

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากแก่นสาเกในแง่ของการสร้างคอลลาเจนโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีเมื่อนำสารสกัดจากแก่นต้นสาเก ได้แก่ สารสกัดหยาบ (มีปริมาณอาร์โทคาร์ปินโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 43.85 ± 0.03 โดยน้ำหนัก) และ isolated artocarpin (มีปริมาณอาร์โทคาร์ปินโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 88.18 ± 0.02 โดยน้ำหนัก) มาทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เทียบกับวิตามินซีและวิตามินอี ผลที่ได้พบว่า วิตามินซี วิตามินอี isolated artocarpin และสารสกัดหยาบ มีค่าความเข้มข้นสมมูลที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50 ของประสิทธิภาพสูงสุด เท่ากับ 4.9 ± 0.1 , 11.0 ± 0.5 , 132.7 ± 2.7 และ 207.5 ± 9.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ โดยใช้วิธี XTT assay และ BrdU colorimetric detection ซึ่งผลที่ได้บ่งชี้ว่า isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด จากนั้นทำการศึกษาผลของ isolated artocarpin ต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ผลิตโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร ด้วยวิธี Western blot และ ELISA พบว่าสาร isolated artocarpin ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสร้างและปลดปล่อยโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียวด้วยเหตุนี้จึงทำการทดสอบผลของ isolated artocarpin ต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจนจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์พบว่าแสงยูวีบีมีผลเพิ่มการผลิต MMP-1 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งหมายถึงกลุ่มที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี (16.82 ± 1.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุม และ 107.22 ± 5.16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว) และเป็นที่น่าสนใจที่พบว่าการที่เซลล์ถูกบ่มกับ isolated artocarpin เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนได้รับแสงยูวีบีสามารถลดการปลดปล่อยของ MMP-1 (89.62 ± 12.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จากเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบี ในขณะที่วิตามินซีไม่มีผลในการลดการปลดปล่อย MMP-1 (103.39 ± 16.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในกรณีของ MMP-13 พบว่าปริมาณเอนไซม์ชนิดที่ปลดปล่อยภายนอกเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นในเซลล์กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว (87.70 ± 16.69 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (78 ± 6.36 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การที่เซลล์ได้รับวิตามินซี

ก่อนที่จะได้รับแสงยูวีบี มีผลทำให้ปริมาณ MMP-13 ที่ปลดปล่อยออกมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (38.65 ± 11.24 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว ซึ่งการลดลงของ MMP-13 พบในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ isolated artocarpin ก่อนเช่นกัน (54.40 ± 48.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่า isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดการหลั่งสารสื่ออักเสบ TNF- α (283.83 ± 70.06 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว และ 23.17 ± 23.30 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ที่ได้รับ isolated artocarpin ก่อนได้รับยูวีบี) และ IL-6 (141.67 ± 20.28 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียวและ 88.33 ± 17.56 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ที่ได้รับ isolated artocarpin ก่อนได้รับยูวีบี) สำหรับการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ที่ได้รับแสงยูวีบีพบว่า การได้รับแสงยูวีบีที่บริเวณผิวหนังด้านหลังติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ส่งผลให้ผิวหนังชั้น epidermis หนาขึ้นและมีปริมาณคอลลาเจนในชั้น dermis ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (ความหนา 23.49 ± 0.69 ไมโครเมตร และมีปริมาณคอลลาเจน 6.74 ± 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) และกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบี (ความหนา 29.92 ± 0.74 ไมโครเมตร และมีปริมาณคอลลาเจน 0.99 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) การได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และ isolated artocarpin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ โดยการทาทำให้ผิวหนังของหนูมีความหนาที่น้อยกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างมีนัยสำคัญ (23.38 ± 2.48 ไมโครเมตรสำหรับวิตามินซีและ 21.74 ± 1.02 ไมโครเมตรสำหรับสารสกัด) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับคอลลาเจนในหนูกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี (5.60 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) และสารสกัด (5.42 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) ผลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นศักยภาพของสารสกัดจากแก่นต้นสาเกในการป้องกันการทำลายคอลลาเจนในผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับแสงยูวีบี

คำสำคัญ อาร์โทคาร์ปิน, เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี, โพรคอลลาเจนชนิดที่ 1, เมทริกซ์ เมทาโลโปรตีนเนสชนิดที่ 1

Abstract

The aim of this study was to evaluate efficacy of *Artocarpus incisus* heartwood extract on collagen production by UVB-irradiated fibroblasts. According to DPPH assay, EC₅₀ values of the crude (containing artocarpin 43.85 ± 0.03 % w/w) and isolated artocarpin (containing artocarpin 88.18 ± 0.02 % w/w) were 207.5 ± 9.9 and 132.7 ± 2.7 µg/ml, respectively while those values of vitamin C and E were 4.9 ± 0.1 and 11.0 ± 0.5 µg/ml, respectively. Based on cytotoxicity test to primary skin fibroblasts by using XTT assay and BrdU colorimetric detection, the isolated artocarpin at concentration of 50 µg/ml significantly increased cell proliferation as compared with the control group (non-treatment group). Next, the effect of the isolated artocarpin on collagen production by UVB-irradiated fibroblasts (128 J/cm²) was studied by using Western blot and ELISA methods. We found that 50 µg/ml isolated artocarpin did not significantly induce type I procollagen production and release from UVB-irradiated fibroblasts. From the obtained results, we further studies on the effects of the isolated artocarpin on release of matrix metalloproteinases (MMPs) from fibroblasts. UVB-induced MMP-1 release from fibroblasts was found (16.82 ± 1.61ng/ml for non UVB-irradiated group and 107.22 ± 5.16 ng/ml for UVB-irradiated group). It is interested to find that pretreatment with isolated artocarpin by 24 hr significantly decrease MMP-1 release (89.62 ± 12.28 ng /ml) from UVB-irradiated fibroblasts whereas this decrease was not seen in vitamin C pretreatment group (103.39 ± 16.50 ng/ml). For MMP-13 level, the release of this enzyme from UVB-irradiated fibroblasts (87.70 ± 16.69 ng/ml) tended to increase when compared with non UVB-irradiated group (78 ± 6.36ng/ml). Pretreatment with vitamin C significantly decreases MMP-13 release (38.65 ± 11.24ng/ml) from UVB-irradiated fibroblasts. The decrease in MMP-13 release was also found in UVB-irradiated cells pretreated with the isolated artocarpin (54.40 ± 48.50ng/ml). Moreover, we found that the isolated artocarpin (50 µg/ml) decreased the release of inflammatory mediators including TNF- α (283.83 ± 70.06 pg/ml for UVB-irradiated keratinocytes and 23.17 ± 23.30 pg/ml for UVB-irradiated keratinocytes pretreated with the isolated artocarpin) and IL-6 (141.67 ± 20.28 pg/ml for UVB-irradiated keratinocytes and 88.33 ± 17.56 for UVB-irradiated keratinocytes pretreated with the isolated artocarpin). For *in vivo* study using male ICR mice, chronic UVB exposure to skin (dorsal back) for 12 weeks significantly increased in epidermal thickness (29.92 ± 0.74 µm) and decrease in dermal collagen content (0.99 ± 0.10 mg/g tissue) when compared with non UVB-irradiated group (23.49 ± 0.69 µm for epidermal thickness and 6.74 ± 0.28 mg/g tissue for

dermal collagen). Application with 3% vitamin C or 0.02% isolated artocarpin, along with UVB exposure significantly decreased epidermal thickness of UVB-irradiated group ($23.38 \pm 2.48 \mu\text{m}$ for vitamin C plus UVB-irradiated group, and $21.74 \pm 1.02 \mu\text{m}$ for isolated artocarpin plus UVB-irradiated group). Additionally, significant increase in dermal collagen content was found in vitamin C plus UVB-irradiated ($5.60 \pm 0.06 \text{ mg/g tissue}$) and isolated artocarpin plus UVB-irradiated ($5.42 \pm 0.12 \text{ mg/g tissue}$) groups. All obtained results indicate the potential of *A.incisus* heartwood extract in prevention of dermal collagen degradation from UVB exposure.

Keyword : Artocarpin, UVB-irradiated fibroblasts, Type I procollagen, Matrix metalloproteinase-1