

การศึกษาบทบาทและกลไกการทำงานของสารสกัดบัวบกต่อภาวะอ้วน กลุ่มอาการทางเมแทบอลิก ผ่านกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

กณณิษฐ์ ลิทธิพราหมณ์¹, ปุณยวีร์ หิรัญเนตร^{2,3}, พีรุดิ ชื่นมัจฉา², มินลดา สร้อยนาค⁴, กนกพร กิณนา⁴, ปวิทร์ พงศ์กอบปรสกล², ลภัสราดา ยूरศักดิ์พงศ์³, สายไหม ชาตรี² และ อัญมณี ฉัตรศิริศุภชัย^{2*}

¹โรงเรียนสุราษฎร์พิทยา อำเภอเมืองสุราษฎร์ธานี สุราษฎร์ธานี 84000

²คณะแพทยศาสตร์ศรีสวางควัฒนราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

³คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

⁴โรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาภรณราชวิทยาลัยลพบุรี อำเภอโคกสำโรง จังหวัดลพบุรี 15120

*อีเมลผู้ประพันธ์บรรณกิจ: anyamanee.cha@cra.ac.th

บทคัดย่อ

โรคอ้วนและความผิดปกติของการเผาผลาญเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญระดับโลก การสร้างไขมันมากเกินไปในเซลล์ตับจะนำไปสู่การก่อโรคไขมันพอกตับที่ไม่ใช่แอลกอฮอล์ หรือ Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) ซึ่งเป็นโรคตับเรื้อรังที่พบบ่อย และสามารถลุกลามไปสู่โรคตับแข็งและมะเร็งตับได้ สารสมุนไพรวบกก หรือ *Centella Asiatica* มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ และมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางเคมีที่สำคัญคือ Asiaticoside และ Madecassoside ซึ่งเป็นไตรเทอร์พีนเพนทาไซคลิก สารประกอบนี้ช่วยลดการเผาผลาญไขมันและให้ประโยชน์ในการต้านการอักเสบผ่านการลดความเสียหายจากการเกิดอนุมูลอิสระแบบไขมันเปอร์ออกซิเดชันในเซลล์ตับ การศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่ออธิบายบทบาทและกลไกของสารสกัดบัวบกในการปรับการสร้างไขมันภายในเซลล์ตับภายใต้การสร้างไขมันจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูง โดยเซลล์ตับจะได้รับการรักษาด้วยสารสกัดบัวบกแบบหยาบหรือ *Centella Asiatica* Crude Extract (CE) ที่ความเข้มข้น 0.01-100 ไมโครกรัม/มล. ร่วมกับการได้รับสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นสูง 50 mM เพื่อจำลองสภาวะน้ำตาลสูงในเซลล์ตับ จากการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ โดยการทดสอบ MTT พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นสูง 50 mM และได้รับสารสกัด CE ที่ความเข้มข้น 0.01-100 ไมโครกรัม/มล. มีความอยู่รอดของเซลล์ (% Cell viability) ไม่แตกต่างกับกลุ่มการทดลอง (control) จึงสามารถสรุปได้ว่าสารต่าง ๆ มีความปลอดภัยในการใช้ทำการทดลองนี้ จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพในการสะสมของไขมันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงชนิด HepG2 โดยการย้อมสี Oil Red O ซึ่งเป็นเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาที่เลือกจับกับไขมัน เพื่อให้เห็นภาพไขมันและหาปริมาณใน % ของพื้นที่ไขมันในเซลล์ และการย้อมสี Giemsa จะเป็นการย้อมไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส เพื่อให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของเซลล์เป็นและเซลล์ตาย ที่เกิดจากสารสกัดและสภาวะน้ำตาลสูง เซลล์ตับที่สัมผัสกับกลูโคสสูงและได้รับการรักษาด้วย CE ที่ความเข้มข้น 0.01-100 ไมโครกรัม/มล. ไม่ได้ทำให้เกิดความเป็นพิษของเซลล์และไม่เปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อเทียบกับกลูโคสสูงโดยไม่ต้องได้รับ CE ซึ่งบ่งชี้ว่าสารละลาย CE ช่วยชะลออัตราการตายและการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ได้ นอกจากนี้ได้ทำการคำนวณค่าความเข้มข้นของการยับยั้งครึ่งหนึ่งสูงสุด (IC50) ของสารสกัด CE ต่อการสร้างไขมัน พบว่าสารสกัด CE มีผลในการป้องกันการสะสมของไขมันในเซลล์ตับที่ความเข้มข้นประมาณ 360 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งบ่งชี้ถึงผลประโยชน์สำหรับการเมแทบอลิซึมในเซลล์ตับที่เกี่ยวข้องกับ NAFLD การค้นพบในงานวิจัยนี้ให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้การรักษาที่มีศักยภาพของสารสกัดบัวบก ในการจัดการภาวะอ้วนและความผิดปกติของการเมแทบอลิซึมในร่างกายโดยมุ่งเป้าไปที่ความผิดปกติของตับ

คำสำคัญ: สารสกัดบัวบก; กลไกการสร้างไขมัน; เซลล์ตับเพาะเลี้ยง; สภาวะน้ำตาลสูง; อาการปกติทางเมแทบอลิก; ภาวะอ้วน

Elucidating roles and mechanisms of *Centella Asiatica* extract on obesity and metabolic disorders through lipogenesis in vitro hepatocyte models

Kankanit Sitthipram¹, Punyawee Hirunnaet^{2,3}, Peerawut Cheunmatcha², Minlada Sroynak⁴, Kanokporn Kinnaree⁴, Pawin Pongkorsakol², Laphatrada Yurasakpong³, Saimai Chatree² and Anyamanee Chatsirisupachai^{2,*}

¹Suratpittaya School, Mueang, Suratthani 84000, Thailand

²Princess Srisavangavadhana Faculty of Medicine, Chulabhorn Royal Academy, Lak Si, Bangkok 10210, Thailand

³Faculty of Science, Mahidol University, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand

⁴Princess Chulabhorn Science High School, Khok Samrong, Lopburi 15120, Thailand

*Corresponding author's e-mail: anyamanee.cha@cra.ac.th

Abstract

Obesity and metabolic disorders are major global health issues, often driven by excess fat production in liver cells, leading to Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the most common chronic liver condition, which can progress to cirrhosis and liver cancer. *Centella Asiatica*, a traditional herb, contains Asiaticoside and Madecassoside—compounds with anti-inflammatory and antioxidant effects that help reduce lipid biosynthesis and oxidative stress in liver cells. This study investigates the effects of *Centella Asiatica* extract (CE) on lipid accumulation in hepatocytes under high-glucose-induced lipogenesis. Hepatocytes were treated with CE, 0.01-100 µg/ml prior to exposed with high glucose at 50 mM. Cellular toxicity was qualified by MTT assay prior to perform the efficacy testing. To assess lipid accumulation, Oil Red O staining, a histological technique that selectively binds to hydrophobic lipids, was performed to enable lipid droplet visualization as % of lipid positive area. Additionally, Giemsa staining is a dye staining the cytoplasm and nuclei differentially, thus providing insights into cell morphology and any morphological changes induced by the extract. Hepatocytes exposed with high glucose and treated with 0.01-100 µg/ml of CE was not altered the cell toxicity and cell morphology as compared to high glucose without CE treatment, suggesting CE solution was not damaged the cellular responses. Through the lipid formation and cell morphology analysis, the CE treatment was decreased the % area of lipid formation in hepatocytes in dose-dependent manner between 0.01 to 100 µg/ml as compared to high glucose without CE treatment. Taken together, a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of lipid formation exerted the preventive effect of CE in protects against lipid accumulation in hepatocytes at approximately 360 µg/ml, suggesting its beneficial effects for hepatic metabolisms associated with NAFLD. Our findings give insights into the potential therapeutic applications of *Centella Asiatica* in managing obesity and related metabolic disorders targeted to liver diseases.

Keywords: *Centella Asiatica*; Lipogenesis; Hepatocyte; Hyperglycemia; Metabolic disorders; Obesity

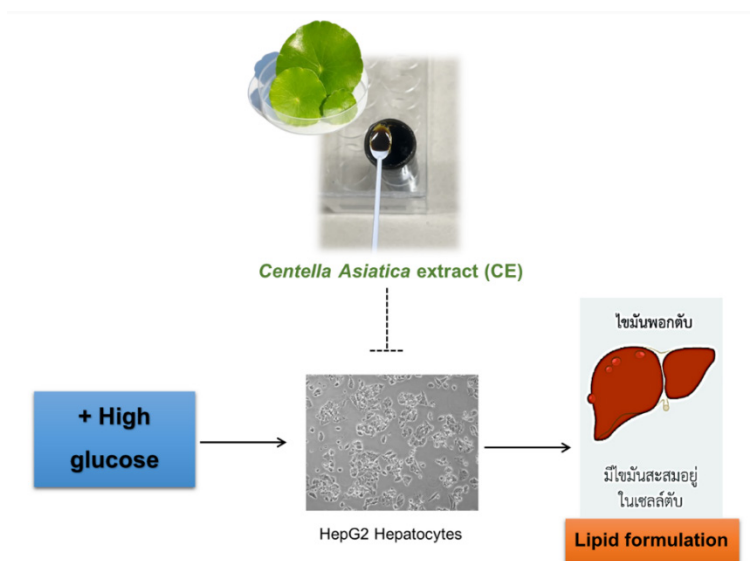
บทนำ

ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดและส่งเสริมการดำเนินของภาวะโรคอ้วนและกลุ่มอาการเมแทบอลิก (Metabolic Syndromes) กลุ่มอาการเมแทบอลิกเป็นภาวะที่ประกอบด้วยลักษณะทางคลินิกหลายประการ ได้แก่ ความดันโลหิตสูง ภาวะดื้อต่อกลูโคส ไขมันในเลือดผิดปกติ และภาวะอ้วนลงพุง ซึ่งมีแนวโน้มพบได้มากขึ้นในยุคปัจจุบัน (Moreno-Fernandez et al., 2018) การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงส่งผลต่อการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของกลุ่มอาการเมแทบอลิก และเป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (T2DM) และโรคหัวใจและหลอดเลือด (Li et al., 2025) สำหรับบุคคลที่มีภาวะโรคอ้วน ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงอาจกระตุ้นให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและการอักเสบ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบเมแทบอลิซึม (Moreno-Fernandez et al., 2018) ความเกี่ยวข้องระหว่างระดับกลูโคสที่สูงกับโรคอ้วน ก่อให้เกิดวงจรที่เสริมซึ่งกันและกัน โดยที่ความผิดปกติของการเผาผลาญส่งผลให้เกิดการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นและภาวะทนต่อกลูโคสบกพร่อง (Asgari et al., 2024) การศึกษาผลกระทบของระดับน้ำตาลที่สูงต่อภาวะดังกล่าวจึงเป็นประเด็นที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาแนวทางการป้องกันและรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ กระบวนการไลโปเจเนซิส (Lipogenesis) ซึ่งเป็นกลไกเมแทบอลิซึมที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดไขมัน มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลในเลือด โดยเฉพาะในเซลล์ตับ HepG2 (hepatocytes) เมื่อมีระดับกลูโคสในเลือดสูง เซลล์ตับจะเพิ่มการสร้างกรดไขมันผ่านกระบวนการ de novo lipogenesis ซึ่งเป็นเส้นทางที่เปลี่ยนกลูโคสส่วนเกินให้กลายเป็นกรดไขมัน และถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไตรกลีเซอไรด์ (Viscarra & Sul, 2020) การสะสมของไขมันในลักษณะนี้หรือที่เรียกว่า Hepatosteatosis มีความเกี่ยวข้องกับภาวะดื้อต่ออินซูลินและการเกิดโรคเมแทบอลิกต่างๆ เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ดังนั้น การศึกษากลไกที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงกระตุ้นกระบวนการไลโปเจเนซิสในเซลล์ตับจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการพัฒนาวิธีการรักษาโรคในกลุ่มเมแทบอลิกอย่างมีประสิทธิภาพ

พืชสมุนไพรบัวบก (*Centella Asiatica*) ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในภูมิปัญญาการแพทย์แผนโบราณ ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันจากคุณสมบัติในการยับยั้งการสะสมของไขมัน งานวิจัยพบว่าสารสกัดจากบัวบกสามารถลดการสะสมของไขมันในร่างกายได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยการควบคุมสมดุลของคอเลสเตอรอลและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญของไขมัน (Chang et al., 2023) สารออกฤทธิ์สำคัญในบัวบก เช่น Asiatic acid สามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการสร้างกรดไขมัน ได้แก่ Fatty acid synthase ซึ่งมีผลลดการสังเคราะห์ไขมัน (Chang et al., 2023) นอกจากนี้ บัวบกยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งช่วยลดความเครียดออกซิเดชันที่เป็นปัจจัยหนึ่งของการสะสมไขมันและภาวะเมแทบอลิกผิดปกติ จากการศึกษาทดลองในสัตว์พบว่าสารสกัดจากบัวบกสามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งสนับสนุนกับบทบาทของพืชสมุนไพรชนิดนี้ในการควบคุมระดับไขมัน (Kumari et al., 2016) การทำความเข้าใจกระบวนการที่สารสกัดจากบัวบกมีผลต่อการยับยั้งการสะสมไขมันจึงมีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนายา หรือผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในอนาคต

จากผลการศึกษาในด้านกลไกการสร้างไขมันในเซลล์ พบว่าสารสมุนไพรตำรับบัวบก (Herbal Extract of *Centella Asiatica*) สามารถลดปริมาณการสะสมของไขมันในเซลล์ตับชนิด HepG2 ได้ที่ความเข้มข้น 50-100 µg/mL และมีฤทธิ์ในการรักษาโรค Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) ในการทดลองของสัตว์ทดลอง (Ha et al., 2023) ในด้านของการศึกษาผลของไขมันสะสมต่อการทำให้เกิดการตายของเซลล์ชนิด apoptosis มีงานวิจัยพบว่าพืชสมุนไพรบัวบก (*Centella Asiatica*) สามารถช่วยลดอัตราการตายของเซลล์ตับชนิด HepG2 ที่เกิดจากการกระตุ้นจากการสร้างไขมัน (lipid biosynthesis) ที่ความเข้มข้น 20, 40, และ 80 µg/mL (Huang et al., 2024) จากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ การศึกษานี้จึงทำการทดลองในเซลล์ตับชนิด HepG2 ที่ได้รับสารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* Crude Extract (CE) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรชนิดนี้ในด้านการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ตับในสภาวะที่ได้รับน้ำตาลสูง (High Glucose) ในด้านการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดจากบัวบกสามารถลดการสะสมของไขมันในหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีไขมันและน้ำตาลสูง โดยสารสกัดดังกล่าวมีผลต่อการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมคอเลสเตอรอลและการเผาผลาญไขมัน เช่น PPAR γ และ Fatty Acid Synthase (FAS)

(Chang et al., 2023) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงคุณสมบัติในการปกป้องตับของสาร Asiaticoside ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญใน บัวบก พบว่าสามารถยับยั้งการสะสมไขมันและการอักเสบในเซลล์ตับได้ โดยลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ กระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน ได้แก่ LDLR และ LXR α (Park, 2023) ทั้งนี้ สารสกัดจากบัวบกยังสามารถลดระดับของไซโตไคน์ที่ กระตุ้นการอักเสบ เช่น interleukin-1 β และ tumor necrosis factor- α ซึ่งส่งเสริมศักยภาพในการป้องกันการสะสมของไขมันและ ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบเมแทบอลิซึม (Park, 2023) จากหลักฐานข้างต้น ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากบัวบกมีแนวโน้มที่จะเป็น สารจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการสะสมของไขมัน และการป้องกันโรคตับที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบ เมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของพืชสมุนไพรบัวบก (*Centella Asiatica*) ต่อการช่วยฟื้นฟูการสะสมของ ไขมันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงชนิด Hepatocytes HepG2 ในสภาวะน้ำตาลสูง ดังในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ภาพรวมโครงการวิจัยการศึกษายาทบพาทและกลไกการทำงานของสารสกัดบัวบกต่อภาวะอ้วน กลุ่มอาการทางเมแทบอลิก ผ่านกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ HepG2 (Hepatocyte) และการให้สารสมุนไพรในเซลล์เพาะเลี้ยง

1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ตับ HepG2 (Hepatocyte) ATCC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose (DMEM) ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% Penicillin/Streptomycin นำเซลล์ HepG2 จาก stock มา thaw เซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 1 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการ thaw ปริมาตร 1 ml มาใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 15 ml ที่มีอาหาร DMEM 9 ml (ปริมาตรรวม 10 ml) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ปิดส่วน supernatant ออก 9 ml และเติมอาหาร DMEM 5 ml จากนั้น ผสมในหลอดให้เข้ากันโดยเปิดขึ้น-ลงเบาๆ และเปิดใส่ขวด เพาะเลี้ยงเซลล์ T75 ที่มีอาหาร DMEM 10 ml จากนั้นบ่มในตู้บ่มชนิดที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C เปลี่ยนอาหาร ทุก 2-3 วัน จนเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น confluent monolayer 80% ขึ้นไป เพื่อนำมาบ่มสารสกัดและทำการทดลองต่อไป

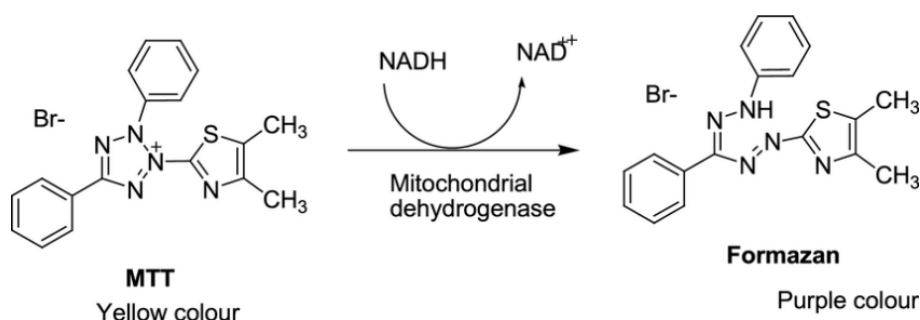
1.2 การให้สารสมุนไพรในเซลล์เพาะเลี้ยง

จากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า พืชสมุนไพรบัวบก (*Centella Asiatica*) สามารถช่วยลดการสร้างไขมัน (lipid biosynthesis) ในเซลล์ตับได้ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 20-100 $\mu\text{g/mL}$ (Ha et al., 2023; Huang et al., 2024) การศึกษานี้จึงทำการทดลองในเซลล์ตับชนิด HepG2 ที่ได้รับสารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* crude extract (CE) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในด้านการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ตับในสภาวะที่ได้รับน้ำตาลสูง (High Glucose)

2. การทดสอบผลของสารสกัดบัวบกต่อการรอดชีวิตของเซลล์ตับ HepG2 (Cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

2.1 หลักการของ MTT assay

เป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้ในการประเมินความมีชีวิตของเซลล์โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสี น้ำยา MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) มีลักษณะเป็น Tetrazolium salt สีเหลืองอ่อน เมื่อเซลล์มีชีวิตที่มี metabolically active ดี จะสามารถรีดักชัน MTT ให้กลายเป็นฟอร์มาซาน (formazan) ดังในภาพที่ 2 ซึ่งมีสีม่วงเข้มได้กระบวนการรีดักชันนี้ขึ้นอยู่กับ Cellular oxidoreductase enzymes ที่ต้องพึ่งพา NAD(P)H ซึ่งพบได้เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานตามปกติ เซลล์ที่แข็งแรงและแบ่งตัวเร็วจะมีอัตราการเปลี่ยน MTT เป็นฟอร์มาซานสูง ขณะที่เซลล์ที่ตายหรือไม่มี Metabolism จะไม่สามารถทำปฏิกิริยานี้ได้ ผลผลิตสุดท้ายฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจะไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ง่ายในตัวทำละลายอย่าง DMSO เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของสีม่วงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 หรือ 570 นาโนเมตร โดยความเข้มของสีม่วงจะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Prabst et al., 2017)



ภาพที่ 2 กระบวนการที่สารประกอบ MTT (สีเหลือง) เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ formazan (สีม่วง)

ที่มา: Beniwal et al. (2022)

2.2 วิธีการทดสอบ cytotoxicity และตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay

เซลล์ HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cells) ถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well plate ที่ความหนาแน่น 1×10^5 cell/ml และบ่มในตู้บ่ม CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เดิมออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM) ที่เติมสารตัวอย่างในความเข้มข้น 25 mM และ 50 mM ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ จากนั้นนำเพลทไปบ่มในตู้ CO_2 5% ที่ 37 °C อีกเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อมาเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่ยังมีชีวิตเปลี่ยน MTT เป็นผลิตภัณฑ์ formazan หลังจากนั้นทำการดูดของเหลวออก แล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 μL ลงในแต่ละหลุม เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ formazan ที่เกิดขึ้น ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาแบบไมโครเพลท (Microplate Reader: VICTOR® Nivo™ Plate Readers, Multi-Mode) (Li et al., 2024) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ตามสมการ:

$$\% \text{ Cell viability} = (\text{OD570 of treated cells} / \text{OD570 control}) \times 100$$

โดยทดสอบ สารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* Extract (CE) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง ในสถานะที่เป็น High glucose (ความเข้มข้น 50 mM) อย่างเดียว เป็นกลุ่มควบคุม และเซลล์ตับที่ได้รับสารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* extract (CE) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL

3. การวิเคราะห์ผลขนาดไขมันในเซลล์ตับ (Lipogenesis) และรูปร่างของเซลล์ (Cell Morphology)

3.1 การตรวจสอบการสะสมของไขมัน (Lipogenesis) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 ด้วยวิธีการย้อม Oil Red O

(Oil Red O Stain) ทำการดูด medium ใน conditions เดียวกันทั้ง ปริมาณ 500 µl จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 1x (Phosphate-Buffered Saline) ทำการ Fix เซลล์ด้วย 4% Formaldehyde 500 µl ทุกหลุมที่ทำทดสอบด้วยวิธีการย้อม Oil red O แล้วเติมสารละลาย 60% isopropanol ลงไปแล้วล้างออก ย้อมสีโดยการเติม Oil Red O Stain ทั้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งไม่มีสีที่ตกตะกอน และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้โปรแกรม ImageJ ในการ Analyze ออกมาเป็นค่า %Area of Positive Oil Red O (Kaczmarek et al., 2024)

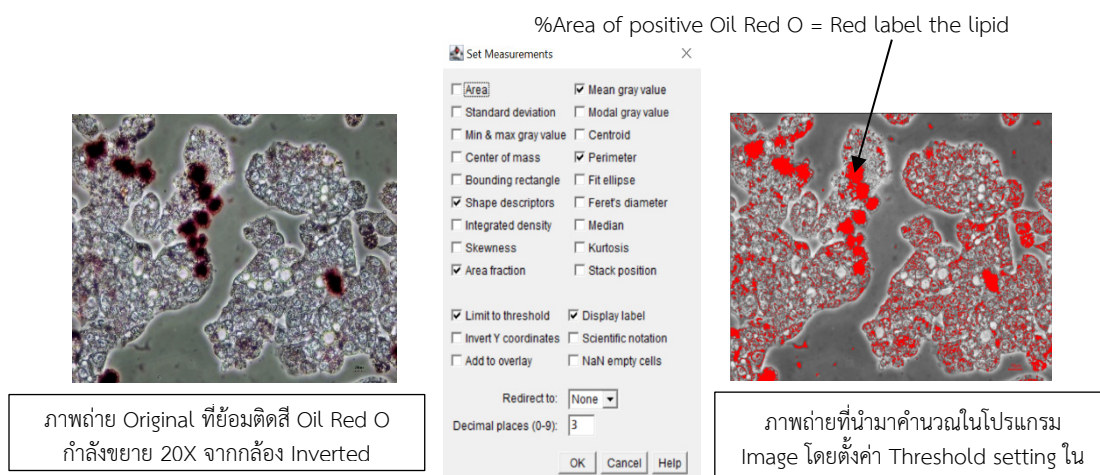
3.2 การตรวจสอบขนาดของเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 ด้วยวิธีการย้อม Giemsa (Giemsa Stain)

ทำการดูด medium ใน conditions เดียวกันทั้ง ปริมาณ 500 µl จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 1x (phosphate-buffered saline)

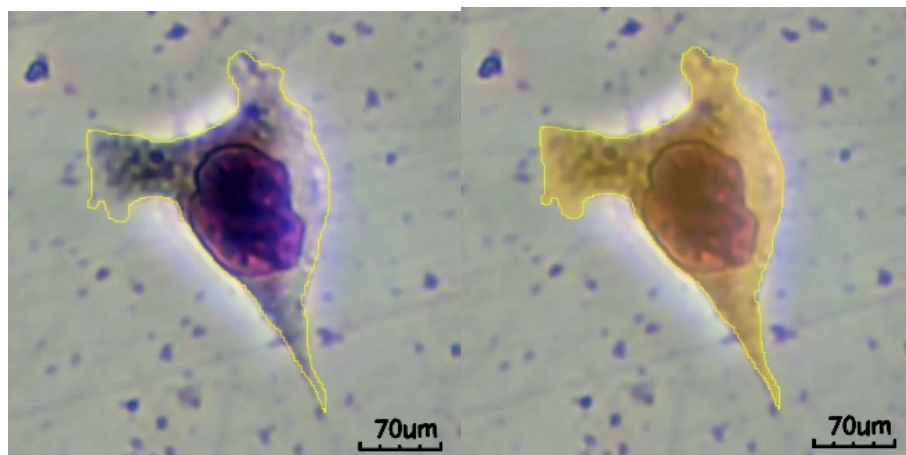
ทำการ Fix เซลล์ด้วย Methanol ทุกหลุมที่ทำทดสอบด้วยวิธีการย้อม Giemsa ย้อมด้วยสี Giemsa ประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งไม่มีสีที่ตกตะกอน และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้โปรแกรม ImageJ ในการ analyze ออกมาเป็นค่า เส้นรอบวง (Perimeter) และพื้นที่ของเซลล์ (Cell area) โดยเทียบความยาวจาก Scale Bar (µm) (Barna et al., 2021)

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง (Analysis of Experimental Cell) เซลล์ตับ HepG2 (Hepatocyte)

รูปที่ถ่ายจากกล้อง Inverted Microscope จะนำมาคำนวณโดยใช้โปรแกรม ImageJ ในการ Analyze ออกมาเป็นค่า %Area of positive Oil Red O (Kaczmarek et al., 2024; Li et al., 2022) ดังแสดงในภาพที่ 3 และค่าเส้นรอบวง (Perimeter) และพื้นที่ของเซลล์ (Cell Area) โดยเทียบความยาวจาก scale bar (µm) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 การตั้งค่าการวัด %Area of positive Oil Red O และรูปตัวอย่างในโปรแกรม ImageJ



ภาพที่ 4 การวัดค่าเส้นรอบวงของเซลล์ (Cell Perimeter) และพื้นที่ของเซลล์ (Cell Area) ในโปรแกรม ImageJ

4. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย (Megha et al., 2022)

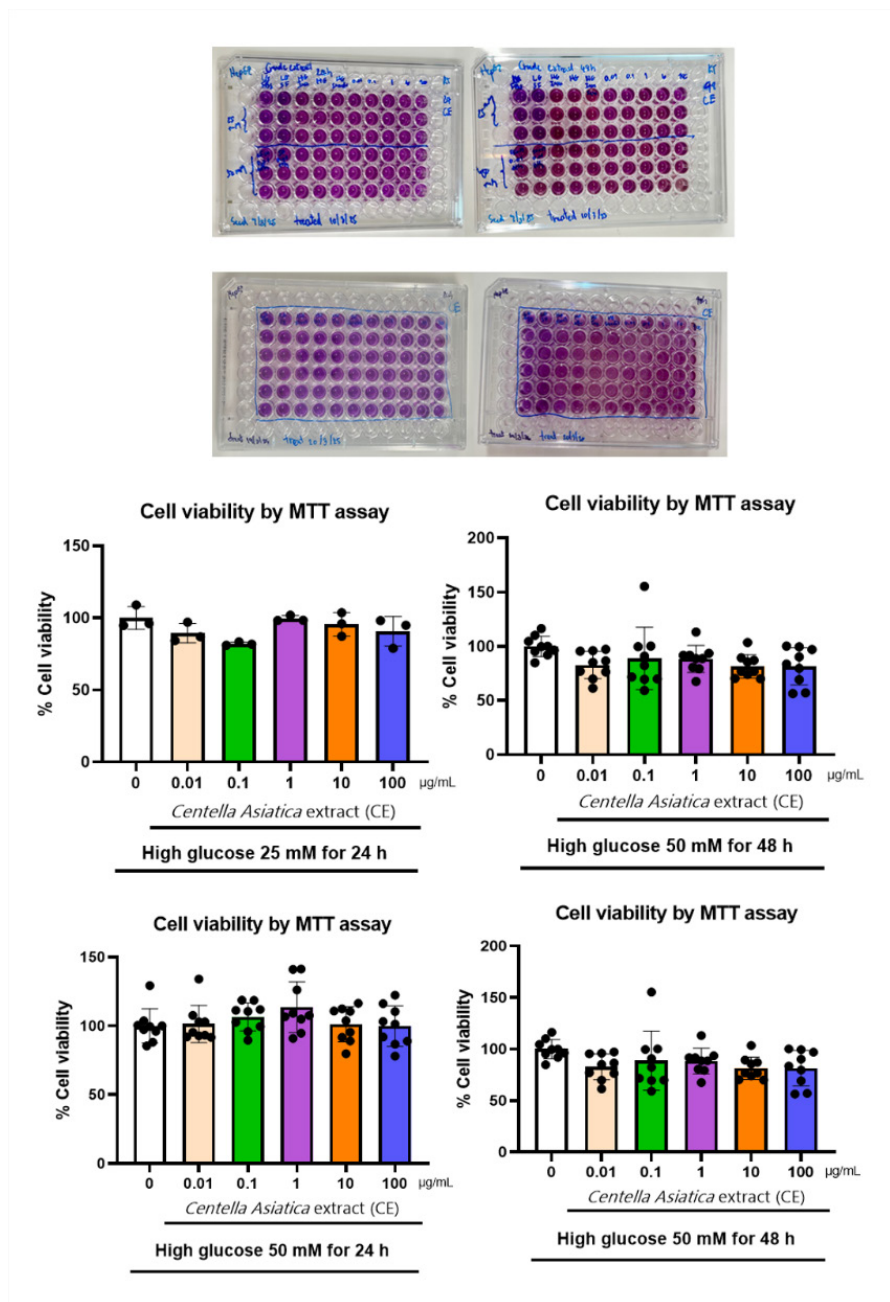
การทดลองนี้จัดทำขึ้นโดยมีการทำซ้ำ ≥ 3 ซ้ำต่อการทดลอง และมีผู้ทำการทดลองอย่างน้อย 3 คน

สัญลักษณ์ $*p < 0.05$ เป็นการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Low Glucose) โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Mann-Whitney t -Test

สัญลักษณ์ $\#p < 0.05$ เป็นการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เทียบกับกลุ่มสภาวะน้ำตาลสูงอย่างเดียว (High Glucose) โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way ANOVA Test (High glucose vs *Centella Asiatica* Extract (CE) Treatment With High Glucose)

ผลและอภิปรายผล

จากการศึกษาผลของสารสกัดบัวบก (*Centella Asiatica*) และการเหนี่ยวนำด้วยภาวะ High Glucose ต่อเซลล์ พบว่าผลของสารสกัดบัวบก CE ไม่ได้ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ตามที่แสดงในภาพที่ 5 โดยค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ (% Cell Viability) ที่ตรวจด้วยการทดสอบ MTT Assay ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละกลุ่มทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดบัวบก (CE) และน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนั้น ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ และสามารถนำมาใช้ในปริมาณดังกล่าวเพื่อศึกษาผลกระทบในด้านอื่นๆ ต่อไปได้



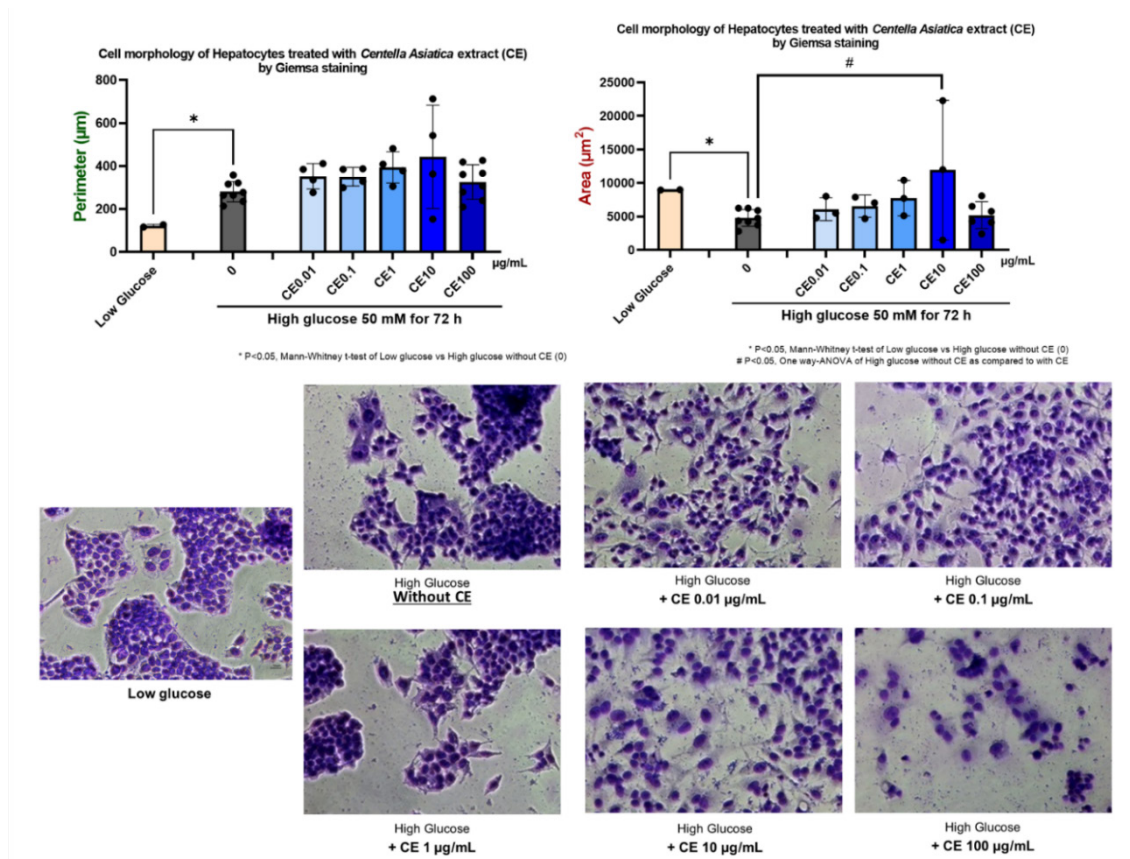
ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดหยาบ (CE) ต่อความมีชีวิตของเซลล์ภายใต้ภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงโดยการทดสอบ MTT assay

โดยทดสอบ สารสกัดยับวก *Centella Asiatica* Extract (CE) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่เป็น High glucose (ความเข้มข้น 25 และ 50 mM) ไม่ได้รับสารสกัดยับวก ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม และเซลล์ดับที่ได้รับสารสกัดยับวก *Centella Asiatica* Extract (CE) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL ในสภาวะเป็น High Glucose (ความเข้มข้น 25 และ 50 mM)

จากภาพที่ 6 แสดงให้เห็นถึงการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยใช้การวัด Perimeter และ Cell Area พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ High Glucose นั้น มีขนาดเส้นรอบวง (Perimeter) ของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Low Glucose ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเกิดการยืดขยายในลักษณะของการมีแขนงหรือกิ่งก้านมากขึ้น (Cell Protrusion/Morphological Branching) อย่างไรก็ตาม ค่า Cell Area หรือพื้นที่ของเซลล์กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน

กลุ่ม High Glucose เมื่อเทียบกับกลุ่ม Low Glucose (* P-value < 0.05) ซึ่งสอดคล้องกับการที่เซลล์เปลี่ยนรูปร่างโดยที่มีการยืดแขนงออกไป แต่อาจจะไม่ได้เพิ่มขนาดของตัวเซลล์หลัก โดยสรุปคือ สภาวะ High Glucose กระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปในทิศทางที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อความเครียดหรือการเหนี่ยวนำให้เกิดการยืดขยายของโครงสร้างภายในเซลล์

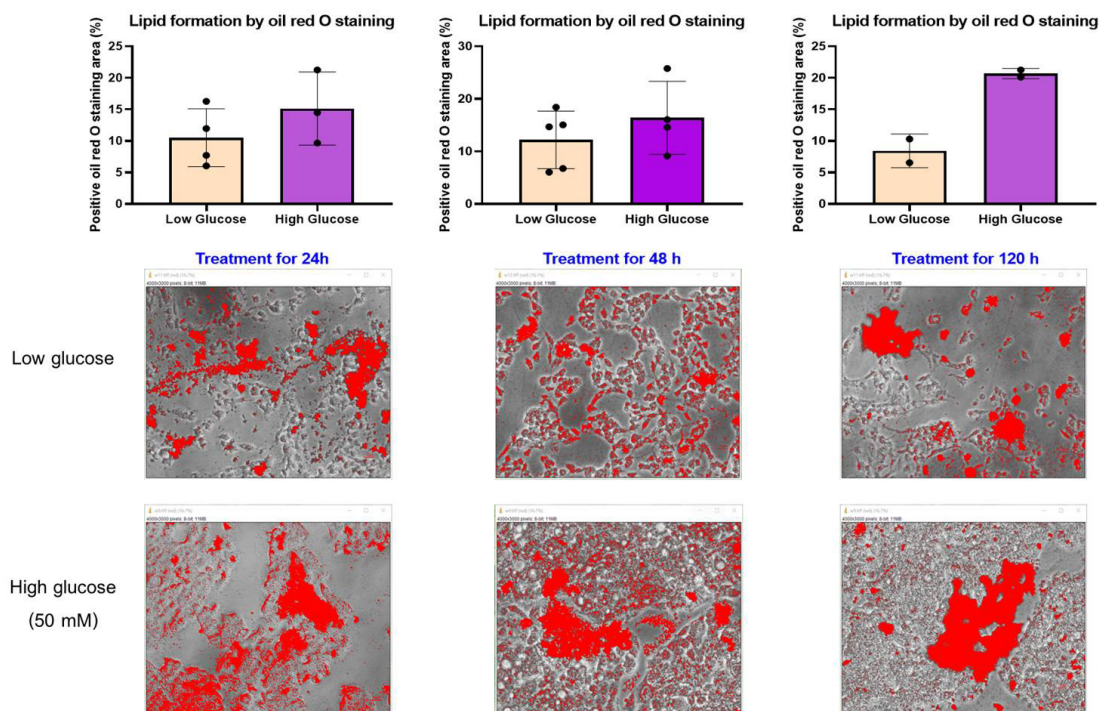
นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบ Cell Area ระหว่างกลุ่ม High Glucose กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบก CE 10 µg/mL พบว่าในกลุ่ม High Glucose ที่มีสารสกัดบัวบก CE 10 µg/mL ร่วมด้วยนั้นมีพื้นที่เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ High Glucose เพียงอย่างเดียว (# P-value < 0.05) ซึ่งอาจสะท้อนถึงบทบาทของสารสกัดบัวบก CE 10 µg/mL ในการยับยั้งหรือปรับสมดุลผลกระทบที่เกิดจากภาวะ High Glucose โดยช่วยลดการหดตัวหรือการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ให้กลับคืนสู่ลักษณะที่ใกล้เคียงปกติมากขึ้น



ภาพที่ 6 ผลการทดสอบผลของสารสกัดใบบัวบกต่อรูปร่างของเซลล์ตับ HepG2 (Cell morphology) ด้วยวิธี Giemsa staining โดยทดสอบ สารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* extract (CE) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 72 ชั่วโมง ในสภาวะที่เป็น High glucose (ความเข้มข้น 50 mM) ไม่ได้รับสารสกัดบัวบก ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม และเซลล์ตับที่ได้รับสารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* extract (CE) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL ในสภาวะเป็น High glucose (ความเข้มข้น 50 mM)

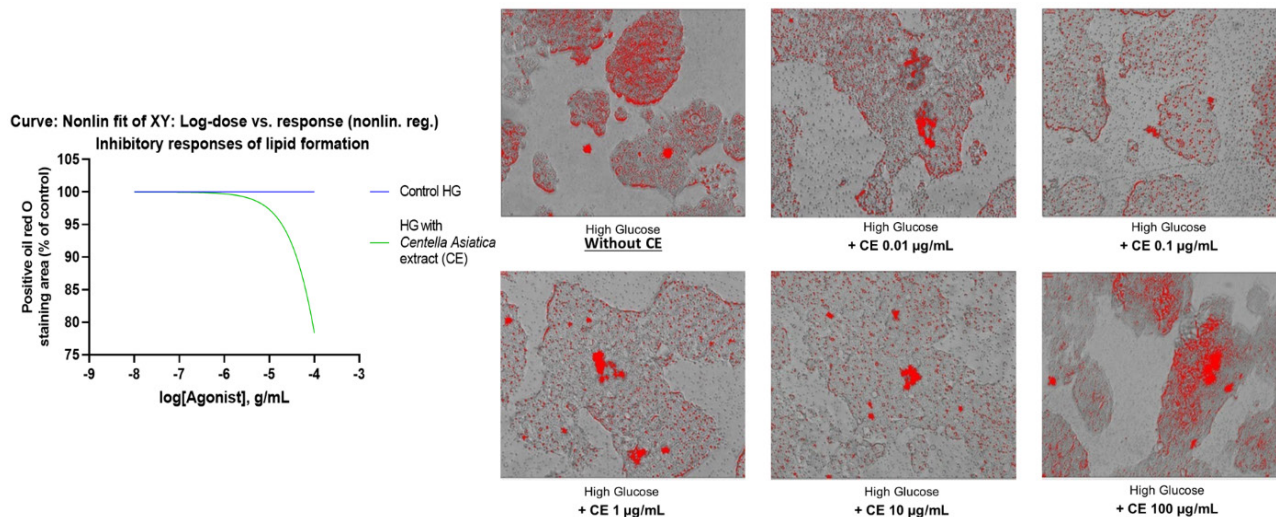
ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการลดภาวะไขมันในเซลล์ตับ การทดลองนี้มีการทดสอบสภาวะน้ำตาลสูงในเซลล์ที่ก่อให้เกิดการสร้างไขมันที่เพิ่มขึ้น ก่อนการทดสอบสารสกัดบัวบก เพื่อเป็นการยืนยันการเหนี่ยวนำให้สร้างไขมันในเซลล์ได้จากสภาวะน้ำตาลสูง โดยได้ทำการทดสอบผลของสภาวะน้ำตาลสูง (High Glucose) ต่อเซลล์ตับ HepG2 (Cell morphology) ต่อการสร้างไขมันในเซลล์ โดยการวัดด้วยวิธี Oil Red O (% Positive Oil Red O Staining Area) โดยทดสอบ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 24, 48, และ 120 ชั่วโมง ในสภาวะที่เป็น High glucose (ความเข้มข้น 50 mM) เทียบกับกลุ่มเซลล์ในสภาวะน้ำตาลต่ำ (Low

Glucose) จากภาพที่ 7 พบว่าสภาวะน้ำตาลสูง (High Glucose) ในเซลล์ตับ HepG2 ทำให้มีค่า % Positive Oil Red O Staining Area เพิ่มขึ้นในทุกเวลาทดสอบ (24, 48, และ 120 ชั่วโมง) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เซลล์ในสภาวะน้ำตาลต่ำ (Low Glucose) เป็นการยืนยันว่าสภาวะน้ำตาลสูงทำให้เกิดการสร้างไขมันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงได้จริง



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบผลของสภาวะน้ำตาลสูง (High glucose) ต่อเซลล์ตับ HepG2 (Cell morphology) ต่อการสร้างไขมันในเซลล์ โดยการวัดด้วยวิธี Oil Red O (% Positive oil red o staining area) โดยทดสอบ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 24, 48, และ 120 ชั่วโมง ในสภาวะที่เป็น High glucose (ความเข้มข้น 50 mM) เทียบกับกลุ่มเซลล์ในสภาวะน้ำตาลต่ำ (Low glucose)

จากนั้นจึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดบับกต่อการลดภาวะไขมันในเซลล์ตับ ภาพที่ 8 แสดงผลของสารสกัดบับก CE ต่อปริมาณไขมันในเซลล์ พบว่าเส้นกราฟของกลุ่มควบคุม (เส้นสีฟ้า: Control High Glucose หรือ HG) ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงว่าไม่มีผลในการยับยั้งการสะสมของไขมัน (lipid accumulation) อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดบับก CE 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ (เส้นสีเขียว: HG with Centella Asiatica Extract (CE)) มีแนวโน้มของการลดลงของปริมาณไขมันในช่วงความเข้มข้นที่ 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ แสดงถึงความสามารถของสารสกัดบับก CE ในการลดการสะสมของไขมันภายในเซลล์ โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสะสมไขมันได้ 50% (IC₅₀%) ซึ่งพบว่าประมาณอยู่ที่ 360 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดบับก CE มีศักยภาพในการนำไปใช้เพื่อควบคุมหรือป้องกันการสะสมไขมันภายใต้สภาวะที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรัง เช่น เบาหวานชนิดที่ 2 หรือภาวะไขมันพอกตับ (NAFLD)



ภาพที่ 8 ผลการทดสอบผลของสารสกัดใบบัวบกต่อการสร้างไขมันในเซลล์ (Lipogenesis) ของเซลล์ตับ HepG2 โดยการวัดด้วยวิธี Oil Red O (% Positive Oil Red O Staining Area) โดยทดสอบ สารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* Extract (CE) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ 24 ชั่วโมง ในสถานะที่เป็น High Glucose (ความเข้มข้น 50 mM) ไม่ได้รับสารสกัดบัวบก ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม และเซลล์ตับที่ได้รับสารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* Crude Extract (CE) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL ในสถานะเป็น High Glucose (ความเข้มข้น 50 mM)

สรุปผล

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วยสถานะน้ำตาลสูง (High Glucose) สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของเซลล์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ ขณะเดียวกันสารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* Crude Extract (CE) ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL มีแนวโน้มในการช่วยปกป้องหรือฟื้นฟูรูปร่างของเซลล์ให้กลับคืนสู่ภาวะปกติ นอกจากนี้สารสกัดบัวบก *Centella Asiatica* Crude Extract (CE) ยังแสดงศักยภาพในการลดการสะสมของไขมันภายในเซลล์ ที่ความเข้มข้นในช่วงประมาณ 360 µg/mL จึงมีแนวโน้มที่ดีต่อการนำไปใช้ในเชิงบำบัดหรือป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเมแทบอลิซึมไขมันในตับต่อไป

ข้อจำกัดและมุมมองงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง (*In vitro* model) เพื่อเป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพร ในด้านประสิทธิภาพในการป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการก่อโรค (Preventive Agent) ผ่านการคัดกรองและหาสารชีวโมเลกุลเบื้องต้นที่สามารถระบุได้ถึงภาวะไขมันสะสมในตับ โดยสามารถศึกษาในระดับ Mechanism Of Action ได้ อาทิเช่น การศึกษา Lipid Accumulation ในเซลล์ตับ, พยาธิสภาพของเซลล์ตับ, และอัตราการตายของเซลล์โดยดูจากกลไกการทำงานของเอนไซม์ Cellular Oxidoreductase Enzymes ทั้งนี้งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของการทดสอบสารนี้ในระดับ Systemic Circulation เพื่อศึกษาการเกิด Drug Distribution ยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากต้องใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาดังกล่าว

สำหรับการต่อยอดการวิจัยนี้ การทดลองในสัตว์ทดลองจะเป็นแนวทางในการทดสอบสารนี้ในระดับ systemic circulation เพื่อศึกษาการเกิด Drug Distribution ต่อไปเพื่อสนับสนุนให้สารสมุนไพรมีหลักฐานเชิงประจักษ์ในการช่วยป้องกันโรคทางเมแทบอลิกได้น่าเชื่อถือมากขึ้น โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาสารสมุนไพรนี้ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะอ้วน พบว่าสารสมุนไพรนี้มีผลช่วยลด Body Fat Accumulation ที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นของอาหาร High-Fat กับ High-Sugar ซึ่งทางผู้วิจัยคาดว่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่สารสมุนไพรนี้จะสามารถช่วยลด fat accumulation ในตับของสัตว์ทดลองได้เช่นเดียวกัน (Chang et al., 2023)

Ethic Committee No. (If Available)

การทดลองนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการวิจัยในมนุษย์และสัตว์ทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยเรื่อง “การศึกษาบทบาทและกลไกการทำงานของสารสกัดบัวบกต่อภาวะอ้วน กลุ่มอาการทางเมแทบอลิก ผ่านกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง” ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงต่อ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในโครงการนี้ โดยโครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ (ทุนสนับสนุนงานวิจัยมูลฐานโดยกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปีงบประมาณ พ.ศ.๒๕๖๘) (FRB๖๘๐๐๖๔/๐๒๔๐ รหัสโครงการ ๒๐๖๖๗๓) This research project is supported by Chulabhorn Royal Academy (Fundamental Fund by National Science Research and Innovation Fund (NSRF): fiscal year 2025) (FRB680064/0240 Project code 206673)

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณอย่างจริงใจต่อ คณะแพทยศาสตร์ศรีสวางควัฒน ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ อุปกรณ์ อำนวยความสะดวกในการดำเนินโครงการวิจัย และให้คำปรึกษาทางวิชาการอย่างต่อเนื่อง รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โรงเรียนสุราษฎร์พิทยา โรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาภรณราชวิทยาลัย ลพบุรี ที่ให้ความร่วมมือในการแลกเปลี่ยนประสบการณ์ ให้ผู้วิจัยได้ทำงานร่วมกับคณาจารย์อย่างเต็มศักยภาพ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจต่อทุกแรงสนับสนุนทั้งทางตรงและทางอ้อมที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอแสดงความขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วยความเคารพอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

- Asgari, S., Molavizadeh, D., Soltani, K., Khalili, D., Azizi, F., & Hadaegh, F. (2024). The impact of obesity on different glucose tolerance status with incident cardiovascular disease and mortality events over 15 years of follow-up: a pooled cohort analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 16(1), 27.
- Barna, R. F., Mackei, M., Paszti-Gere, E., Neogrady, Z., Jerzsele, A., & Matis, G. (2021). The effects of matriptase inhibition on the inflammatory and redox homeostasis of chicken hepatic cell culture models. *Biomedicines*, 9(5), 450.
- Beniwal, M., Jain, N., Jain, S., & Aggarwal, N. (2022). Design, synthesis, anticancer evaluation and docking studies of novel 2-(1-isonicotinoyl-3-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-3-phenylthiazolidin-4-one derivatives as Aurora-A kinase inhibitors. *BMC Chemistry*, 16(1), 61.
- Chang, Y. B., Ahn, Y., Seo, D., Bae, S., Suh, H. J., Hong, Y. H., & Jung, E. Y. (2023). Centella asiatica lowers body fat accumulation via regulating cholesterol homeostasis- and lipid metabolism-related genes in mice with high-fat, high-sugar diet-induced obesity. *Applied Biological Chemistry*, 66(1), 88.
- Ha, S. K., Lee, J. A., Kim, D., Yoo, G., & Choi, I. (2023). A herb mixture to ameliorate non-alcoholic fatty liver in rats fed a high-fat diet. *Heliyon*, 9(8), e18889.
- Huang, J., Cao, X., Wu, W., Han, L., & Wang, F. (2024). Investigating the proliferative inhibition of HepG2 cells by exosome-like nanovesicles derived from Centella asiatica extract through metabolomics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 176, 116855.
- Kaczmarek, I., Suchy, T., Strnadova, M., & Thor, D. (2024). Qualitative and quantitative analysis of lipid droplets in mature 3T3-L1 adipocytes using oil red O. *STAR Protocols*, 5(2), 102977.

- Kumari, S., Deori, M., Elancheran, R., Kotoky, J., & Devi, R. (2016). *In vitro* and in vivo antioxidant, anti-hyperlipidemic properties and chemical characterization of *Centella asiatica* (L.) extract. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 400.
- Li, Q., Tan, J. X., He, Y., Bai, F., Li, S. W., Hou, Y. W., Ji, L. S., Gao, Y. T., Zhang, X., Zhou, Z. H., Yu, Z., Fang, M., Gao, Y. Q., & Li, M. (2022). Atractylenolide III ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by activating hepatic adiponectin receptor 1-mediated AMPK pathway. *International Journal of Biological Sciences*, 18(4), 1594-1611.
- Li, S., Xia, R., Gong, X., Wang, C., Liu, H., Dong, H., Su, Z., Liang, Y., Wang, S., & Yang, T. (2025). Mediating effect of TyG index on the association between glucose-lipid metabolism-related dietary pattern and T2DM: A propensity score-matched analysis. *BMC Endocr Disord*, 25(1), 114.
- Li, Z., Yang, J., Sun, Y., Han, S., Gong, J., Zhang, Y., Feng, Z., Yao, H., & Shi, P. (2024). Schisandra chinensis bee pollen extract inhibits proliferation and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells via ferroptosis-, wnt-, and focal adhesion-signaling pathways. *Drug Design, Development and Therapy*, 18, 2745-2760.
- Megha, K. B., Swathi, S., Joseph, X., Vandana, U., & Mohanan, P. V. (2022). Cytocompatibility of Pluronic F-127 on adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549 cells). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(47), 71124-71135.
- Moreno-Fernandez, S., Garcés-Rimón, M., Vera, G., Astier, J., Landrier, J. F., & Miguel, M. (2018). High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*, 10(10), 1502.
- Park, D. W., Jeon, H., Kwon, J. E., Lee, Y. G., So, R., Choe, T. H., Jeong, Y. J., & Kang, S. C. (2020). Hepatoprotective effect of *Centella asiatica* 50% ethanol extract against acetaminophen-induced acute liver injury in BALB/c mice. *Toxicological research*, 37(2), 261–275.
- Prabst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hubner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods in Molecular Biology*, 1601, 1-17.
- Viscarra, J., & Sul, H. S. (2020). Epigenetic Regulation of Hepatic Lipogenesis: Role in Hepatosteatosis and Diabetes. *Diabetes*, 69(4), 525-531.