บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ก็เพื่อศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิวของสารสกัดจากแก่นสาเก สาเกที่ปลูกในจังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย ถูกนำมาสกัดโดยใช้ไดเอทธิล อีเทอร์ เพื่อทำการแยกอาร์โทคาร์ปินซึ่งเป็นสารหลักที่พบในแก่นสาเก สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดแก่นสาเกด้วยไดเอทธิล อีเทอร์ ถูกนำมาตกผลึกซ้ำด้วย ไดเอทธิล อีเทอร์/เฮกเซน และเมทธานอล ตามลำดับ โดยการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เราพบว่าในสารสกัดหยาบมีอาร์โทคาร์ปินอยู่ 49.0 ± 3.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณอาร์โทคาร์ปินที่แยกได้คิดเป็น 2.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบความเข้มข้น 2, 10, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอาร์โทคาร์ปินความเข้มข้น 0.98, 4.9, 12.3, 24.5, 49 และ 73.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนไซต์ และเคอราติโนไซต์ โดยใช้หลักการที่เซลล์มีชีวิตจะไม่ย้อมติดสีทริปเพน บลู และวิธีเอ็กซ์ทีที (เป็นการวัดการทำงานของไมโตคอนเดรีย) ตามลำดับ เราพบว่าทั้งสารสกัดหยาบและอาร์โทคาร์ปินไม่เป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์หลังจากถูกบ่มการสารที่ทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และอาร์โทคาร์ปินที่ความเข้มข้นมากกว่า 4.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (12.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลดจำนวนเซลล์เมลาโนไซต์ที่มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถูกบ่มการสารที่ทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเหตุนี้สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอาร์โทคาร์ปินที่ความเข้มข้น 4.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำมาใช้ในการศึกษาอื่นๆ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อความสามารถในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิว เซลล์เมลาโนไซต์และเคอราติโนไซต์ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกันถูกนำมาใช้ในการศึกษาและความสามารถในการยับยั้งประเมินโดยการวัดปริมาณเม็ดสีที่ถูกผลิตโดยเมลาโนไซต์ ในการศึกษานี้เซลล์ถูกบ่มกับแอลฟา-เอ็มเอสแอช ความเข้มข้น 1 นาโนโมลาร์ หลังจากที่เซลล์จะถูกบ่มกับสารสกัดหยาบ (ความเข้มข้น 10, 5, 2.5 และ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือ อาร์โทคาร์ปิน (ความเข้มข้น 4.9, 2.45, 1.23 และ 0.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีโดยแอลฟา-เอ็มเอสแอช) หรือเซลล์ถูกบ่มกับแอลฟา-เอ็มเอสแอชพร้อมกับสารสกัดหยาบ หรืออาร์โทคาร์ปินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยแอลฟา-เอ็มเอสแอช) โคจิค แอซิดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำมาใช้เป็นสารเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตเม็ดสี เราพบว่าทั้งสารสกัดหยาบและอาร์โทคาร์ปินมีผลทั้งในเชิงป้องกันและยับยั้ง เป็นที่น่าสนใจที่พบว่าสารสกัดหยาบสามารถลดปริมาณเม็ดสีในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ในขณะที่ไม่พบลักษณะเช่นนี้ในกลุ่มของเซลล์ที่บ่มกับอาร์โทคาร์ปิน เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีระหว่างอาร์โทคาร์ปินและสารสกัดหยาบที่มีปริมาณอาร์โทคาร์ปินสมมูลกัน (ยกตัวเช่นเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดหยาบความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอาร์โทคาร์ปินความเข้มข้น 4.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดหยาบมีแนวโน้มในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีได้มากกว่า อย่างไรก็ตามการฤทธิ์ยับยั้งนี้น้อยกว่าของโคจิค แอซิด เพื่อศึกษากลไกในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีของอาร์โทคาร์ปิน ผลของอาร์โทคาร์ปินที่ความเข้มข้น 4.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการทำงานของโปรตีนเอส-แอคติเวทเต็ด รีเซ็ปเตอร์ 2 (พาร์-2), รีเซ็ปเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งถุงเมลาโนโซมจากเซลล์เคอราติโนไซต์ไปยังเซลล์เมลาโนไซต์ และการขนส่งไทโรซีน ถูกประเมินจากการวัดปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์เมลาโนไซต์ และการเคลื่อนที่ของไทโรซีนที่มีสารกัมมันตรังสีทริเทียมเข้าไปยังถุงเมลาโนโซมที่ถูกแยกออกมา ตามลำดับ เราพบว่าอาร์โทคาร์ปินไม่ส่งผลในการยับยั้งการทำงานของพาร์-2 อย่างไรก็ตามพบว่าอาร์โทคาร์ปินส่งผลให้ความเร็วเริ่มต้นในการเคลื่อนที่ของไทโรซินเข้าสู่ถุงเมลาโนโซมลดลงประมาณ 1 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ถูกบ่มกับสารอาร์โทคาร์ปิน

Abstract

231237

The aim of this study was to clarify mechanisms underlying the melanogenesis inhibitory activity of Thai breadfruit's heartwood extract. The heartwood of breadfruit (*Artocarpus incisus*) grown in Phitsanulok Province, Thailand was extracted by using diethyl ether. To isolate artocarpin, a major component of *A. incisus*'s heartwood extract, the diethyl ether extract (crude extract) was recrystallized with diethyl ether/hexane and methanol, respectively. We found that artocarpin contained in the crude extract was 49.0 ± 3.2% w/w, according to HPLC assay. The percent yield of artocarpin obtained was 2.3% by weight of the crude extract. The crude extract (2, 10, 25, 50, 100 and 150 μg/ml) and purified artocarpin (0.98, 4.9, 12.3, 24.5, 49 and 73.5 μg/ml) was then evaluated the cytotoxicity to melanocytes and keratinocytes, according to trypan blue exclusion and XTT assay, respectively. We found that both the crude extract and purified artocarpin did not show cytotoxicity to the keratinocytes at 24-hr incubation. However, for melanocytes, the crude extract at concentration more than 10 μg/ml (25 μg/ml) and the purified artocarpin at concentration more than 4.9 μg/ml (12.3 μg/ml) significantly decreased viable cell number at 48-hr incubation. Therefore, the crude extract at concentration of 10 μg/ml and the purified artocarpin at concentration of 4.9 μg/ml were used for further studies. To study the effect of the extracts on melanogenesis inhibitory activity, melanocyte-keratinocyte coculture model was used, and the inhibitory activity was determined by measuring melanin content produced by melanocytes. Cells was treated with 1 nM α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) at after (prevention activity) incubated with or incubated together with (treatment activity) the crude extract (10, 5, 2.5 and 1.25 μg/ml) or the purified artocarpin (4.9, 2.45, 1.23 and 0.61 μg/ml) for 24 hr. Kojic acid at concentration of 10 μg/ml was used as a positive control in both conditions. We found that both crude extract and purified artocapin showed prevention and treatment efficacy. Interestingly, the crude extract could decrease melanin content in dose-dependent manner whereas this phenomenon was not observed in the artocarpin-treated cells. As comparison of melanogenesis inhibitory activity between the purified artocarpin and the crude extract containing equivalent concentration of artocarpin (for an example, compared 10 μg/ml crude extract with 4.9 μg/ml artocarpin), the crude extract tended to provide higher melanogenesis inhibitory activity. However, this inhibitory activity was lower than that of 10 μg/ml kojic acid. To study mechanisms underlying melanogenesis inhibitory activity of artocarpin, the effects of artocarpin (4.9 μg/ml) on protease-activated receptor 2 (PAR-2), receptor involving in transportation of melanosome from melanocyte to keratinocyte, and tyrosine transportation activities were determined using measurement of intracellular calcium content of melanocytes and [^{3}H] tyrosine uptake of isolated melanosomes, respectively. We found that the artocarpin did not inhibit PAR-2 activity. However, an initial velocity in [^{3}H] tyrosine uptaked by melonosomes was about 1-time lower in artocarpin-treated group compared with non-treated group.