* ซึ่งเป็นยีนสำคัญในการชักนำให้ MSC เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็น pre-osteoblast อีกทั้งยังส่งผลยับยั้งการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยจากการศึกษาในเซลล์ Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) พบว่าการแสดงออกของ *RUNX2* ชักนำให้ ADSCs เกิดการเปลี่ยนแปลงไปสภาพเป็นเซลล์สร้างกระดูก และส่งเสริมเกิดการสะสมแคลเซียม ในขณะที่ขัดขวางการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยยับยั้งการแสดงออกของ *PPAR γ -2* (Zhao et al., 2009) ในทางตรงกันข้าม *PPAR γ* จากเซลล์ไขมันยับยั้งการแสดงออกของ *RUNX2* และการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกเช่นกัน โดยจากการศึกษาในหนูทดลองพบว่าการลดลงของ *PPAR γ* ทำให้เกิดการเพิ่ม

ของกระดูกอย่างมีนัยสำคัญ (Akune et al., 2004; Kawaguchi et al., 2005; Lecka-Czernik et al., 2002) และนอกจากนี้ *PPAR γ* ยังสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ Osteoclastes ซึ่งทำหน้าที่สลายกระดูกอีกด้วย (Wan et al., 2007; Wei et al., 2010)

การศึกษาการแสดงออกของยีนใน hMSC ในงานวิจัยนี้พบว่าในอาหารที่ชักนำให้เซลล์เจริญกลุ่มทดลองที่ได้รับกรดเทลูนิคไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก ในขณะที่การแสดงออกของยีน *C/EBP- α* ลดลง จะส่งผลให้เกิดการลดการแสดงออกของ Marker อื่นๆ เช่น Adipsin ซึ่งเป็นยีนที่แปรผันตรงกับ *C/EBP- α* กล่าวคือ เมื่อ *C/EBP- α* แสดงออกลดลง การแสดงออกของ Adipsin ก็ลดลงตามไปด้วย (Chen et al., 2000) Adipsin เป็น peptide hormones ที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการสะสมไขมัน ดังนั้นเมื่อการแสดงออกของ Adipsin ลดลงจึงส่งผลให้การสะสมไขมันในเซลล์ก็จะลดลงตามไปด้วย (Song et al., 2016) ทั้งนี้ผลการศึกษาในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์พบว่ากรดเทลูนิคลดการแสดงออกของยีน Adipsin อย่างชัดเจนจึงส่งผลให้การสะสมไขมันในเซลล์ลดลง

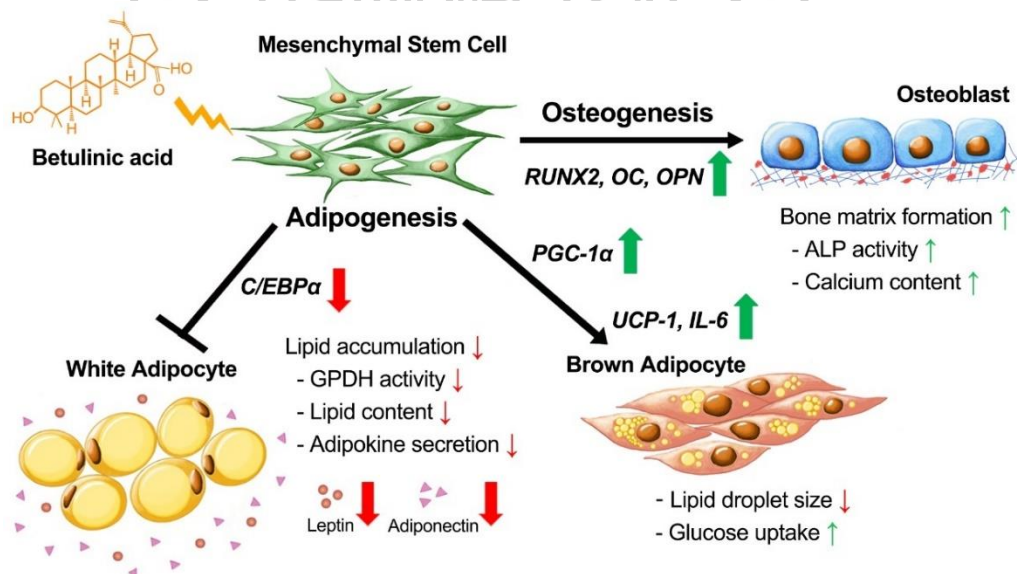
อีกประเด็นที่น่าสนใจคือกรดเทลูนิคเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับไขมันสีน้ำตาล โดยพบว่ามีแสดงออกของยีน *PGC-1 α* และ *UCP-1* เพิ่มขึ้น ซึ่ง *PGC-1 α* เป็นยีนที่มักจะใช้ในการบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล โดยเซลล์ไขมันสีน้ำตาลเป็นเซลล์ไขมันที่มีบทบาทเกี่ยวกับการเผาผลาญไขมัน ซึ่งตรงกันข้ามกับเซลล์ไขมันสีขาวจะเป็นเซลล์ไขมันที่มีบทบาทในการเก็บสะสมไขมัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้จะพบว่าเมื่อ *PGC-1 α* เพิ่มขึ้นจะพบไขมันสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเช่นกัน (Castillo-Quan, 2012) และนอกจากนี้การขาด *PGC-1 α* ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการสร้างกระดูก และเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น (Yu et al., 2018) และการเพิ่มขึ้นของ *UCP-1* ทำให้เกิดการย่อยสลายไขมันและทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของ *UCP-1* นั้นมีผลมาจากการเพิ่มขึ้นของ *PGC-1 α* (Bertholet et al., 2017; Fedorenko et al., 2012; Ricquier & Bouillaud, 2000) ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงการเพิ่มขึ้นของยีน *PGC-1 α* และ *UCP-1* ประกอบกับผลการศึกษานาฬิกาของไขมัน ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ได้รับกรดเทลูนิคมีขนาดของเซลล์ไขมันเล็กลง ซึ่งเป็นหนึ่งในลักษณะบ่งชี้ของเซลล์ไขมันสีน้ำตาล จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่ากรดเทลูนิคสามารถส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาลของเซลล์ hMSC ได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่กรดเทลูนิคจะชักนำให้เกิดการใช้พลังงานมากกว่าการสะสมพลังงาน โดยจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเนื้อเยื่อไขมันสีน้ำตาลกับค่า BMI พบว่าผู้ที่มีค่า BMI สูงจะมีร้อยละของเนื้อเยื่อไขมันสีน้ำตาลน้อยกว่าผู้ที่มีค่า BMI ต่ำ (Cypess et al., 2009)

เซลล์ไขมันนอกจากทำหน้าที่ในการสะสมไขมัน ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนและ Adipokine โดยปริมาณ Adipokine ที่หลั่งจากเซลล์ไขมันเหล่านี้เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่สามารถบ่งชี้ถึงปริมาณไขมันได้ โดยจากการศึกษาพบว่าในหนูที่ป่วยเป็นโรคอ้วนจะมีการหลั่ง Leptin สูงกว่าหนูปกติ (Frederich et al., 1995; Maffei et al., 1995) Adiponectin เป็น Adipokine ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ไขมัน มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเผาผลาญพลังงาน โดย Adiponectin ถูกชักนำให้แสดงออกโดย *PPAR γ* ดังนั้นเมื่อการแสดงออกของ *PPAR γ* สูงขึ้น จึงพบการแสดงออกของ Adiponectin สูงขึ้นไปในทิศทางเดียวกัน (Maeda et al., 2001) กรดเบทูลินิกออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง Adiponectin และ Leptin ลดลง โดยทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของ *PPAR γ* ส่งผลให้การแสดงออกของยีน Adiponectin และ Leptin ลดลง และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน สอดคล้องกับผลการศึกษาในสัตว์ทดลองที่แสดงให้เห็นว่ากรดเบทูลินิกลดการหลั่ง Adiponectin และ Leptin ในหนู (Ahangarpour et al., 2018) ในขณะที่ IL-6 ซึ่งถูกจัดเป็น Brown adipokine มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระดับน้ำตาลและการตอบสนองต่ออินซูลิน โดยจากการศึกษาในหนูที่ขาดยีน IL-6 จะสูญเสียความสมดุลของระบบการเผาผลาญ (Stanford et al., 2012) จากการศึกษาใน hMSC พบว่า IL-6 ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน (Pricola et al., 2009) นอกจากนี้ IL-6 มีการแสดงออกลดลงในระหว่างที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น (Song et al., 2006) ผลการศึกษาในเซลล์ Human adipose-derived mesenchymal stem cells พบว่าในระหว่างที่เซลล์เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน จะมีการหลั่ง IL-6 สูงขึ้นในเซลล์ที่เกิดการ Browning และการเพิ่มขึ้นของ IL-6 ยังเพิ่มการแสดงออกของ *PGC-1 α* และ *UCP-1* อีกด้วย (Kristóf et al., 2019) จากผลการศึกษาโดยทำการเลี้ยงเซลล์ hMSC ในอาหารที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน พบว่ากรดเบทูลินิก ชักนำให้การแสดงออกของยีน *IL-6* สูงกว่าในกลุ่มควบคุม ในขณะที่ปริมาณการหลั่ง IL-6 ไม่พบความแตกต่างของระหว่างกลุ่มทดลอง เนื่องจากปริมาณที่ตรวจวัดได้มีปริมาณต่ำกว่าค่าที่ตรวจวัดได้ของเทคนิค MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel kit

Leptin-receptor เป็น Hormone receptor ของ Leptin โดยเมื่อ LEP-R จับกับ Leptin จะออกฤทธิ์ต่อ Hypothalamus ควบคุมความอยากอาหาร และออกฤทธิ์ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก แต่เมื่อ LEP-R ไม่ได้จับกับ Leptin จะส่งผลในทางตรงกันข้ามคือ ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน (Yue et al., 2016) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าในสภาวะที่กระดูกหัก ในระยะของการ

ซ่อมแซมกระดูกพบการแสดงออกของ *LEP-R* เพิ่มขึ้น (Zhou et al., 2014) และจากการศึกษาในทางคลินิก พบว่าในหญิงตั้งครรภ์ที่มีปริมาณ *LEP-R* ต่ำมีความเสี่ยงในการพบภาวะเบาหวานมากกว่าหญิงตั้งครรภ์ที่มี *LEP-R* สูง (Sommer et al., 2016; Yue et al., 2016) เนื่องจากการขาด *LEP-R* จะส่งผลให้ Leptin ในเลือดสูงขึ้น และสามารถชักนำให้เกิดโรคอ้วนตามมา (Considine et al., 1996) สอดคล้องกับการศึกษาผลของกรดเบทูลินิกในเซลล์ hMSC พบว่าในวันที่ 14 กรดเบทูลินิกชักนำให้เกิดการแสดงออกของ *LEP-R* สูงขึ้น

จึงสามารถสรุปได้ว่ากรดเบทูลินิกส่งผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันที่มีบทบาทในการสะสมไขมัน และเพิ่มการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมันสีน้ำตาล ซึ่งบ่งชี้ถึงการใช้พลังงานของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยส่งเสริมการแสดงออกของยีน *PGC-1 α* และ *UCP-1* ซึ่งการเพิ่มปริมาณเซลล์ไขมันสีน้ำตาลเป็นแนวทางที่กำลังเป็นที่สนใจในการรักษาโรคอ้วน และโรคเบาหวาน และในขณะเดียวกันกรดเบทูลินิกส่งผลในทางบวกต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ โดยกีดการทำงานของ *C/EBP- α* และ *PPAR γ -2* ส่งผลให้ *WNT/ β -catenin pathway* ทำงานได้ดีขึ้นส่งเสริมให้การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ดี (ภาพที่ 28) จึงมีความเป็นไปได้ที่สามารถนำเอากรดเบทูลินิกมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่มีผลมาจากภาวะการขาดความสมดุลของเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน รวมถึงการเพิ่มการใช้พลังงานในเซลล์อีกด้วย



ภาพที่ 28 ผลของกรดเบทูลินิกต่อกลไกการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ไขมันของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโดยละเอียด

เทคนิค Alamarblue Cell Viability Assay

1. เลี้ยงเซลล์ ใน 96-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ CGM ปริมาตร 200 μ l บ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ บรรยากาศ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C
2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS 200 μ l/หลุม 2 ครั้ง
3. เติม CGM+10% alamarBlue ปริมาตร 100 μ l/หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ป้องกันไม่ให้โดนแสง
4. ดูดสารละลาย ใส่ 96-well plate ใหม่ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงทันที ที่ความยาวคลื่นแสง 570 และ 600 nm โดยให้ CGM+10% alamarBlue ปริมาตร 100 μ l/หลุม เป็น Blank
5. ล้างเซลล์ด้วย PBS 200 μ l/หลุม 2 ครั้ง เติมอาหารนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อ

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$\% \text{ reduced} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(N_1 \times P_2) - (N_2 \times P_1)} \times 100$$

- O₁ = molar extinction coefficient (E) of oxidized alamarBlue® (Blue) ที่ความยาวคลื่น 570 nm = 80586
- O₂ = E of oxidized alamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 600 nm = 117216
- N₁ = E ของ reduced alamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 570 nm = 155677
- N₂ = E ของ reduced alamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 600 nm = 14652
- A₁ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม test wells ที่ความยาวคลื่น 570 nm
- A₂ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม test wells ที่ความยาวคลื่น 600 nm
- P₁ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม blank (positive control well) ที่ความยาวคลื่น 570 nm
- P₂ = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม blank (positive control well) ที่ความยาวคลื่น 600 nm

สารเคมีที่ใช้

- alamarBlue™ Cell Viability Reagent (Fisher # DAL1025)

เทคนิค Alkaline phosphatase (ALP) activity

1. เลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ODM ปริมาตร 200 μ l บ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ บรรยากาศ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-10 วัน แล้วแต่การวางแผนการทดลอง
2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และล้างด้วย PBS 200 μ l/well 2 ครั้ง
3. เติม lysis buffer หลุมละ 100 μ l นำ plate ไปแช่แข็งที่ อุณหภูมิ -20 °C (frozen-thawed 3 รอบ)
4. วาง plate ที่อุณหภูมิห้อง ให้สารละลาย พร้อมอุ่น Working solution ที่อุณหภูมิห้อง
5. เปิดเครื่อง microplate reader (BIO-RAD) ตั้งค่าอุณหภูมิ 37 °C รอจนอุณหภูมิถึงค่าที่ตั้งไว้ ในระหว่างรอตั้งโปรแกรมให้วัดค่าที่ 405 nm ทุกๆ 5 นาที (kinetics) จำนวน 6 ครั้ง โดยเขย่าเป็นเวลา 5-10 วินาทีก่อนการวัดค่าแต่ละครั้ง
6. เติม Working solution หลุมละ 100 μ l
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 nm ทุก 5 นาที จนครบ 30 นาที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงนำมาคำนวณตั้งสูตรด้านล่าง อาจ normalized ค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{(\Delta A_s - \Delta A_o) \times V_a(\text{ml}) \times df}{18.2 \times V_s(\text{ml})} = \Delta A \times 3.30 \times df$$

A_s ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

A_o A_s ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

V_a ปริมาณสารทั้งหมด (ml)

V_s ปริมาณสารตัวอย่าง (ml)

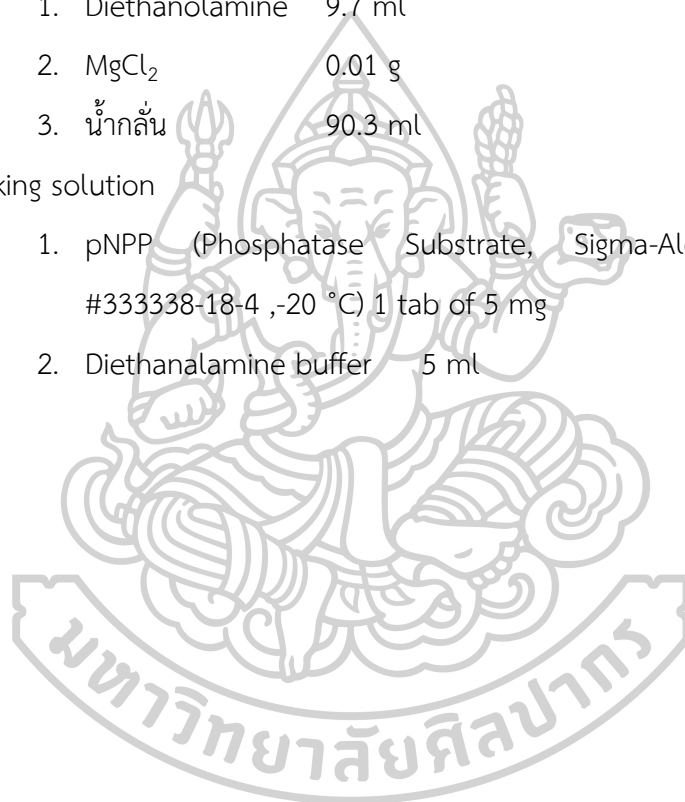
18.2: Millimolar extinction coefficient of pNPP under the assay conditions

(cm²/μmol)

df: Dilution factor

สารเคมีที่ใช้

- Lysis buffer
 - 0.1 % Triton-X 100
 - 1 mM $MgCl_2$
 - 0.1 mM $ZnCl_2$
 - น้ำกลั่น 100 ml
- Diethanolamine buffer (pH 11-12 ปรับด้วย 1M HCl)
 1. Diethanolamine 9.7 ml
 2. $MgCl_2$ 0.01 g
 3. น้ำกลั่น 90.3 ml
- Working solution
 1. pNPP (Phosphatase Substrate, Sigma-Aldrich S0942-50tab, #333338-18-4, -20 °C) 1 tab of 5 mg
 2. Diethanolamine buffer 5 ml



เทคนิค Bicinchoninic acid assay (protein assay)

1. เลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 200 μ l บ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ บรรยากาศ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3-10 วัน แล้วแต่การวางแผนการทดลอง
2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และล้างด้วย PBS 200 μ l/well 2 ครั้ง
3. ทำให้เซลล์แตกโดยเติม 100 μ l RIPA Buffer ลงในแต่ละหลุม นำ plate ไปแช่แข็งที่ อุณหภูมิ -20 °C (แช่แข็ง และทำให้ละลาย 3 รอบ)
4. เติม BCA Reagent 100 μ l/well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 570 nm
5. คำนวณปริมาณโปรตีนด้วย Standard curve

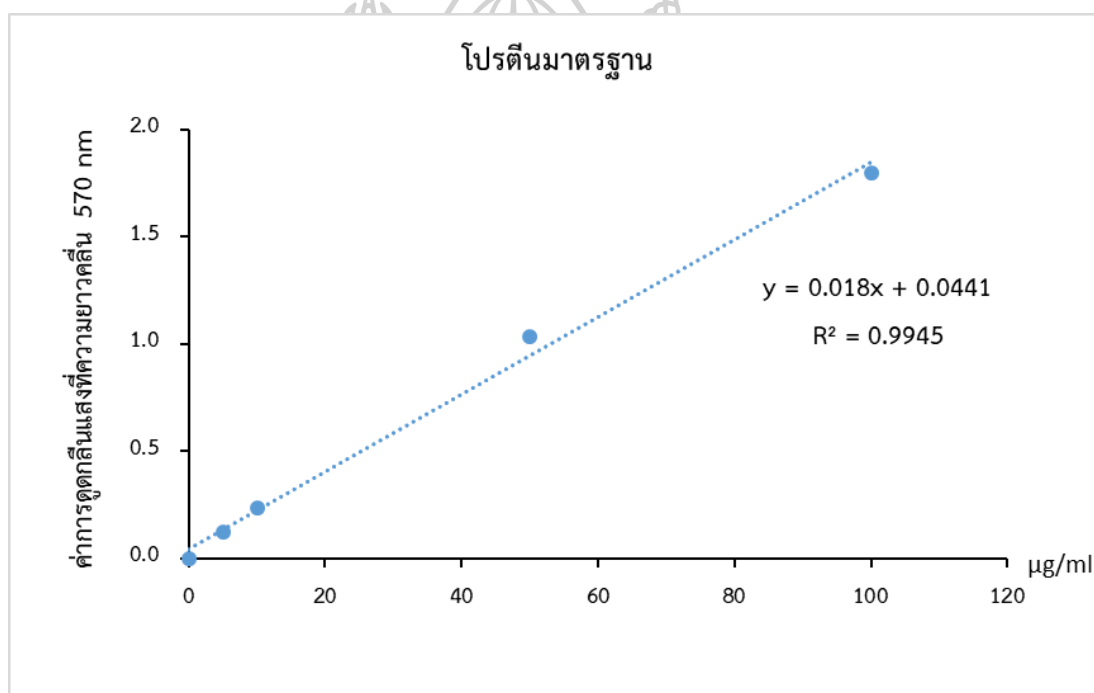
สารที่ใช้

1. RIPA Buffer
2. BCA
 - a. สาร A: Na₂CO₃ · H₂O (0.8 g), NaOH (1.6 g), sodium tartrate (dihydrate) (1.6 g), แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 mL แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 1.25 ด้วย 10 M NaOH เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
 - b. สาร B: BCA (1 g) ในน้ำ 25 mL (Bicinchoninic acid disodium salt hydrate, CAS Number 979-88-4 (anhydrous), SIGMA-ALDRICH D8284-1G) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
 - c. สาร C: CuSO₄ · 5H₂O (0.4 g) in 10 mL of water
3. การเตรียม BCA working solution ผสม 1 ส่วนของสาร C เข้ากับ 25 ส่วนของสาร B จากนั้น เติม 26 ส่วนของสาร A.

หมายเหตุ: สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้ในช่วง 10 -100 μ g

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของโปรตีนมาตรฐาน

ความเข้มข้น µg/ml	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm					ค่า S.D.
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย	
0	0.0085	-0.0155	-0.0155	0.0445	0	0.0284
5	0.1345	0.0965	0.0975	0.1515	0.1200	0.0275
10	0.2825	0.2255	0.2285	0.2115	0.2370	0.0312
50	1.0435	1.0545	1.0065	1.0375	1.0355	0.0206
100	1.8255	1.7765	1.7795	1.8075	1.7973	0.0234



ภาพที่ 29 กราฟโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

เทคนิค Calcium colorimetric assay

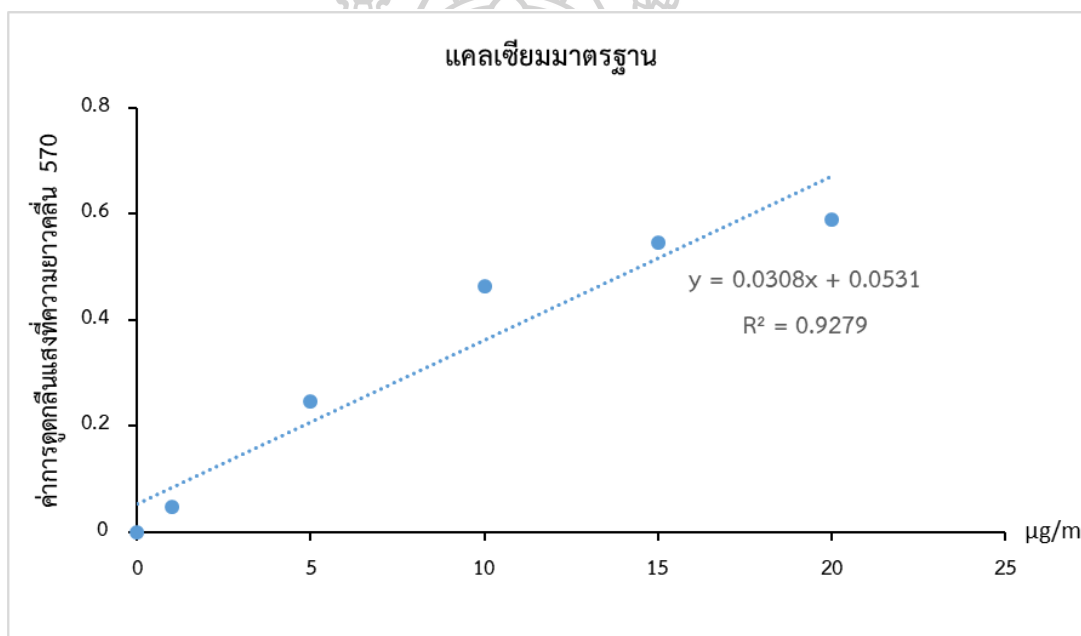
1. เลี้ยงเซลล์ จำนวน 2×10^4 cell/well ด้วยอาหาร ODM ที่ อุณหภูมิ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$ ในภาชนะ 24-well plates เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน
2. เมื่อครบ 10 และ 14 วัน ดูดสารละลายให้หลุมทิ้ง ล้างด้วย DPBS $500 \mu\text{l/well}$ 2 ครั้ง
3. เติม 0.1 M HCl $250 \mu\text{l}$ นำ ขูดเซลล์ด้วย Trip แล้วดูดสารละลาย ใส่ microfuge tube
4. เติม 0.1 M HCl $250 \mu\text{l}$ ลงใน well เพื่อล้างเซลล์ที่เหลือ แล้วดูดสารละลายใส่ใน microfuge tube
5. นำ microfuge tube เก็บที่ อุณหภูมิ -20°C (ไม่เกิน 1 เดือน)
6. เมื่อ Thaw cell ออกมา สกัดแคลเซียมโดยเขย่าหลอด 3-20 ชั่วโมง อุณหภูมิ 4°C
7. นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ $500 \times g$ 2 นาที
8. ดูดสารละลายด้านบน $10 \mu\text{l}$ มาผสมกับ Chromogenic reagent $190 \mu\text{l}$ ใน 96-well plates
9. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm
10. วัดปริมาณแคลเซียมด้วย Standard Curve

สารเคมีที่ใช้

- 0.1 M HCl
- DPBS (PBS without Calcium or magnesium)
- Chromogenic reagent
 - สาร A (Buffer) (pH 11-12 ปรับด้วย 1 M HCl)
 1. Diethanalamine 9.7 ml
 2. น้ำ DI 40.3 ml
 - สาร B (สี)
 1. o-cresolphthalein complexone 12.8 mg
 2. 8-Hydroxyquinoline 232 mg
 3. Absolute ethanol 50 ml
 4. น้ำ DI 150 ml

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของแคลเซียมมาตรฐาน

ความเข้มข้น µg/ml	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm					ค่า S.D.
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย	
0	0.0065	-0.0225	-0.0135	0.0295	0.0000	0.0231
1	0.0475	0.0305	0.0565	0.0545	0.0473	0.0118
5	0.2595	0.2375	0.2335	0.2575	0.2470	0.0134
10	0.4675	0.4575	0.4985	0.4275	0.4628	0.0293
15	0.5435	0.5465	0.6015	0.4905	0.5455	0.0453
20	0.6185	0.5935	0.5945	0.5485	0.5888	0.0292



ภาพที่ 30 กราฟแคลเซียมมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณแคลเซียมในตัวอย่าง

เทคนิค Alizarin red assay

1. เลี้ยงเซลล์ จำนวน 1×10^4 cell/well ด้วยอาหาร ODM ที่ อุณหภูมิ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$ ในภาชนะ 48-well plates เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน
2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS $500 \mu\text{l}$ 2 รอบ
3. Fixed cell ด้วย 4% paraformaldehyde $500 \mu\text{l}$ บ่มทิ้งไว้ 20 นาที
4. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น $500 \mu\text{l}$ 2 ครั้ง
5. ย้อมเซลล์ด้วย 2% Alizarin red $200 \mu\text{l}$ ทิ้งไว้ 30 นาที
6. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น $500 \mu\text{l}$ 2 ครั้ง
7. บันทึกภาพเซลล์ที่ได้

สารเคมีที่ใช้

- 4% paraformaldehyde
- 2% Alizarin red
- น้ำ DI



เทคนิค GPDH activity assay

1. เลี้ยงเซลล์ จำนวน 5×10^3 cell/well ด้วยอาหาร ODM ที่ อุณหภูมิ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$ ในภาชนะ 96-well plates เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน
2. เมื่อครบ 10 และ 14 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS $200 \mu\text{l}$ 2 รอบ
3. เติม Homogenization Solution (cool) $100 \mu\text{l}$ นำไปเก็บที่ -20°C (Freeze-Throw 3 cycle)
4. เติม Enzyme reaction $90 \mu\text{l}$ บ่มไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C
5. เติม $10 \mu\text{l}$ DHAP นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 340nm ด้วย Microplate reader
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่นแสง 340nm ทุก 5 นาที จนครบ 30 นาที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงนำมาคำนวณตั้งสูตรด้านล่าง Normalized ค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

คำนวณ

$$GPDH (u/ml) = \frac{\Delta A_{340} / \text{min} \times 100 \mu\text{l}}{6.22 \times 10 \mu\text{l}} \times \text{sample dilution}$$

สารเคมีที่ใช้

- Homogenization Solution (100 ml, 4°C)
 - Tris (20 mM) 2.24 g
 - EDTA (1 mM) 0.029 g
 - β -mercapthanol (1 mM) 2 ml (50 mM β -mercapthanol)
- Enzyme reaction buffer (100 ml, 4°C)
 - Thiethanolamine (0.1M) 1.20 ml
 - EDTA (2.5 mM) 0.073 g
 - β -mercapthanol (0.1 mM) $200 \mu\text{l}$ (50 mM β -mercapthanol)
 - NADH (334 μM) $240 \mu\text{l}$ (100 mg/ml)
(เติมเมื่อใช้ $24 \mu\text{l}/10 \text{ml}$)
- DHAP (4 mM) 5 mg ใน dH_2O (-20°C)

เทคนิค Nile red staining

1. เลี้ยงเซลล์ จำนวน 1×10^4 cell/well ด้วยอาหาร ADM ที่ อุณหภูมิ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$ ในภาชนะ 48-well plates เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน
2. เมื่อครบ 21 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS $500 \mu\text{l}$ 2 รอบ
3. Fixed เซลล์ด้วย $4\% \text{formaldehyde}$ $300 \mu\text{l}$ ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS $500 \mu\text{l}$
5. ย้อมด้วยสีย้อม Nile Red $10 \mu\text{g/ml}$ สารละลายอยู่ใน DMEM ที่ไม่มี Phenol red ที่อุณหภูมิห้อง บ่ม 20 นาที ในที่มืด $300 \mu\text{l}$
6. ล้างด้วย PBS $500 \mu\text{l}$ 2 จากนั้นเติม DMEM $500 \mu\text{l}$ ถ่ายรูปได้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ความยาวคลื่นแสง 495nm (Aldridge et al., 2013; Jaiswal et al., 2000; Ranall et al., 2011)

สารเคมีที่ใช้

- Nile Red ขนาด $10 \mu\text{g/ml}$ ในอาหาร DMEM ที่ไม่มี Phenol red
ละลาย Nile Red 10mg (sigma, 7385-67-3) ใน Acetone, Methanol 10ml
(Stock solution 1mg/ml) เก็บที่ -20°C (Jaiswal et al., 2000)



เทคนิคการย้อมสี Oil-red O

1. เลี้ยงเซลล์ จำนวน 5×10^3 cell/well ด้วยอาหาร ODM ที่ อุณหภูมิ 37°C และ $5\% \text{CO}_2$ ในภาชนะ 96-well plates เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน
2. เมื่อครบ 21 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS $200 \mu\text{l}$ 2 รอบ
3. Fixed เซลล์ด้วย $4\% \text{formaldehyde}$ $100 \mu\text{l}$ ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น
5. เติม $60\% \text{isopropanol}$ $100 \mu\text{l}$ ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. ย้อมเซลล์ด้วย Oil red O/ $60\% \text{isopropanol}$ $100 \mu\text{l}$ ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
7. ล้างเซลล์ ด้วยน้ำกลั่น $100 \mu\text{l}$ 2-5 ครั้ง
8. บันทึกภาพเซลล์ที่ได้
9. เติม $100\% \text{isopropanol}$ $100 \mu\text{l}$ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 540nm

สารเคมีที่ใช้

- $4\% \text{formaldehyde}$
- Isopropanol
- Oil red O 3mg



ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อหาค่า IC-50 ของกรดเบทูลินิกต่อเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(I) Concentration	(J) Concentration	Mean			95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
CGM	Bet A 10 μ M	2.29737	6.56954	.996	-19.3235	23.9183
	Bet A 20 μ M	5.35791	6.56954	.920	-16.2630	26.9788
	Bet A 30 μ M	3.39321	6.56954	.984	-18.2277	25.0141
	Bet A 40 μ M	4.79042	6.56954	.945	-16.8305	26.4113
	Bet A 50 μ M	-2.29737	6.56954	.996	-23.9183	19.3235
Bet A 10 μ M	CGM	3.06055	6.56954	.989	-18.5603	24.6814
	Bet A 20 μ M	1.09585	6.56954	1.000	-20.5250	22.7167
	Bet A 30 μ M	2.49305	6.56954	.995	-19.1278	24.1139
	Bet A 40 μ M	-5.35791	6.56954	.920	-26.9788	16.2630
	Bet A 50 μ M	-3.06055	6.56954	.989	-24.6814	18.5603
Bet A 20 μ M	CGM	-1.96470	6.56954	.998	-23.5856	19.6562
	Bet A 10 μ M	-.56749	6.56954	1.000	-22.1884	21.0534
	Bet A 30 μ M	-3.39321	6.56954	.984	-25.0141	18.2277
	Bet A 40 μ M	-1.09585	6.56954	1.000	-22.7167	20.5250
	Bet A 50 μ M	1.96470	6.56954	.998	-19.6562	23.5856
Bet A 30 μ M	CGM	1.39721	6.56954	.999	-20.2237	23.0181
	Bet A 10 μ M	-4.79042	6.56954	.945	-26.4113	16.8305
	Bet A 20 μ M	-2.49305	6.56954	.995	-24.1139	19.1278
	Bet A 40 μ M	.56749	6.56954	1.000	-21.0534	22.1884
	Bet A 50 μ M	-1.39721	6.56954	.999	-23.0181	20.2237
Bet A 40 μ M	CGM	2.29737	6.56954	.996	-19.3235	23.9183
	Bet A 10 μ M	5.35791	6.56954	.920	-16.2630	26.9788
	Bet A 20 μ M	3.39321	6.56954	.984	-18.2277	25.0141
	Bet A 30 μ M	4.79042	6.56954	.945	-16.8305	26.4113
	Bet A 50 μ M	-2.29737	6.56954	.996	-23.9183	19.3235

(I) Concentration	(J) Concentration	Mean			95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
Bet A 50 μ M	CGM	3.06055	6.56954	.989	-18.5603	24.6814
	Bet A 10 μ M	1.09585	6.56954	1.000	-20.5250	22.7167
	Bet A 20 μ M	2.49305	6.56954	.995	-19.1278	24.1139
	Bet A 30 μ M	-5.35791	6.56954	.920	-26.9788	16.2630
	Bet A 40 μ M	-3.06055	6.56954	.989	-24.6814	18.5603

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่ได้รับ BetA 3 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean			95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
ODM	BetA 5 μ M	3.94903	2.47791	.532	-4.2060	12.1040
	BetA 10 μ M	3.69648	2.47791	.589	-4.4585	11.8515
	BetA 15 μ M	-7.49627	2.47791	.075	-15.6513	.6587
	BetA 20 μ M	-.74044	2.47791	.998	-8.8955	7.4146
BetA 5 μ M	Contorl	-3.94903	2.47791	.532	-12.1040	4.2060
	BetA 10 μ M	-.25255	2.47791	1.000	-8.4076	7.9025
	BetA 15 μ M	-11.44530*	2.47791	.007	-19.6003	-3.2903
	BetA 20 μ M	-4.68947	2.47791	.379	-12.8445	3.4655
BetA 10 μ M	Contorl	-3.69648	2.47791	.589	-11.8515	4.4585
	BetA 5 μ M	.25255	2.47791	1.000	-7.9025	8.4076
	BetA 15 μ M	-11.19274*	2.47791	.008	-19.3478	-3.0377
	BetA 20 μ M	-4.43692	2.47791	.429	-12.5919	3.7181
BetA 15 μ M	Contorl	7.49627	2.47791	.075	-.6587	15.6513
	BetA 5 μ M	11.44530*	2.47791	.007	3.2903	19.6003
	BetA 10 μ M	11.19274*	2.47791	.008	3.0377	19.3478
	BetA 20 μ M	6.75583	2.47791	.119	-1.3992	14.9108
BetA 20 μ M	Contorl	.74044	2.47791	.998	-7.4146	8.8955
	BetA 5 μ M	4.68947	2.47791	.379	-3.4655	12.8445
	BetA 10 μ M	4.43692	2.47791	.429	-3.7181	12.5919
	BetA 15 μ M	-6.75583	2.47791	.119	-14.9108	1.3992

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 7 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับ BetA 3 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ODM	BetA 5 uM	3.94903	2.47791	.532	-4.2060	12.1040
	BetA 10 uM	3.69648	2.47791	.589	-4.4585	11.8515
	BetA 15 uM	-7.49627	2.47791	.075	-15.6513	.6587
	BetA 20 uM	-.74044	2.47791	.998	-8.8955	7.4146
BetA 5 uM	Contorl	-3.94903	2.47791	.532	-12.1040	4.2060
	BetA 10 uM	-.25255	2.47791	1.000	-8.4076	7.9025
	BetA 15 uM	-11.44530*	2.47791	.007	-19.6003	-3.2903
	BetA 20 uM	-4.68947	2.47791	.379	-12.8445	3.4655
BetA 10 uM	Contorl	-3.69648	2.47791	.589	-11.8515	4.4585
	BetA 5 uM	.25255	2.47791	1.000	-7.9025	8.4076
	BetA 15 uM	-11.19274*	2.47791	.008	-19.3478	-3.0377
	BetA 20 uM	-4.43692	2.47791	.429	-12.5919	3.7181
BetA 15 uM	Contorl	7.49627	2.47791	.075	-.6587	15.6513
	BetA 5 uM	11.44530*	2.47791	.007	3.2903	19.6003
	BetA 10 uM	11.19274*	2.47791	.008	3.0377	19.3478
	BetA 20 uM	6.75583	2.47791	.119	-1.3992	14.9108
BetA 20 uM	Contorl	.74044	2.47791	.998	-7.4146	8.8955
	BetA 5 uM	4.68947	2.47791	.379	-3.4655	12.8445
	BetA 10 uM	4.43692	2.47791	.429	-3.7181	12.5919
	BetA 15 uM	-6.75583	2.47791	.119	-14.9108	1.3992

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 8 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่ได้รับ BetA 3 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	4.75795	5.27610	.890	-12.6061	22.1220
	BetA 10 uM	-1.32297	5.27610	.999	-18.6870	16.0411
	BetA 15 uM	-.93735	5.27610	1.000	-18.3014	16.4267
	BetA 20 uM	-8.69127	5.27610	.503	-26.0553	8.6728
BetA 5 uM	ADM	-4.75795	5.27610	.890	-22.1220	12.6061
	BetA 10 uM	-6.08092	5.27610	.777	-23.4450	11.2831
	BetA 15 uM	-5.69530	5.27610	.813	-23.0594	11.6688
	BetA 20 uM	-13.44922	5.27610	.155	-30.8133	3.9149
BetA 10 uM	ADM	1.32297	5.27610	.999	-16.0411	18.6870
	BetA 5 uM	6.08092	5.27610	.777	-11.2831	23.4450
	BetA 15 uM	.38562	5.27610	1.000	-16.9784	17.7497
	BetA 20 uM	-7.36830	5.27610	.643	-24.7324	9.9958
BetA 15 uM	ADM	.93735	5.27610	1.000	-16.4267	18.3014
	BetA 5 uM	5.69530	5.27610	.813	-11.6688	23.0594
	BetA 10 uM	-.38562	5.27610	1.000	-17.7497	16.9784
	BetA 20 uM	-7.75392	5.27610	.602	-25.1180	9.6102
BetA 20 uM	ADM	8.69127	5.27610	.503	-8.6728	26.0553
	BetA 5 uM	13.44922	5.27610	.155	-3.9149	30.8133
	BetA 10 uM	7.36830	5.27610	.643	-9.9958	24.7324
	BetA 15 uM	7.75392	5.27610	.602	-9.6102	25.1180

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่ได้รับ BetA 7 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CGM	BetA 5 uM	15.16823	8.41122	.422	-12.5138	42.8502
	BetA 10 uM	5.01079	8.41122	.973	-22.6712	32.6928
	BetA 15 uM	-5.58619	8.41122	.960	-33.2682	22.0958
	BetA 20 uM	-4.37545	8.41122	.983	-32.0575	23.3066
BetA 5 uM	CGM	-15.16823	8.41122	.422	-42.8502	12.5138
	BetA 10 uM	-10.15744	8.41122	.748	-37.8394	17.5246
	BetA 15 uM	-20.75442	8.41122	.174	-48.4364	6.9276
	BetA 20 uM	-19.54367	8.41122	.214	-47.2257	8.1383
BetA 10 uM	CGM	-5.01079	8.41122	.973	-32.6928	22.6712
	BetA 5 uM	10.15744	8.41122	.748	-17.5246	37.8394
	BetA 15 uM	-10.59698	8.41122	.719	-38.2790	17.0850
	BetA 20 uM	-9.38624	8.41122	.795	-37.0682	18.2958
BetA 15 uM	CGM	5.58619	8.41122	.960	-22.0958	33.2682
	BetA 5 uM	20.75442	8.41122	.174	-6.9276	48.4364
	BetA 10 uM	10.59698	8.41122	.719	-17.0850	38.2790
	BetA 20 uM	1.21074	8.41122	1.000	-26.4713	28.8927
BetA 20 uM	CGM	4.37545	8.41122	.983	-23.3066	32.0575
	BetA 5 uM	19.54367	8.41122	.214	-8.1383	47.2257
	BetA 10 uM	9.38624	8.41122	.795	-18.2958	37.0682
	BetA 15 uM	-1.21074	8.41122	1.000	-28.8927	26.4713

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 10 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับ BetA 7 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ODM	BetA 5 uM	-4.44297	4.71829	.874	-19.9712	11.0853
	BetA 10 uM	12.55993	4.71829	.131	-2.9683	28.0882
	BetA 15 uM	10.13908	4.71829	.273	-5.3892	25.6673
	BetA 20 uM	2.24047	4.71829	.988	-13.2878	17.7687
BetA 5 uM	ODM-1	4.44297	4.71829	.874	-11.0853	19.9712
	BetA 10 uM	17.00290*	4.71829	.031	1.4746	32.5312
	BetA 15 uM	14.58205	4.71829	.068	-.9462	30.1103
	BetA 20 uM	6.68344	4.71829	.632	-8.8448	22.2117
BetA 10 uM	ODM-1	-12.55993	4.71829	.131	-28.0882	2.9683
	BetA 5 uM	-17.00290*	4.71829	.031	-32.5312	-1.4746
	BetA 15 uM	-2.42085	4.71829	.984	-17.9491	13.1074
	BetA 20 uM	-10.31946	4.71829	.259	-25.8477	5.2088
BetA 15 uM	ODM-1	-10.13908	4.71829	.273	-25.6673	5.3892
	BetA 5 uM	-14.58205	4.71829	.068	-30.1103	.9462
	BetA 10 uM	2.42085	4.71829	.984	-13.1074	17.9491
	BetA 20 uM	-7.89861	4.71829	.489	-23.4269	7.6297
BetA 20 uM	ODM-1	-2.24047	4.71829	.988	-17.7687	13.2878
	BetA 5 uM	-6.68344	4.71829	.632	-22.2117	8.8448
	BetA 10 uM	10.31946	4.71829	.259	-5.2088	25.8477
	BetA 15 uM	7.89861	4.71829	.489	-7.6297	23.4269

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 11 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่ได้รับ BetA 7 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	-6.91240	5.55637	.728	-25.1989	11.3741
	BetA 10 uM	-7.13382	5.55637	.706	-25.4203	11.1526
	BetA 15 uM	2.71957	5.55637	.987	-15.5669	21.0060
	BetA 20 uM	3.28104	5.55637	.973	-15.0054	21.5675
BetA 5 uM	ADM	6.91240	5.55637	.728	-11.3741	25.1989
	BetA 10 uM	-.22142	5.55637	1.000	-18.5079	18.0650
	BetA 15 uM	9.63196	5.55637	.458	-8.6545	27.9184
	BetA 20 uM	10.19343	5.55637	.407	-8.0930	28.4799
BetA 10 uM	ADM	7.13382	5.55637	.706	-11.1526	25.4203
	BetA 5 uM	-.22142	5.55637	1.000	-18.0650	18.5079
	BetA 15 uM	9.8534	5.55637	.437	-8.4331	28.1398
	BetA 20 uM	10.41485	5.55637	.388	-7.8716	28.7013
BetA 15 uM	ADM	-2.71957	5.55637	.987	-21.0060	15.5669
	BetA 5 uM	-9.63196	5.55637	.458	-27.9184	8.6545
	BetA 10 uM	-9.85339	5.55637	.437	-28.1398	8.4331
	BetA 20 uM	-.56147	5.55637	1.000	-17.7250	18.8479
BetA 20 uM	ADM	-3.28104	5.55637	.973	-21.5675	15.0054
	BetA 5 uM	-10.19343	5.55637	.407	-28.4799	8.0930
	BetA 10 uM	-10.41485	5.55637	.388	-28.7013	7.8716
	BetA 15 uM	-.56147	5.55637	1.000	-18.8479	17.7250

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 12 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Dunnett' C เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่ได้รับ BetA 10 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CGM	BetA 5 uM	-5.13497	1.23728	-14.65471	4.38478	-5.13497
	BetA 10 uM	-4.06172	7.16134	-59.16187	51.03843	-4.06172
	BetA 15 uM	-11.14444	1.67914	-24.06396	1.77509	-11.14444
	BetA 20 uM	2.34163	3.37597	-23.63349	28.31676	2.34163
BetA 5 uM	CGM	5.13497	1.23728	-4.38478	14.65471	5.13497
	BetA 10 uM	1.07325	7.26571	-54.82994	56.97644	1.07325
	BetA 15 uM	-6.00947	2.07973	-22.01115	9.99222	-6.00947
	BetA 20 uM	7.47660	3.59207	-20.16118	35.11438	7.47660
BetA 10 uM	CGM	4.06172	7.16134	-51.03843	59.16187	4.06172
	BetA 5 uM	-1.07325	7.26571	-56.97644	54.82994	-1.07325
	BetA 15 uM	-7.08272	7.35386	-63.66412	49.49869	-7.08272
	BetA 20 uM	6.40335	7.91561	-54.50024	67.30695	6.40335
BetA 15 uM	CGM	11.14444	1.67914	-1.77509	24.06396	11.14444
	BetA 5 uM	6.00947	2.07973	-9.99222	22.01115	6.00947
	BetA 10 uM	7.08272	7.35386	-49.49869	63.66412	7.08272
	BetA 20 uM	13.48607	3.76718	-15.49902	42.47116	13.48607
BetA 20 uM	CGM	-2.34163	3.37597	-28.31676	23.63349	-2.34163
	BetA 5 uM	-7.47660	3.59207	-35.11438	20.16118	-7.47660
	BetA 10 uM	-6.40335	7.91561	-67.30695	54.50024	-6.40335
	BetA 15 uM	-13.48607	3.76718	-42.47116	15.49902	-13.48607

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 13 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่ได้รับ BetA 10 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ODM	BetA 5 uM	-10.34302	16.23362	.965	-63.7692	43.0831
	BetA 10 uM	-1.66958	16.23362	1.000	-55.0957	51.7566
	BetA 15 uM	-5.78929	16.23362	.996	-59.2155	47.6369
	BetA 20 uM	-37.85439	16.23362	.212	-91.2806	15.5718
BetA 5 uM	ODM	10.34302	16.23362	.965	-43.0831	63.7692
	BetA 10 uM	8.67343	16.23362	.982	-44.7527	62.0996
	BetA 15 uM	4.55373	16.23362	.998	-48.8724	57.9799
	BetA 20 uM	-27.51138	16.23362	.478	-80.9375	25.9148
BetA 10 uM	ODM	1.66958	16.23362	1.000	-51.7566	55.0957
	BetA 5 uM	-8.67343	16.23362	.982	-62.0996	44.7527
	BetA 15 uM	-4.11971	16.23362	.999	-57.5459	49.3065
	BetA 20 uM	-36.18481	16.23362	.245	-89.6110	17.2414
BetA 15 uM	ODM	5.78929	16.23362	.996	-47.6369	59.2155
	BetA 5 uM	-4.55373	16.23362	.998	-57.9799	48.8724
	BetA 10 uM	4.11971	16.23362	.999	-49.3065	57.5459
	BetA 20 uM	-32.06510	16.23362	.342	-85.4913	21.3611
BetA 20 uM	ODM	37.85439	16.23362	.212	-15.5718	91.2806
	BetA 5 uM	27.51138	16.23362	.478	-25.9148	80.9375
	BetA 10 uM	36.18481	16.23362	.245	-17.2414	89.6110
	BetA 15 uM	32.06510	16.23362	.342	-21.3611	85.4913

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่ได้รับ BetA 10 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	-5.10574	3.93468	.699	-18.0551	7.8436
	BetA 10 uM	-11.47958	3.93468	.089	-24.4289	1.4698
	BetA 15 uM	-22.23335**	3.93468	.002	-35.1827	-9.2840
	BetA 20 uM	-29.51237**	3.93468	.000	-42.4617	-16.5630
BetA 5 uM	ADM	5.10574	3.93468	.699	-7.8436	18.0551
	BetA 10 uM	-6.37384	3.93468	.518	-19.3232	6.5755
	BetA 15 uM	-17.12760**	3.93468	.010	-30.0770	-4.1782
	BetA 20 uM	-24.40662**	3.93468	.001	-37.3560	-11.4573
BetA 10 uM	ADM	11.47958	3.93468	.089	-1.4698	24.4289
	BetA 5 uM	6.37384	3.93468	.518	-6.5755	19.3232
	BetA 15 uM	-10.75376	3.93468	.118	-23.7031	2.1956
	BetA 20 uM	-18.03279**	3.93468	.007	-30.9821	-5.0834
BetA 15 uM	ADM	22.23335**	3.93468	.002	9.2840	35.1827
	BetA 5 uM	17.12760**	3.93468	.010	4.1782	30.0770
	BetA 10 uM	10.75376	3.93468	.118	-2.1956	23.7031
	BetA 20 uM	-7.27902	3.93468	.399	-20.2284	5.6703
BetA 20 uM	ADM	29.51237**	3.93468	.000	16.5630	42.4617
	BetA 5 uM	24.40662**	3.93468	.001	11.4573	37.3560
	BetA 10 uM	18.03279**	3.93468	.007	5.0834	30.9821
	BetA 15 uM	7.27902	3.93468	.399	-5.6703	20.2284

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ ALP ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่เวลา 7 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ODM	BetA 5 uM	-.59443**	.08615	.000	-.8838	-.3050
	BetA 10 uM	-1.03701**	.08615	.000	-1.3264	-.7476
	BetA 15 uM	-2.45401**	.08615	.000	-2.7434	-2.1646
	BetA 20 uM	-.47051**	.08615	.002	-.7599	-.1811
BetA 5 uM	ODM	.59443**	.08615	.000	.3050	.8838
	BetA 10 uM	-.44258**	.08615	.003	-.7320	-.1532
	BetA 15 uM	-1.85958**	.08615	.000	-2.1490	-1.5702
	BetA 20 uM	.12391	.08615	.706	-.1655	.4133
BetA 10 uM	ODM	1.03701**	.08615	.000	.7476	1.3264
	BetA 5 uM	.44258**	.08615	.003	.1532	.7320
	BetA 15 uM	-1.41700**	.08615	.000	-1.7064	-1.1276
	BetA 20 uM	-.56650**	.08615	.000	.2771	.8559
BetA 15 uM	ODM	2.45401**	.08615	.000	2.1646	2.7434
	BetA 5 uM	1.85958**	.08615	.000	1.5702	2.1490
	BetA 10 uM	1.41700**	.08615	.000	1.1276	1.7064
	BetA 20 uM	1.98349**	.08615	.000	1.6941	2.2729
BetA 20 uM	ODM	.47051**	.08615	.002	.1811	.7599
	BetA 5 uM	-.12391	.08615	.706	-.4133	.1655
	BetA 10 uM	-.56650**	.08615	.000	-.8559	-.2771
	BetA 15 uM	-1.98349**	.08615	.000	-2.2729	-1.6941

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 16 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการสะสมแคลเซียมของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ODM ที่เวลา 14 วัน

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ODM	BetA 5 uM	-4.17297 [*]	.97697	.011	-7.4545	-.8914
	BetA 10 uM	-4.81878 ^{**}	.97697	.004	-8.1003	-1.5372
	BetA 15 uM	-3.97425 [*]	.97697	.015	-7.2558	-.6927
	BetA 20 uM	-.54646	.97697	.992	-3.8280	2.7351
BetA 5 uM	ODM	4.17297 [*]	.97697	.011	.8914	7.4545
	BetA 10 uM	-.64582	.97697	.983	-3.9274	2.6357
	BetA 15 uM	.19871	.97697	1.000	-3.0828	3.4803
	BetA 20 uM	3.62651 [*]	.97697	.028	.3449	6.9081
BetA 10 uM	ODM	4.81878 ^{**}	.97697	.004	1.5372	8.1003
	BetA 5 uM	-.64582	.97697	.983	-2.6357	3.9274
	BetA 15 uM	.84453	.97697	.948	-2.4370	4.1261
	BetA 20 uM	4.27232 [*]	.97697	.009	.9908	7.5539
BetA 15 uM	ODM	3.97425 [*]	.97697	.015	.6927	7.2558
	BetA 5 uM	-.19871	.97697	1.000	-3.4803	3.0828
	BetA 10 uM	-.84453	.97697	.948	-4.1261	2.4370
	BetA 20 uM	3.42779 [*]	.97697	.039	.1462	6.7094
BetA 20 uM	ODM	.54646	.97697	.992	-2.7351	3.8280
	BetA 5 uM	-3.62651 [*]	.97697	.028	-6.9081	-.3449
	BetA 10 uM	-4.27232 [*]	.97697	.009	-7.5539	-.9908
	BetA 15 uM	-3.42779 [*]	.97697	.039	-6.7094	-.1462

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 17 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Nonparametric tests โดยใช้สถิติ Mann-Whitney tests เพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ GPDH ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 7 วัน

Conc	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Asymp. Sig. (2-tailed)
Contorl	3	5.00	15.00	
5 uM BetA	3	2.00	6.00	0.46*
Total	6			
Contorl	3	5.00	15.00	
10 uM BetA	3	2.00	6.00	0.46*
Total	6			
Contorl	3	5.00	15.00	
15 uM BetA	3	2.00	6.00	0.46*
Total	6			
Contorl	3	5.00	15.00	
20 uM BetA	3	2.00	6.00	0.43*
Total	6			

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 18 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการสะสมไขมันของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Oil-red O

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	.06900 [*]	.01912	.031	.0060	.1320
	BetA 10 uM	.09333 ^{**}	.01912	.005	.0304	.1563
	BetA 15 uM	.109667 ^{**}	.01912	.001	.0467	.1726
	BetA 20 uM	.08033 [*]	.01912	.012	.0174	.1433
BetA 5 uM	ADM	-.06900 [*]	.01912	.031	-.1320	-.0060
	BetA 10 uM	.02433	.01912	.713	-.0386	.0873
	BetA 15 uM	.04067	.01912	.281	-.0223	.1036
	BetA 20 uM	.01133	.01912	.973	-.0516	.0743
BetA 10 uM	ADM	-.09333 ^{**}	.01912	.005	-.1563	-.0304
	BetA 5 uM	-.02433	.01912	.713	-.0873	.0386
	BetA 15 uM	-.01633	.01912	.907	-.0466	.0793
	BetA 20 uM	-.01300	.01912	.957	-.0760	.0500
BetA 15 uM	ADM	-.10967 ^{**}	.01912	.001	-.1726	-.0467
	BetA 5 uM	-.0407	.01912	.281	-.1036	.0223
	BetA 10 uM	-.01633	.01912	.907	-.07929	.0466
	BetA 20 uM	-.02933	.01912	.566	-.09229	.0336
BetA 20 uM	ADM	-.08033 [*]	.01912	.012	-.14329	-.0174
	BetA 5 uM	-.01133	.01912	.973	-.07429	.0516
	BetA 10 uM	.01300	.01912	.957	-.04996	.0760
	BetA 15 uM	.02933	.01912	.566	-.0336	.0923

(N=3 และ p-value ^{*}< 0.05, ^{**}< 0.01)

ตารางที่ 19 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการจำแนกชนิดไขมันของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red

(I) Conc	(J) Conc	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	1202.00000 **	796.96312	.580	-1420.8711	3824.8711
	BetA 10 uM	4546.00000 **	796.96312	.001	1923.1289	7168.8711
	BetA 15 uM	8063.33333 **	796.96312	.000	5440.4622	10686.2044
	BetA 20 uM	9404.00000 **	796.96312	.000	6781.1289	12026.8711
BetA 5 uM	ADM	-1202.00000 *	796.96312	.580	-3824.8711	1420.8711
	BetA 10 uM	3344.00000 **	796.96312	.012	721.1289	5966.8711
	BetA 15 uM	6861.33333 **	796.96312	.000	4238.4622	9484.2044
	BetA 20 uM	8202.00000 **	796.96312	.000	5579.1289	10824.8711
BetA 10 uM	ADM	-4546.00000 *	796.96312	.001	-7168.8711	-1923.1289
	BetA 5 uM	-3344.00000 **	796.96312	.012	-5966.8711	-721.1289
	BetA 15 uM	3517.33333 **	796.96312	.009	894.4622	6140.2044
	BetA 20 uM	4858.00000 **	796.96312	.001	2235.1289	7480.8711
BetA 15 uM	ADM	-8063.33333 **	796.96312	.000	-10686.2044	-5440.4622
	BetA 5 uM	-6861.33333 **	796.96312	.000	-9484.2044	-4238.4622
	BetA 10 uM	-3517.33333 **	796.96312	.009	-6140.2044	-894.4622
	BetA 20 uM	1340.66667 **	796.96312	.484	-1282.2044	3963.5378
BetA 20 uM	ADM	-9404.00000 **	796.96312	.000	-12026.8711	-6781.1289
	BetA 5 uM	-8202.00000 **	796.96312	.000	-10824.8711	-5579.1289
	BetA 10 uM	-4858.00000 **	796.96312	.001	-7480.8711	-2235.1289
	BetA 15 uM	-1340.66667 **	796.96312	.484	-3963.5378	1282.2044

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 20 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของหยดไขมันขนาดเล็ก ($< 1 \mu\text{M}^2$) ในเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red

(I) Conc	(J) Conc	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	.010311	.016095	.965	-.04266	.06328
	BetA 10 uM	-.037248	.016095	.217	-.09022	.01572
	BetA 15 uM	-.062397*	.016095	.020	-.11537	-.00943
	BetA 20 uM	-.084743**	.016095	.003	-.13771	-.03177
BetA 5 uM	ADM	-.010311	.016095	.965	-.06328	.04266
	BetA 10 uM	-.047559	.016095	.084	-.10053	.00541
	BetA 15 uM	-.072708**	.016095	.008	-.12568	-.01974
	BetA 20 uM	-.095054**	.016095	.001	-.14802	-.04209
BetA 10 uM	ADM	.037248	.016095	.217	-.01572	.09022
	BetA 5 uM	.047559	.016095	.084	-.00541	.10053
	BetA 15 uM	-.025149	.016095	.550	-.07812	.02782
	BetA 20 uM	-.047495	.016095	.085	-.10046	.00547
BetA 15 uM	ADM	.062397*	.016095	.020	.00943	.11537
	BetA 5 uM	.072708**	.016095	.008	.01974	.12568
	BetA 10 uM	.025149	.016095	.550	-.02782	.07812
	BetA 20 uM	-.022346**	.016095	.648	-.07531	.03062
BetA 20 uM	ADM	.084743**	.016095	.003	.03177	.13771
	BetA 5 uM	.095054**	.016095	.001	.04209	.14802
	BetA 10 uM	.047495	.016095	.085	-.00547	.10046
	BetA 15 uM	.022346**	.016095	.648	-.03062	.07531

(N=3 และ p-value * < 0.05 , ** < 0.01)

ตารางที่ 21 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของหยดไขมันขนาด $\geq 1 \mu\text{M}^2$ และ $< 2 \mu\text{M}^2$ ในเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	-.019336	.008862	.261	-.04850	.00983
	BetA 10 uM	-.006009	.008862	.957	-.03518	.02316
	BetA 15 uM	.004796	.008862	.981	-.02437	.03396
	BetA 20 uM	.011451	.008862	.702	-.01772	.04062
BetA 5 uM	ADM	.019336	.008862	.261	-.00983	.04850
	BetA 10 uM	.013327	.008862	.582	-.01584	.04249
	BetA 15 uM	.024132	.008862	.120	-.00503	.05330
	BetA 20 uM	-.030787*	.008862	.038	.00162	.05995
BetA 10 uM	ADM	.006009	.008862	.957	-.02316	.03518
	BetA 5 uM	-.013327	.008862	.582	-.04249	.01584
	BetA 15 uM	.010805	.008862	.741	-.01836	.03997
	BetA 20 uM	.017460	.008862	.344	-.01171	.04663
BetA 15 uM	ADM	-.004796	.008862	.981	-.03396	.02437
	BetA 5 uM	-.024132	.008862	.120	-.05330	.00503
	BetA 10 uM	-.010805	.008862	.741	-.03997	.01836
	BetA 20 uM	.006656	.008862	.939	-.02251	.03582
BetA 20 uM	ADM	-.011451	.008862	.702	-.04062	.01772
	BetA 5 uM	-.030787*	.008862	.038	-.05995	-.00162
	BetA 10 uM	-.017460	.008862	.344	-.04663	.01171
	BetA 15 uM	-.006656	.008862	.939	-.03582	.02251

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 22 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของหยดไขมันขนาดใหญ่ $\geq 2 \mu\text{M}^2$ ในเซลล์ UE7T-13 ที่เวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค Nile red

(I) Conc	(J) Conc	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ADM	BetA 5 uM	.009025 *	.010291	.899	-.02484	.04289
	BetA 10 uM	.043258 **	.010291	.012	.00939	.07713
	BetA 15 uM	.057602 **	.010291	.002	.02373	.09147
	BetA 20 uM	.073292 **	.010291	.000	.03942	.10716
BetA 5 uM	ADM	-.009025 *	.010291	.899	-.04289	.02484
	BetA 10 uM	.034232 **	.010291	.047	.00036	.06810
	BetA 15 uM	.048577 **	.010291	.006	.01471	.08244
	BetA 20 uM	.064267 **	.010291	.001	.03040	.09813
BetA 10 uM	ADM	-.043258 *	.010291	.012	-.07713	-.00939
	BetA 5 uM	-.034232 *	.010291	.047	-.06810	-.00036
	BetA 15 uM	.014344 **	.010291	.645	-.01952	.04821
	BetA 20 uM	.030035 **	.010291	.089	-.00383	.06390
BetA 15 uM	ADM	-.057602 **	.010291	.002	-.09147	-.02373
	BetA 5 uM	-.048577 **	.010291	.006	-.08244	-.01471
	BetA 10 uM	-.014344 **	.010291	.645	-.04821	.01952
	BetA 20 uM	.015690 **	.010291	.571	-.01818	.04956
BetA 20 uM	ADM	-.073292 **	.010291	.000	-.10716	-.03942
	BetA 5 uM	-.064267 **	.010291	.001	-.09813	-.03040
	BetA 10 uM	-.030035 **	.010291	.089	-.06390	.00383
	BetA 15 uM	-.015690 **	.010291	.571	-.04956	.01818

(N=3 และ p-value * < 0.05, ** < 0.01)

ตารางที่ 23 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3, 7, และ 10 วัน

Gene-Timepoint- Media	(I) Concentration	(J) Concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PPAR γ -2-D3- CGM	CGM	BetA 10 uM	.042565956	.058329733	.756	-.13640568	.22153760
		BetA 15 uM	.188014413	.058329733	.041	.00904277	.36698605
C/EBP- α -D3- CGM	CGM	BetA 10 uM	.253284995	.098740777	.094	-.04967882	.55624881
		BetA 15 uM	.634208090**	.098740777	.002	.33124427	.93717191
PGC-1 α -D3- CGM	CGM	BetA 10 uM	-.623415434	.051765608	.000	-.78224653	-.46458434
		BetA 15 uM	-.399909316	.051765608	.001	-.55874042	-.24107822
B-catinin- D3- ODM	ODM	BetA 10 uM	.092814087	.03548056	.088	-.01605001	.20167819
		BetA 15 uM	.310525616	.03548056	.000	.20166152	.41938972
BMP2- D3- ODM	ODM	BetA 10 uM	.152689607	.05241099	.061	-.00812173	.31350094
		BetA 15 uM	.409552750	.05241099	.001	.24874142	.57036408
WNT3A- D3- ODM	ODM	BetA 10 uM	-.161232058	.03025714	.004	-.25406929	-.06839483
		BetA 15 uM	.385763276	.03025714	.000	.29292604	.47860051
PPAR γ -2- D3- ADM	ADM	BetA 10 uM	.040011989	.02956206	.420	-.05069255	.13071653
		BetA 15 uM	.106679332	.02956206	.026	.01597479	.19738387
PGC-1 α - D3- ADM	ADM	BetA 10 uM	.161147020	.02561518	.002	.08255261	.23974143
		BetA 15 uM	-.038811885	.02561518	.349	-.11740629	.03978252
OPN- D7 -ODM	ODM	BetA 10 uM	.045457574	.07018896	.800	-.16990145	.26081660
		BetA 15 uM	-.345811525**	.07018896	.006	-.56117055	-.13045250

Gene-Timepoint- Media	(I) Concentration	(J) Concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
<i>RUNX2</i> - D7- ODM	ODM	BetA 10 uM	.168895208	.04789739	.029	.02193286	.31585756
		BetA 15 uM	-.102920102	.04789739	.160	-.24988245	.04404225
<i>PPARγ</i> -2- D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	.410645586	.02225452	.000	.34236260	.47892857
		BetA 15 uM	.279666667	.02225452	.000	.21138368	.34794965
<i>BMP7</i> - D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	-4.635207785	1.5226251	.052	-9.3070397	.03662422
		BetA 15 uM	-4.289966667	1.5226251	.068	-8.9617986	.38186533
<i>UCP-1</i> - D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	-.724966667**	.02916211	.000	-.85550637	-.59442696
		BetA 15 uM	-.297366667**	.02916211	.000	-.42790637	-.16682696
Adiponectin- D7-ADM	ADM	BetA 10 uM	.339869425	.04857327	.001	.19083328	.48890557
		BetA 15 uM	.460355923	.04857327	.000	.31131977	.60939207
Adipsin- D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	1.46933**	.08224	.000	1.2170	1.7217
		BetA 15 uM	.94360**	.08224	.000	.6913	1.1960
Leptin- D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	-.312530788	.0692997	.010	-.52516155	-.09990003
		BetA 15 uM	-1.102766667**	.0692997	.000	-1.3153974	-.89013591
<i>LEP-R</i> - D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	.186559575	.18383607	.595	-.37749998	.75061913
		BetA 15 uM	.074633333	.18383607	.914	-.48942622	.63869288
<i>ALP</i> - D14 - ODM	ODM	BetA 10 uM	.207880613	.10804420	.212	-.12362868	.53938990
		BetA 15 uM	-.673565394	.10804420	.002	-1.0050746	-.34205610
<i>RUNX2</i> - D14- ODM	ODM	BetA 10 uM	-.969655382	.03378488	.000	-1.0733166	-.86599409
		BetA 15 uM	-1.783583794**	.03378488	.000	-1.8872450	-1.6799225

Gene-Timepoint- Media	(I) Concentration	(J) Concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
<i>C/EBP-α</i> – D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	.662790667	.07501114	.000	.43263588	.89294545
		BetA 15 uM	.277819607**	.07501114	.023	.04766482	.50797439
<i>PPARγ-2</i> - D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	.441486293	.07640212	.003	.20706359	.67590900
		BetA 15 uM	.357856861	.07640212	.008	.12343416	.59227956
<i>PRDM16</i> - D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	.572283699*	.16062731	.028	.07943500	1.0651324
		BetA 15 uM	.455047928*	.16062731	.067	-.03780078	.94789663
Adiponectin- D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	-.144302706	.05299463	.077	-.01829939	.30690480
		BetA 15 uM	-.142189219	.05299463	.081	-.02041287	.30479131
Adipsin- D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	.213513376	.05310629	.016	.05056869	.37645806
		BetA 15 uM	.354374509	.05310629	.001	.19142982	.51731920
Leptin- D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	.347597017	.02996252	.000	.25566377	.43953027
		BetA 15 uM	.149710780	.02996252	.006	.05777753	.24164403
<i>GLUT4</i> - D7-ADM	CGM	AM	-3.442333333**	.10728855	.000	-3.7859090	-3.0987576
		10 uM BetA	-1.579333333**	.10728855	.000	-1.9229090	-1.2357576
		15 uM BetA	-.974333333	.10728855	.000	-1.3179090	-.63075762
<i>GLUT4</i> - D7-ADM	CGM	AM	-.149666667	.04430575	.039	-.29154929	-.00778404
		10 uM BetA	.317666667	.04430575	.000	.17578404	.45954929
		15 uM BetA	-.288000000	.04430575	.001	-.42988263	-.14611737

($N=3$, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$, ค่าเฉลี่ย < 0.5 และ > 2.0)

ตารางที่ 24 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Dunnett'C เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3, 7, และ 10 วัน

Gene-Timepoint- Media	(I) Concentration	(J) Concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
β-catenin-D3- CGM	CGM	BetA 10 uM	-.339196238	.02854182	-.50732	-.17106332	-.33919623
		BetA 15 uM	.105170624	.06635190	-.28569	.49603344	.10517062
WNT3A-D3- CGM	CGM	BetA 10 uM	-.001572310	.04517463	-.26768	.26454044	-.00157231
		BetA 15 uM	.242495205	.04418803	-.01780	.50279609	.24249520
ALP- D7 -ODM	ODM	BetA 10 uM	.216746876	.06637937	-.17427	.60777156	.21674687
		BetA 15 uM	.527995669	.16377821	-.43678	1.4927730	.52799566
OC- D7 -ODM	ODM	BetA 10 uM	.390712915	.0332805	.19466	.5867607	.3907129
		BetA 15 uM	-.748085080	.3101340	-2.575	1.078838	-.748085
C/EBP-α – D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	.406866423	.05266120	-.30135	1.1150838	.40686642
		BetA 15 uM	.738566667	.00740503	.638979	.83815373	.73856666
FABP4 – D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	.367981781	.05504916	-.37235	1.1083138	.36798178
		BetA 15 uM	.272100000	.05229741	-.43122	.97542491	.27210000
PGC-1α – D7- ADM	ADM	BetA 10 uM	-2.553923725	.51798214	-9.5200	4.4121903	-2.5539237
		BetA 15 uM	-5.424700000**	.19275684	-8.0170	-2.8323979	-5.4247000
IL-6 – D7 - ADM	ADM	BetA 10 uM	-8.512100790	3.5878560	-56.763	39.73939	-8.5121007
		BetA 15 uM	-6.484500000**	.39939197	-11.855	-1.113252	-6.4845000

(N=3, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$, ค่าเฉลี่ย < 0.5 และ > 2.0)

ตารางที่ 25 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Nonparametric tests โดยใช้สถิติ Mann-Whitney tests เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร CGM ที่เวลา 3, 7, และ 10 วัน

Gene-Timepoint-Media	(I) Concentration	(J) Concentration	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Asymp. Sig. (2-tailed)
ALP-D3-CGM	CGM	BetA 10 uM	3	3.33	10	0.827
		BetA 15 uM	3	3.67	11	0.827
ALP-D3-ODM	ODM	BetA 10 uM	3	5.00	15.00	0.050
		BetA 15 uM	3	2.00	6.00	0.050
ALP-D3-ODM	ODM	BetA 10 uM	3	4.60	14.00	1.27
		BetA 15 uM	3	2.00	6.00	0.050
MYF5-D3-ADM	ADM	BetA 10 uM	3	2.00	6.00	0.050
		BetA 15 uM	3	2.00	6.00	0.050
MYF5-D7-ADM	ADM	BetA 10 uM	3	5.00	15.00	0.050
		BetA 15 uM	3	5.00	15.00	0.050
PRDM16-D7-ADM	ADM	BetA 10 uM	3	2.00	6.00	0.050
		BetA 15 uM	3	4.00	12.00	0.513
OPN-D14-ODM	ODM	BetA 10 uM	3	5.00	15.00	0.050*
		BetA 15 uM	3	5.00	15.00	0.050*
PGC-1 α – D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	3	2.00	6.00	0.050
		BetA 15 uM	3	2.00	6.00	0.050
UCP-1 – D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	3	2.00	6.00	0.050*
		BetA 15 uM	3	2.00	6.00	0.050
IL-6 – D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	3	5.00	15.00	0.050*
		BetA 15 uM	3	5.00	15.00	0.050*
LEP-R – D14-ADM	ADM	BetA 10 uM	3	5.00	15.00	0.050*
		BetA 15 uM	3	5.00	15.00	0.050*

Gene-Timepoint-Media	(I) Concentration	(J) Concentration	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Asymp. Sig. (2-tailed)
GLUT1 – D7-ADM	CGM	ADM	3	5.00	15.00	0.050
		BetA 10 uM	3	5.00	15.00	0.050
		BetA 15 uM	3	5.00	15.00	0.050
	ADM	BetA 10 uM	3	3.00	9.00	0.050
		BetA 15 uM	3	3.00	9.00	0.050

(N=3, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$, ค่าเฉลี่ย < 0.5 และ > 2.0)

ตารางที่ 26 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง Adiponectin ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM

Day	(I) Concentration	(J) Concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
10	CGM	BetA 10 uM	21.65333	10.43950	.176	-10.3779	53.6846
		BetA 15 uM	8.16667	10.43950	.727	-23.8646	40.1979
	BetA 10 uM	CGM	-21.65333	10.43950	.176	-53.6846	10.3779
		BetA 10 uM	-13.48667	10.43950	.449	-45.5179	18.5446
	BetA 15 uM	CGM	-8.16667	10.43950	.727	-40.1979	23.8646
		BetA 15 uM	13.48667	10.43950	.449	-18.5446	45.5179
14	CGM	BetA 10 uM	2777.00000**	652.80812	.013	774.0054	4779.9946
		BetA 15 uM	3138.00000**	652.80812	.007	1135.0054	5140.9946
	BetA 10 uM	CGM	-2777.00000**	652.80812	.013	-4779.9946	-774.0054
		BetA 10 uM	361.00000	652.80812	.849	-1641.9946	2363.9946
	BetA 15 uM	CGM	-3138.00000**	652.80812	.007	-5140.9946	-1135.0054
		BetA 15 uM	-361.00000	652.80812	.849	-2363.9946	1641.9946
17	CGM	BetA 10 uM	40622.00000*	8925.19397	.009	13237.0540	68006.9461
		BetA 15 uM	48399.66667*	8925.19397	.004	21014.7206	75784.6127
	BetA 10 uM	CGM	-40622.00000**	8925.19397	.009	-68006.9461	-13237.0540
		BetA 10 uM	7777.66667	8925.19397	.676	-19607.2794	35162.6127
	BetA 15 uM	CGM	-48399.66667**	8925.19397	.004	-75784.6127	-21014.7206
		BetA 15 uM	-7777.66667	8925.19397	.676	-35162.6127	19607.2794

(N=3 และ p-value * < 0.05)

ตารางที่ 27 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way anova โดยใช้สถิติ Tukey เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง Leptin ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM

Day	(I) Concentration	(J) Concentration	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
			Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
10	CGM	BetA 10 uM	-48.72000	19.35425	.100	-108.1042	10.6642
		BetA 15 uM	-113.23333**	19.35425	.003	-172.6175	-53.8492
	BetA 10 uM	CGM	48.72000	19.35425	.100	-10.6642	108.1042
		BetA 10 uM	-64.51333**	19.35425	.036	-123.8975	-5.1292
	BetA 15 uM	CGM	113.23333*	19.35425	.003	53.8492	172.6175
		BetA 15 uM	64.51333*	19.35425	.036	5.1292	123.8975
17	CGM	BetA 10 uM	533.66667**	79.01992	.001	291.2118	776.1215
		BetA 15 uM	656.33333**	79.01992	.000	413.8785	898.7882
	BetA 10 uM	CGM	-533.66667**	79.01992	.001	-776.1215	-291.2118
		BetA 10 uM	122.66667	79.01992	.334	-119.7882	365.1215
	BetA 15 uM	CGM	-656.33333**	79.01992	.000	-898.7882	-413.8785
		BetA 15 uM	-122.66667	79.01992	.334	-365.1215	119.7882

(N=3, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$)

ตารางที่ 28 แสดงการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Nonparametric tests โดยใช้สถิติ Mann-Whitney tests เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง Leptin และ IL-6 ของเซลล์ UE7T-13 ในอาหาร ADM

Cytokine-Timepoint	(I) Concentration	(J) Concentration	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Asymp. Sig. (2-tailed)
Leptin-14D	ADM	BetA 10 uM	3	2.00	6.00	0.050*
		BetA 15 uM	3	3.00	9.00	0.513
IL-6-10D	ODM	BetA 10 uM	3	3.50	10.5	1.00
		BetA 15 uM	3	4.00	12.00	0.456
IL-6-14D	ODM	BetA 10 uM	2	3.00	6.00	1.00
		BetA 15 uM	3	3.50	10.5	1.00
IL-6-17D	ADM	BetA 10 uM	3	2.33	7.00	0.116
		BetA 15 uM	3	2.00	6.00	0.034

(N=3, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$)

คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ADM	= adipogenic differentiation medium
ALP	= Alkaline phosphatase
aP2	= adipocyte Protein 2
BetA	= betulinic acid
BMD	= Bone Mineral Density
BMI	= Body mass index
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
C/EBP- α	= CCAAT-enhancer-binding proteins alpha
CGM	= complete growth medium
DHAP	= dihydroxyacetone phosphate
FABP4	= Fatty acid binding protein 4
GPDH	= glycerol 3-phosphate dehydrogenase
GLUT1	= Glucose transporters 1
GLUT4	= Glucose transporters 4
hMSC	= human mesenchymal stem cell
hTERT	= telomerase reverse transcriptase
MSC	= mesenchymal stem cell
Myf5	Myogenic Factor 5
nm	= nanometer
ODM	= osteogenic differentiation medium
PBS	= Phosphate buffered saline
PGC-1 α	= <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha</i>
PPAR γ -2	= Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2
PRDM16	= PR domain containing 16

คำย่อ	คำเต็ม
RUNX2	= Runt-related transcription factor 2
TZD	= Thiazolidinediones
UCP-1	= Uncoupling protein 1
WHO	= World Health Organization



รายการอ้างอิง

- Abdallah, B. M. (2017). Marrow adipocytes inhibit the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts via suppressing BMP-signaling. *Journal of biomedical science*, 24(1), 11. doi:10.1186/s12929-017-0321-4
- Abdallah, B. M., Haack-Sørensen, M., Fink, T., & Kassem, M. (2006). Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females. *Bone*, 39(1), 181-188. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2005.12.082>
- Abdulameer, S. A., Sulaiman, S. A. S., Hassali, M. A. A., Subramaniam, K., & Sahib, M. N. (2012). Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? *Patient preference and adherence*, 6, 435.
- Ahangarpour, A., Shabani, R., & Farbood, Y. (2018). The effect of betulinic acid on leptin, adiponectin, hepatic enzyme levels and lipid profiles in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic mice. *Research in pharmaceutical sciences*, 13(2), 142.
- Ahmad, F. B. H., Ghaffari Moghaddam, M., Basri, M., & Abdul Rahman, M. B. (2010). Anticancer activity of 3-O-acylated betulinic acid derivatives obtained by enzymatic synthesis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(5), 1025-1029.
- Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., & Nakamura, K. (2004). PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *The Journal of clinical investigation*, 113(6), 846-855.
- Aldridge, A., Kouroupis, D., Churchman, S., English, A., Ingham, E., & Jones, E. (2013). Assay validation for the assessment of adipogenesis of multipotential stromal cells—a direct comparison of four different methods. *Cytotherapy*, 15(1), 89-101. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.07.001>
- Alfieri, C. M., Cheek, J., Chakraborty, S., & Yutzey, K. E. (2010). Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. *Developmental biology*,

338(2), 127-135.

- Aoki, M., Ishigami, S., Uenosono, Y., Arigami, T., Uchikado, Y., Kita, Y., Kurahara, H., Matsumoto, M., Ueno, S., & Natsugoe, S. (2011). Expression of BMP-7 in human gastric cancer and its clinical significance. *British journal of cancer*, 104(4), 714-718.
- Arnold, M., Leitzmann, M., Freisling, H., Bray, F., Romieu, I., Renehan, A., & Soerjomataram, I. (2016). Obesity and cancer: An update of the global impact. *Cancer Epidemiology*, 41, 8-15. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.01.003>
- Attisano, L., & Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF- β superfamily. *science*, 296(5573), 1646-1647.
- Bäckesjö, C. M., Li, Y., Lindgren, U., & Haldosén, L. A. (2006). Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of bone and mineral research*, 21(7), 993-1002.
- Bao, P., Liu, G., & Wei, Y. (2015). Association between IL-6 and related risk factors of metabolic syndrome and cardiovascular disease in young rats. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(8), 13491.
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(4), 568-584.
- Beck, J. G. R., Sullivan, E. C., Moran, E., & Zerler, B. (1998). Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry*, 68(2), 269-280. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19980201)68:2<269::AID-JCB13>3.0.CO;2-A
- Bertholet, A. M., Kazak, L., Chouchani, E. T., Bogaczyńska, M. G., Paranjpe, I., Wainwright, G. L., Bétourné, A., Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Kirichok, Y. (2017). Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. *Cell metabolism*, 25(4), 811-822.e814. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.002>
- Birmingham, E., Niebur, G. L., & Mchugh, P. E. (2012). Osteogenic differentiation of

mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche.

- Bornstein, S. R., Abu-Asab, M., Glasow, A., Páth, G., Hauner, H., Tsokos, M., Chrousos, G. P., & Scherbaum, W. A. (2000). Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*, *49*(4), 532-538.
- Bourne, R. R. A., Stevens, G. A., White, R. A., Smith, J. L., Flaxman, S. R., Price, H., Jonas, J. B., Keeffe, J., Leasher, J., & Naidoo, K. (2013). Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. *The lancet global health*, *1*(6), e339-e349.
- Brusotti, G., Montanari, R., Capelli, D., Cattaneo, G., Laghezza, A., Tortorella, P., Liodice, F., Peiretti, F., Bonardo, B., & Paiardini, A. (2017). Betulinic acid is a PPAR γ antagonist that improves glucose uptake, promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis. *Scientific Reports*, *7*.
- Cai, T., Sun, D., Duan, Y., Wen, P., Dai, C., Yang, J., & He, W. (2016). WNT/ β -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression. *Experimental cell research*, *345*(2), 206-217.
- Caira, F. C., Stock, S. R., Gleason, T. G., Mcgee, E. C., Huang, J., Bonow, R. O., Spelsberg, T. C., Mccarthy, P. M., Rahimtoola, S. H., & Rajamannan, N. M. (2006). Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *Journal of the American College of Cardiology*, *47*(8), 1707-1712.
doi:10.1016/j.jacc.2006.02.040
- Cao, H., Sekiya, M., Ertunc, M. E., Burak, M. f., Mayers, J. r., White, A., Inouye, K., Rickey, L. m., Ercal, B. c., Furuhashi, M., Tuncman, G., & Hotamisligil, G. s. (2013). Adipocyte Lipid Chaperone aP2 Is a Secreted Adipokine Regulating Hepatic Glucose Production. *Cell metabolism*, *17*(5), 768-778.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.012>
- Cao, Y., Zhou, Z., De Crombrughe, B., Nakashima, K., Guan, H., Duan, X., Jia, S., & Kleinerman, E. S. (2005). Osterix, a transcription factor for osteoblast

- differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer research*, 65(4), 1124-1128.
- Castillo-Quan, J. I. (2012). From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. *Disease models & mechanisms*, 5(3), 293-295.
- Cauchi, S., Nead, K. T., Choquet, H., Horber, F., Potoczna, N., Balkau, B., Marre, M., Charpentier, G., Froguel, P., & Meyre, D. (2008). The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies. *BMC Medical Genetics*, 9(1), 45. doi:10.1186/1471-2350-9-45
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, 25(11), 2739-2749.
- Chen, D. I., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4), 233-241.
- Chen, J., & Long, F. (2013). β -catenin promotes bone formation and suppresses bone resorption in postnatal growing mice. *Journal of bone and mineral research*, 28(5), 1160-1169.
- Chen, Ss., Chen, J-F., Johnson, P. F., Muppala, V., & Lee, Y.-H. (2000). C/EBP β , when expressed from the C/ebp α gene locus, can functionally replace C/EBP α in liver but not in adipose tissue. *Molecular and Cellular Biology*, 20(19), 7292-7299.
- Chen, Y., Huang, Q., Zhou, H., Wang, Y., Hu, X., & Li, T. (2016). Inhibition of canonical WNT/ β -catenin signaling is involved in leflunomide (LEF)-mediated cytotoxic effects on renal carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(31), 50401-50416. doi:10.18632/oncotarget.10409
- Chinese, Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine. (2000). Chinese Bencao. *Shanghai Science and Technology Press*, 545—547.
- Choi, H., Jeong, B. C., Kook, M. S., & Koh, J. T. (2016). Betulinic acid synergically enhances BMP2-induced bone formation via stimulating Smad 1/5/8 and p38 pathways.

Journal of biomedical science, 23(1), 45.

- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., Mckee, L. J., & Bauer, T. L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, 334(5), 292-295.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y-H., & Doria, A. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine*, 360(15), 1509-1517.
- Deutsch, M. J., Schriever, S. C., Roscher, A. A., & Ensenauer, R. (2014). Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells. *Analytical biochemistry*, 445, 87-89.
- Devoto, L., González, R. R., Mercader, A., Pellicer, A., Jasper, M., Caballero-Campo, P., & Simon, C. (2000). Leptin and Leptin Receptor Are Expressed in the Human Endometrium and Endometrial Leptin Secretion Is Regulated by the Human Blastocyst1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(12), 4883-4888. doi:10.1210/jcem.85.12.7060
- Dietz, W., & Santos-Burgoa, C. (2020). Obesity and its implications for COVID-19 mortality. *Obesity (Silver Spring)*, 28(6), 1005.
- Dobnig, H., Pischinger-Solkner, J. C., Roth, M., Obermayer-Pietsch, B., Tiran, A., Strele, A., Maier, E., Maritschnegg, P., Sieberer, C., & Fahrleitner-Pammer, A. (2006). Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover, bone mass, and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(9), 3355-3363. doi:10.1210/jc.2006-0460
- Ducrest, A. L., Szutorisz, H., Lingner, J., & Nabholz, M. (2002). Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene*, 21(4), 541.
- El-Sayyad, H. I., Sobh, M. A., Khalifa, S. A., & El-Sayyad, O. K. (2016). Adipogenic and Osteogenic Markers Characterization of Human Amniotic Fluid Stem Cells. *Studies on Stem Cells Research and Therapy*, 2(1), 025-032.
- Evers, M., Poujade, C., Soler, F., Ribeill, Y., James, C., Lelièvre, Y., Gueguen, J. C., Reisdorf, D., Morize, I., Pauwels, R., De Clercq, E., Hénin, Y., Bousseau, A., Mayaux, J. F., Le

- Pecq, J. B., & Dereu, N. (1996). Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Inhibitors with a New Mode of Action. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(5), 1056-1068. doi:10.1021/jm950670t
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*, 4(4), 263-273.
- Faujan, N. H., Alitheen, N. B., Yeap, S. K., Ali, A. M., Muhajir, A. H., & Ahmad, F. B. H. (2010). Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6387-6396.
- Fazeli, P. K., Horowitz, M. C., Macdougald, O. A., Scheller, E. L., Rodeheffer, M. S., Rosen, C. J., & Klibanski, A. (2013). Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(3), 935-945. doi:10.1210/jc.2012-3634
- Fedorenko, A., Lishko, P. v., & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell*, 151(2), 400-413. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.010>
- Franceschi, R. T., Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., Yang, S., & Reith, E. (2003). Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connective tissue research*, 44 Suppl 1(Suppl 1), 109-116. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952183>
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., & Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature medicine*, 1(12), 1311-1314. doi:10.1038/nm1295-1311
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. (1974). STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES: Cloning In Vitro and Retransplantation In Vivo. *Transplantation*, 17(4). Retrieved from http://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/1974/04000/STROMAL_CELLS_RESPONSIBLE_FOR_TRANSFERRING_THE.1.aspx

- Fu, X., Zhang, M., Shao, C., Li, G., Bai, H., Dai, G., Chen, Q., Kong, W., Fu, X., & Wang, C. (2016). Chinese Marine Materia Medica Resources: Status and Potential. *Marine drugs*, 14(3), 46. doi:10.3390/md14030046
- Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Cosentino, L. M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I. S., & Lee, K. H. (1994). Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of natural products*, 57(2), 243-247.
- Gemmis, P. D., Lapucci, C., Bertelli, M., Tognetto, A., Fanin, E., Vettor, R., Pagano, C., Pandolfo, M., & Fabbri, A. (2006). A Real-Time PCR Approach to Evaluate Adipogenic Potential of Amniotic Fluid-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* 15, 15(2006), 719-728.
- Gerdhem, P., Isaksson, A., Akesson, K., & Obrant, K. J. (2005). Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, 16(12), 1506-1512. doi:10.1007/s00198-005-1877-5
- Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5). Retrieved from https://journals.lww.com/co-ortho/Fulltext/2007/09000/The_role_of_alkaline_phosphatase_in_mineralization_5.aspx
- Green, H. (1974). Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 127-133.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of cell biology*, 100(3), 965-973. doi:10.1083/jcb.100.3.965
- Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., & Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*, 329(1), 77-84.
- Hankamolsiri, W., Manochantr, S., Tantrawatpan, C., Tantikanlayaporn, D., Tapanadechopone, P., & Kheolamai, P. (2016). The effects of high glucose on

- adipogenic and osteogenic differentiation of gestational tissue-derived MSCs. *Stem cells international*, 2016.
- Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*, 23(2), 270-299.
- Hokazono, E., Osawa, S., Nakano, T., Kawamoto, Y., Oguchi, Y., Hotta, T., Kayamori, Y., Kang, D., Cho, Y., Shiba, K., & Sato, K. (2009). Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III. *Annals of clinical biochemistry*, 46(4), 296-301. doi:10.1258/acb.2009.008099
- Hollis, A., Sperl, B., Gräber, M., & Berg, T. (2012). The natural product betulinic acid inhibits C/EBP family transcription factors. *ChemBioChem*, 13(2), 302-307.
- Holmbäck, U. (2019). Chapter 15 - Insulin Resistance in Pediatric Obesity—Physiological Effects and Possible Diet Treatment. In Debasis Bagchi (Ed.), *Global Perspectives on Childhood Obesity (Second Edition)* (pp. 195-207): Academic Press.
- Ishibashi, J., & Seale, P. (2015). Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells. *Temperature (Austin, Tex.)*, 2(1), 65-72. doi:10.4161/23328940.2014.974444
- Jackson, W. M., Nesti, L. J., & Tuan, R. S. (2012). Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*, 1(1), 44-50. doi:10.5966/sctm.2011-0024
- Jaiswal, R. K., Jaiswal, N., Bruder, S. P., Mbalaviele, G., Marshak, D. R., & Pittenger, M. F. (2000). Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9645-9652.
- James, A. W. (2013). Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica*, 2013.
- Jones, J. R., Barrick, C., Kim, K., Lindner, J., Blondeau, B., Fujimoto, Y., Shiota, M., Kesterson, R. A., Kahn, B. B., & Magnuson, M. A. (2005). Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), 6207-6212. doi:10.1073/pnas.0306743102
- Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E. N., Mosekilde, Li, Steiniche, T., & Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in

- patients with osteoporosis. *Biogerontology*, 2(3), 165-171.
- Kang, S., Bennett, C. N., Gerin, I., Rapp, L. A., Hankenson, K. D., & Macdougald, O. A. (2007). Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14515-14524.
- Kassir, R. (2020). Risk of COVID-19 for patients with obesity. *Obesity Reviews*, 21(6).
- Kawaguchi, H., Akune, T., Yamaguchi, M., Ohba, S., Ogata, N., Chung, U., Kubota, N., Terauchi, Y., Kadowaki, T., & Nakamura, K. (2005). Distinct effects of PPAR γ insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *Journal of bone and mineral metabolism*, 23(4), 275-279.
- Kawai, M., Mushiake, S., Bessho, K., Murakami, M., Namba, N., Kokubu, C., Michigami, T., & Ozono, K. (2007). Wnt/Lrp/ β -catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPAR γ and C/EBP α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(2), 276-282.
- Kennel, K. A., & Drake, M. T. (2009). Adverse Effects of Bisphosphonates: Implications for Osteoporosis Management. *Mayo Clinic Proceedings*, 84(7), 632-638. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704135/>
- Kern, B., Shen, J., Starbuck, M., & Karsenty, G. (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7101-7107.
- Khan, A., Raza, S., Khan, Y., Aksoy, T., Khan, M., Weinberger, Y., & Goldman, J. (2012). Current updates in the medical management of obesity. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery*, 6(2), 117-128.
- Kim, H-I., Moon, S-H., Lee, W-C., Lee, H-J., Shivakumar, S. B., Lee, S-H., Park, B-W., Rho, G-J., & Jeon, B-G. (2018). Inhibition of cell growth by cellular differentiation into adipocyte-like cells in dexamethasone sensitive cancer cell lines. *Animal cells and systems*, 22(3), 178-188.
- Kim, H. K., & Go, G. w. (2017). Betulinic acid decreased de novo lipogenesis and lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *The FASEB Journal*, 31(1 Supplement), lb471-lb471.

- Kim, K., Shin, D., Lee, S., Im, J., & Lee, D. (2010). Relation between Obesity and Bone Mineral Density and Vertebral Fractures in Korean Postmenopausal Women. *Yonsei Med J*, 51(6), 857-863. Retrieved from <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3349%2Fymj.2010.51.6.857>
- Kim, Y.C., & Ntambi, J. M. . (2000). Symposium: Adipocyte Function, Differentiation and Metabolism. *the journal of nation*, 103, 3122-3126.
- Klemm, D. J., Leitner, J. W., Watson, P., Nesterova, A., Reusch, J. E. B., Goalstone, M. L., & Draznin, B. (2001). Insulin-induced Adipocyte Differentiation ACTIVATION OF CREB RESCUES ADIPOGENESIS FROM THE ARREST CAUSED BY INHIBITION OF PRENYLATION. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28430-28435.
- Kobayashi, T., Lyons, K. M., McMahon, A. P., & Kronenberg, H. M. (2005). BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 18023-18027.
- Kochanowska, I., Chaberek, S., Wojtowicz, A., Marczyński, B., Włodarski, K., Dytko, M., & Ostrowski, K. (2007). Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 8, 128-128. doi:10.1186/1471-2474-8-128
- Komori, T. (2009). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. In *Osteoimmunology* (pp. 43-49): Springer.
- Kristóf, E., Klusóczki, Á., Veress, R., Shaw, A., Combi, Z. S., Varga, K., Győry, F., Balajthy, Z., Bai, P., & Bacso, Z. (2019). Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Experimental cell research*, 377(1-2), 47-55.
- Kume, S., Kato, S., Yamagishi, S., Inagaki, Y., Ueda, S., Arima, N., Okawa, T., Kojiro, M., & Nagata, K. (2005). Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res*, 20(9), 1647-1658. doi:10.1359/JBMR.050514
- Kuroda, M., Wada, H., Kimura, Y., Ueda, K., & Kioka, N. (2017). Vinculin promotes nuclear

- localization of TAZ to inhibit ECM stiffness-dependent differentiation into adipocytes. *J cell sci*, 130(5), 989-1002.
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), 117.
- Larsen, A. E., Tunstall, R. J., Carey, K. A., Nicholas, G., Kambadur, R., Crowe, T. C., & Cameron-Smith, D. (2006). Actions of short-term fasting on human skeletal muscle myogenic and atrogenic gene expression. *Annals of nutrition and metabolism*, 50(5), 476-481.
- Lecka-Czernik, B., Moerman, E. J., Grant, D. F., Lehmann, J. M., Manolagas, S. C., & Jilka, R. L. (2002). Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 143(6), 2376-2384.
- Lecke, Sheila Bünecker, Mattei, Fabricio, Morsch, Débora Martinho, & Spritzer, Poli Mara. (2011). Abdominal subcutaneous fat gene expression and circulating levels of leptin and adiponectin in polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 95(6), 2044-2049.
- Lee, S., Cho, H. Y., Bui, H. T. T., & Kang, D. (2014). The osteogenic or adipogenic lineage commitment of human mesenchymal stem cells is determined by protein kinase C delta. *BMC Cell Biology*, 15(1), 42. doi:10.1186/s12860-014-0042-4
- Leslie, W. D., Rubin, M. R., Schwartz, A. V., & Kanis, J. A. (2012). Type 2 diabetes and bone. *Journal of bone and mineral research*, 27(11), 2231-2237. doi:10.1002/jbmr.1759
- Lizcano, F., & Guzmán, G. (2014). Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *BioMed research international*, 2014.
- Lo, J. C., Ljubicic, S., Leibiger, B., Kern, M., Leibiger, I. B., Moede, T., Kelly, M. E., Chatterjee Bhowmick, D., Murano, I., Cohen, P., Banks, A. S., Khandekar, M. J., Dietrich, A., Flier, J. S., Cinti, S., Blüher, M., Danial, N. N., Berggren, P., & Spiegelman, B. M. (2014). Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes. *Cell*, 158(1), 41-53. doi:10.1016/j.cell.2014.06.005

- Lo, Y. C., Chang, Y. H., Wei, B. L., Huang, Y. L., & Chiou, W. F. (2010). Betulinic Acid Stimulates the Differentiation and Mineralization of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells: Involvement of BMP/Runx2 and β -Catenin Signals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(11), 6643-6649. doi:10.1021/jf904158k
- Lorenz, U. (2011). Protein tyrosine phosphatase assays. *Current protocols in immunology*, *93*(1), 11-17.
- Lowe, C. E., Orahilly, S., & Rochford, J. J. (2011). Adipogenesis at a glance. *J cell sci*, *124*(16), 2681-2686.
- Macdonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, *17*(1), 9-26.
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., & Ouchi, N. (2001). PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, *50*(9), 2094-2099.
- Maehata, Y., Takamizawa, S., Ozawa, S., Izukuri, K., Kato, Y., Sato, S., Kimura, A., & Hata, R. (2007). Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Matrix biology*, *26*(5), 371-381.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., & Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine*, *1*(11), 1155.
- Majka, S. M., Miller, H. L., Helm, K. M., Acosta, A. S., Childs, C. R., Kong, R., & Klemm, D. J. (2014). Chapter Fifteen - Analysis and Isolation of Adipocytes by Flow Cytometry. In Ormond A. Macdougald (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 537, pp. 281-296): Academic Press.
- Mauvais-Jarvis, F. (2011). Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *22*(1), 24-33.
- Mccarthy, A. D., Uemura, T., Etcheverry, S. B., & Cortizo, A. M. (2004). Advanced

- glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(5), 840-848. doi:10.1016/j.biocel.2003.09.006
- Montazerolghaem, M., Ning, Y., Engqvist, H., Ott, M. K., Tenje, M., & Mestres, G. (2016). Simvastatin and zinc synergistically enhance osteoblasts activity and decrease the acute response of inflammatory cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(2), 23.
- Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J. I., & Umezawa, A. (2005). Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 Induces Prolongation of the Life Span of Bone Marrow Stromal Cells from an Elderly Donor without Affecting Their Neurogenic Potential. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 5183-5195. doi:10.1128/MCB.25.12.5183-5195.2005
- National Center for Biotechnology Information. (2017). Betulinic Acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329773146> (Accessed July 24, 2017)
- Nayak, R. C., & Herman, I. M. (1997). Measurement of glucose consumption by hybridoma cells growing in hollow fiber cartridge bioreactors: use of blood glucose self-monitoring devices. *Journal of immunological methods*, 205(2), 109-114.
- Osborne, V., Layton, D., Perrio, M., Wilton, L., & Shakir, S. A. W. (2010). Incidence of Venous Thromboembolism in Users of Strontium Ranelate. *Drug Safety*, 33(7), 579-591. doi:10.2165/11533770-000000000-00000
- Overman, R. A., Borse, M., & Gourlay, M. L. (2013). Salmon calcitonin use and associated cancer risk. *Annals of Pharmacotherapy*, 47(12), 1675-1684.
- Padwal, R. S., Rucker, D., Li, S. K., Curioni, C., & Lau, D. C. W. (2003). Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(4).
- Park, S. Y., Kim, H. J., Kim, K. R., Lee, S. K., Lee, C. K., Park, K. K., & Chung, W. Y. (2014). Betulinic acid, a bioactive pentacyclic triterpenoid, inhibits skeletal-related

events induced by breast cancer bone metastases and treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 275(2), 152-162.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.01.009>

- Park, Y-K., Wang, L., Giampietro, A., Lai, B., Lee, J-E., & Ge, K. (2017). Distinct Roles of Transcription Factors KLF4, Krox20, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 37(2), e00554-00516. doi:10.1128/MCB.00554-16
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7153-7164.
- Potier, E., Ferreira, E., Andriamanalijaona, R., Pujol, J-P., Oudina, K., Logeart-Avramoglou, D., & Petite, H. (2007). Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone*, 40(4), 1078-1087.
- Pragallapati, S., & Manyam, R. (2019). Glucose transporter 1 in health and disease. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 23(3), 443-449. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_22_18
- Pricola, K. L., Kuhn, N. Z., Haleem-Smith, H., Song, Y., & Tuan, R. S. (2009). Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *Journal of cellular biochemistry*, 108(3), 577-588.
- Qian, S-W., Li, X., Zhang, Y-Y., Huang, H-Y., Liu, Y., Sun, X., & Tang, Q-Q. (2010). Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. *BMC developmental biology*, 10(1), 47. doi:10.1186/1471-213X-10-47
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360.

- Ranall, M. V., Gabrielli, B. G., & Gonda, T. J. (2011). High-content imaging of neutral lipid droplets with 1, 6-diphenylhexatriene. *Biotechniques*, *51*(1), 35-42.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, *3*(3), 71.
- Retting, K. N., Song, B., Yoon, B. S., & Lyons, K. M. (2009). BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development*, *136*(7), 1093-1104.
- Ricquier, D., & Bouillaud, F. (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *The Journal of Physiology*, *529*(1), 3-10.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.*
- Rosen, E. D., Hsu, C-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., & Spiegelman, B. M. (2002). C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes & development*, *16*(1), 22-26.
- Rucker, D., Padwal, R., Li, S. K., Curioni, C., & Lau, D. C. W. (2007). Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *Bmj*, *335*(7631), 1194-1199.
- Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2014). Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1842*(3), 340-351. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.027>
- Sanguineti, R., Storace, D., Monacelli, F., Federici, A., & Odetti, P. (2008). Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, *1126*, 166-172. doi:10.1196/annals.1433.044
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., & Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch.

Nature, 454(7207), 961-967. doi:10.1038/nature07182

- Sekiya, I., Larson, B. L., Vuoristo, J. T., Cui, J. G., & Prockop, D. J. (2004). Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *Journal of bone and mineral research*, 19(2), 256-264.
- Shi, J., Wang, Y., Jia, Z., Gao, Y., Zhao, C., & Yao, Y. (2017). Curcumin inhibits bladder cancer progression via regulation of β -catenin expression. *Tumor Biology*, 39(7), 1010428317702548. doi:10.1177/1010428317702548
- Sommer, C., Gulseth, H. L., Jenum, A. K., Sletner, L., Thorsby, P. M., & Birkeland, K. I. (2016). Soluble leptin receptor and risk of gestational diabetes in a multiethnic population: a prospective cohort study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(11), 4070-4075.
- Song, L., Webb, N. E., Song, Y., & Tuan, R. S. (2006). Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem cells*, 24(7), 1707-1718.
- Song, N-J., Kim, S., Jang, B-H., Chang, S-H., Yun, U. J., Park, K-M., Waki, H., Li, D. Y., Tontonoz, P., & Park, K. W. (2016). Small molecule-induced complement factor D (Adipsin) promotes lipid accumulation and adipocyte differentiation. *PLoS One*, 11(9), e0162228.
- Sottile, V., & Seuwen, K. (2001). A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Analytical biochemistry*, 293(1), 124-128.
- Sowers, J. R. (2003). Obesity as a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Medicine*, 115(8, Supplement 1), 37-41.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.08.012>
- Sritharen, Y., Enriquez-Sarano, M., Schaff, H. V., Casaclang-Verzosa, G., & Miller, J. D. (2017). Pathophysiology of Aortic Valve Stenosis: Is It Both Fibrocalcific and Sex Specific? *Physiology*, 32(3), 182. Retrieved from <http://physiologyonline.physiology.org/content/32/3/182.abstract>
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W., Townsend, K. L., An, D., Nygaard, E. B., Hitchcox, K. M., Markan, K. R., Nakano, K., Hirshman, M. F., & Tseng, Y-H. (2012). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal*

of clinical investigation, 123(1).

- Steele, J. P., Warhurst, D. C., Kirby, G. C., & Simmonds, M. J. (1999). In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytotherapy Research, 13(2)*, 115-119.
- Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2002). IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 283(6)*, E1272-E1278.
- Sugimoto, A., Miyazaki, A., Kawarabayashi, K., Shono, M., Akazawa, Y., Hasegawa, T., Ueda-Yamaguchi, K., Kitamura, T., Yoshizaki, K., & Fukumoto, S. (2017). Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells. *Scientific Reports, 7(1)*, 1-14.
- Sun, H., Wu, C., Dai, K., Chang, J., & Tang, T. (2006). Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials 27, 27(2006)*, 5651-5657.
- Sun, L. M., Lin, M. C., Muo, C. H., Liang, J. A., & Kao, C. H. (2014). Calcitonin Nasal Spray and Increased Cancer Risk: A Population-Based Nested Case-Control Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 99(11)*, 4259-4264. doi:10.1210/jc.2014-2239
- Takada, I., Suzawa, M., Matsumoto, K., & Kato, S. (2007). Suppression of PPAR Transactivation Switches Cell Fate of Bone Marrow Stem Cells from Adipocytes into Osteoblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1116(1)*, 182-195. doi:10.1196/annals.1402.034
- Tchoukalova, Y. D., Koutsari, C., Karpayak, M. V., Votruba, S. B., Wendland, E., & Jensen, M. D. (2008). Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *The American Journal of Clinical Nutrition, 87(1)*, 56-63. doi:10.1093/ajcn/87.1.56
- Tiraby, C., & Langin, D. (2003). Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends in Endocrinology & Metabolism, 14(10)*, 439-441.

- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., & Langin, D. (2003). Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33370-33376.
- Tsao, Y. T., Huang, Y. J., Wu, H. H., Liu, Y. A., Liu, Y. S., & Lee, O. K. (2017). Osteocalcin Mediates Biomineralization during Osteogenic Maturation in Human Mesenchymal Stromal Cells. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 159. doi:10.3390/ijms18010159
- Tseng, Y-H., Kokkotou, E., Schulz, T. J., Huang, T. L., Winnay, J. N., Taniguchi, C. M., Tran, T. T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., Ahrens, M.J., Dudley, A.T., Norris, A. W., Kulkarni, R.N., & Kahn, C. Ronald. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454(7207), 1000-1004. doi:10.1038/nature07221
- Tu, B., Peng, Z. X., Fan, Q. M., Du, L., Yan, W., & Tang, T. T. (2014). Osteosarcoma cells promote the production of pro-tumor cytokines in mesenchymal stem cells by inhibiting their osteogenic differentiation through the TGF- β /Smad2/3 pathway. *Experimental cell research*, 320(1), 164-173.
- U.S., Department of Health and Human Services. (2004). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD.
- Van Harmelen, V., Skurk, T., Röhrig, K., Lee, Y. M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I., & Hauner, H. (2003). Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *International Journal of Obesity*, 27(8), 889-895. doi:10.1038/sj.ijo.0802314
- Vestergaard, P. (2007). Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporosis International*, 18(4), 427-444.
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N-J., & Enerbäck, S. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New England Journal of Medicine*, 360(15), 1518-1525.
- Walker, J. M. (1996). *The protein protocols handbook* (Vol. 1996): Springer Science & Business Media.

- Wan, Y., Chong, L., & Evans, R. M. (2007). PPAR- γ regulates osteoclastogenesis in mice. *Nature medicine*, 13(12), 1496.
- Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., & Franceschi, R. T. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *Journal of bone and mineral research*, 14(6), 893-903.
- Wei, W., Wang, X., Yang, M., Smith, L. C., Dechow, P. C., & Wan, Y. (2010). PGC1 β mediates PPAR γ activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss. *Cell metabolism*, 11(6), 503-516.
- Who., World Health Organization. (2018b). Diabetes. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- Who., World Health Organization. (2018a). Obesity and overweight. <http://WWW/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Wilson, P. W. F., D'agostino, R. B., Sullivan, L., Parise, H., & Kannel, W. B. (2002). Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Archives of internal medicine*, 162(16), 1867-1872.
- Woldemichael, G. M., Singh, M. P., Maiese, W. M., & Timmermann, B. N. (2003). Constituents of antibacterial extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(1-2), 70-75.
- Wood, I. Stuart, Wang, Bohan, Lorente-Cebrián, Silvia, & Trayhurn, Paul. (2007). Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(2), 468-473.
- Xie, F., Wu, C. F., Zhang, Y., Yao, X. S., Cheung, P. Y., Chan, A. S. C., & Wong, M. S. (2005). Increase in Bone Mass and Bone Strength by *Sambucus williamsii* HANCE in Ovariectomized Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(10), 1879-1885. doi:10.1248/bpb.28.1879
- Xu, B., Zhang, J., Brewer, E., Tu, Q., Yu, L., Tang, J., Krebsbach, P., Wieland, M., & Chen, J. (2009). Osterix enhances BMSC-associated osseointegration of implants. *Journal of dental research*, 88(11), 1003-1007.

- Yokota, J., Chosa, N., Sawada, S., Okubo, N., Takahashi, N., Hasegawa, T., Kondo, H., & Ishisaki, A. (2014). PDGF-induced PI3K-mediated signaling enhances the TGF- β -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a TGF- β -activated MEK-dependent manner. *International journal of molecular medicine*, 33(3), 534-542.
- Yu, B., Huo, L., Liu, Y., Deng, P., Szymanski, J., Li, J., Luo, X., Hong, C., Lin, J., & Wang, C-Y. (2018). PGC-1 α Controls Skeletal Stem Cell Fate and Bone-Fat Balance in Osteoporosis and Skeletal Aging by Inducing TAZ. *Cell Stem Cell*, 23(2), 193-209.e195. doi:<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.06.009>
- Yue, Rui, Zhou, Bo o, Shimada, Issei s, Zhao, Zhiyu, & Morrison, Sean j. (2016). Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell*, 18(6), 782-796. doi:<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.015>
- Zhang, Y., Khan, D., Delling, J., & Tobiasch, E. (2012). Mechanisms Underlying the Osteo- and Adipo-Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *The ScientificWorld Journal*, 2012, 14.
- Zhao, L-J., Liu, Y-J., Liu, P-Y., Hamilton, J., Recker, R. R., & Deng, H-W. (2007). Relationship of obesity with osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(5), 1640-1646.
- Zhao, L., Jiang, S., & Hantash, B. M. (2009). Transforming growth factor β 1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Engineering Part A*, 16(2), 725-733.
- Zhou, B. o., Yue, R., Murphy, M. m., Peyer, J. G., & Morrison, S. j. (2014). Leptin-Receptor-Expressing Mesenchymal Stromal Cells Represent the Main Source of Bone Formed by Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell*, 15(2), 154-168. doi:<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.008>
- Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C., & Formelli, F. (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters*, 175(1), 17-25.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวศศิธร เสนามนตรี
วัน เดือน ปี เกิด	15 กรกฎาคม 2531
สถานที่เกิด	ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	88/143 หมู่ 8 ต.บางแอม อ.เมือง จ.นครปฐม
ผลงานตีพิมพ์	<ol style="list-style-type: none">1. Senamontree S, Lakthan T, Charoenpanich P, Chanchao C, Charoenpanich A. 2021. Betulinic acid decreases lipid accumulation in adipogenesis-induced human mesenchymal stem cells with upregulation of PGC-1α and UCP-1 and post-transcriptional downregulation of adiponectin and leptin secretion. PeerJ 9:e12321 https://doi.org/10.7717/peerj.123212. Poster present in 5th TERMIS World Congress 2018 Kyoto, Japan.
รางวัลที่ได้รับ	<ol style="list-style-type: none">1. ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากงบประมาณแผ่นดิน ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ 25622. The IFMBE grants for student participating in the REMIX-Winter School on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, January 14-18, 2020, at Chulalongkorn University, Thailand