



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ศักยภาพของสารสกัดจากแก่นต้นสาเกตต่อการฟื้นฟู
การสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ที่
ถูกรังสียูวีบี และกลไกที่เกี่ยวข้อง”

(Potential of *Artocarpus incisus*'s heartwood extract on
recovery in collagen production in UVB-irradiated human skin
fibroblasts and underlying mechanisms)

โดย

นางสาวจรรุภา วิโยชน์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตุลาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ศักยภาพของสารสกัดจากแก่นต้นสาเกตต่อการฟื้นฟู
การสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ที่
ถูกรังสียูวีบี และกลไกที่เกี่ยวข้อง”

(Potential of *Artocarpus incisus*'s heartwood extract on
recovery in collagen production in UVB-irradiated human skin
fibroblasts and underlying mechanisms)

คณะผู้วิจัย

นางสาวจรรุภา วิโยชน์

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง ศักยภาพของสารสกัดจากแก่นต้นสาเกตต่อการฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ที่ถูกแสงยูวีบี และกลไกที่เกี่ยวข้อง

ขอขอบคุณ นางสาวนริษรา ติระวีสิทธิ์ นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรวิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้มีส่วนทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ข้าราชการ พนักงาน นักวิทยาศาสตร์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่างๆ ในโครงการวิจัยนี้เป็นอย่างดี

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา

นางสาวจรรุภา วิโยชน์

ผู้ดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2555

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

แบบสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่ DBG5480005 ชื่อโครงการ ศักยภาพของสารสกัดจากแก่นต้นสาเกตต่อการฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ที่ถูกรังสียูวีบี และกลไกที่เกี่ยวข้อง
หัวหน้าโครงการ นางสาวจรรยา วิโยชน์ หน่วยงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
โทรศัพท์ 055-961875 โทรสาร 055-963731 อีเมล jarupav@nu.ac.th, jarupaviyoch4@yahoo.com

ความสำคัญ / ความเป็นมา

เมื่อไม่นานมานี้ผู้ดำเนินการวิจัยได้นำสารสกัดจากแก่นสาเกต (*Artocarpus incisus*) ที่อยู่ในวงศ์ Moraceae ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองที่พบทั่วไปในประเทศไทย มาศึกษาถึงศักยภาพของสารสกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลการศึกษาที่ได้พบว่าสารสกัดแก่นสาเกตที่มีสารอาร์โทคาร์ปิน (artocarpin) เป็นองค์ประกอบหลัก (มีสารนี้อยู่ในปริมาณ 40-45 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิว (melanin) ในเซลล์เมลานโนไซต์ (melanocyte) และในหนูที่ถูกกระตุ้นให้สีผิวเข้มขึ้น (UVB-induced hyperpigmentation) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาดดังกล่าวสามารถฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่แยกจากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย โดยสารสกัดกระตุ้นการสร้างโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ยับยั้งการสร้าง MMP ชนิดที่ 1 (MMP-1) รวมทั้งสามารถฟื้นฟูศักยภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) คอลลาเจน และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย และเพื่อทำการต่อยอดการศึกษาดังกล่าวข้างต้นผู้ดำเนินการวิจัยจึงออกแบบการศึกษาเพื่อประเมินประโยชน์ของสารสกัด ในแง่ของความสามารถของการฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ผิวหนังที่ถูกทำลายด้วยแสงยูวีบี รวมทั้งกลไกที่เกี่ยวข้อง

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ตรวจสอบผลของสารสกัดจากแก่นต้นสาเกต ต่อการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เสื่อมสภาพด้วยแสงยูวีบี
2. ศึกษากลไกในระดับชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ และยับยั้งการทำลายคอลลาเจนโดยสารสกัดอาร์โทคาร์ปินที่แยกได้จากแก่นต้นสาเกต ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เสื่อมสภาพด้วยแสงยูวีบี

ผลการวิจัย

สารสกัดหยาบ (มีปริมาณอาร์โทคาร์ปินโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 43.85 ± 0.03 โดยน้ำหนัก) และ isolated artocarpin (มีปริมาณอาร์โทคาร์ปินโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 88.18 ± 0.02 โดยน้ำหนัก) ถูกมาทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 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 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ โดยใช้วิธี XTT assay และ BrdU colorimetric detection ซึ่งผลที่ได้บ่งชี้ว่า isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด จากนั้นทำการศึกษาผลของ isolated artocarpin ต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ผลิตโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร ด้วยวิธี Western blot และ ELISA พบว่าสาร isolated artocarpin ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสร้างและปลดปล่อยโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียวดังนี้จึงทำการทดสอบผลของ isolated artocarpin ต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจนจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์พบว่าแสงยูวีบีมีผลเพิ่มการหลั่ง MMP-1 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งหมายถึงกลุ่มที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี (16.82 ± 1.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุม และ 107.22 ± 5.16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว) และเป็นที่น่าสนใจที่พบว่าเวลาที่เซลล์ถูกบ่มกับ isolated artocarpin เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนได้รับแสงยูวีบีสามารถลดการปลดปล่อยของ MMP-1 (89.62 ± 12.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จากเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบี ในขณะที่วิตามินซีไม่มีผลในการลดการปลดปล่อย MMP-1 (103.39 ± 16.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในกรณีของ MMP-13 พบว่า ปริมาณเอนไซม์ชนิดที่ปลดปล่อยภายนอกเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นในเซลล์กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว (87.70 ± 16.69 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (78 ± 6.36 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การที่เซลล์ได้รับวิตามินซีก่อนที่จะได้รับแสงยูวีบี 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 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว และ 88.33 ± 17.56 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ที่ได้รับ isolated artocarpin ก่อน

ได้รับยูวีบี) สำหรับการศึกษานี้ใช้สัตรีทดลองโดยใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ที่ได้รับแสงยูวีบีพบว่าได้รับแสงยูวีบีที่บริเวณผิวหนังด้านหลังติดต่อกันเป็นเวลา 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 ไมโครเมตร สำหรับวิตามินซีและ 21.74 ± 1.02 ไมโครเมตรสำหรับสารสกัด) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสง ยูวีบีเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับคอลลาเจนในหนูกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี (5.60 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) และสารสกัด (5.42 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) ผลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นศักยภาพของสารสกัดจากแก่นต้นสาเกในการป้องกันการทำลายคอลลาเจนในผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับแสงยูวีบี

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ ได้แก่ keratinocyte และ fibroblast ที่พัฒนาขึ้น จะสามารถนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดอื่นๆ ที่คาดว่าจะมีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้งการสร้าง inflammatory mediators ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการทำลายคอลลาเจน, procollagen และ MMPs

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และใช้ประโยชน์ด้านไหน

อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เพื่อนำไปใช้เป็น model สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพ anti-aging ของสารที่สนใจนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

การประชาสัมพันธ์

1. สิ่งพิมพ์ทั่วไป -
2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ เอกสารงานวิจัยเรื่อง Preventive effect of *Artocarpus incisus* heartwood extract in UVB-induced skin damage โดยมีรายละเอียดในภาคผนวก

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	II
แบบสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)	VI
สารบัญเรื่อง	IX
สารบัญตาราง	XI
สารบัญรูป	XII
เนื้อหางานวิจัย	
บทที่ 1	
1. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	
1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์	
1.1 แหล่งพืช	6
1.2 สารเคมี	6
1.3 สัตว์ทดลอง	8
1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์	8
2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	
2.1 รายละเอียดของพืชที่ใช้ในการทดลอง	10
2.2 การสกัดและการแยก artocarpin จากแก่นของต้นสาเก	10
2.3 วิเคราะห์หาปริมาณ artocarpin โดย HPLC	12
2.4 การวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบ และ isolated artocarpin	15
2.5 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) และเคราติโนไซต์ (keratinocytes)	20
2.6 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์	

2.6.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin	22
2.6.2 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (proliferation)	32
2.7 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivities) ของ isolated artocarpin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี	
2.7.1 ทดสอบผลของความเข้มแสงของแสงยูวีบีต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์	42
2.7.2 ผลของสารสกัดต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ผลิตโดย เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี	
2.7.2.1 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ ได้รับสารสกัดภายหลังจากที่ได้รับแสงยูวีบี	45
2.7.2.2 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ ได้รับสารสกัดก่อนได้รับแสงยูวีบี	49
2.7.2.3 ผลของสารสกัดต่อการปลดปล่อยโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี	51
2.7.3 ผลของสารสกัดต่อการหลั่ง MMP-1 และ 13 ที่ผลิตโดยเซลล์ไฟ- โบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี	53
2.7.4 ผลของสารสกัดต่อการปลดปล่อย tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6) โดยเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบี	56
2.7.5 ผลของสารสกัดต่อการหลั่ง SMAD2, 3, 7 และระดับ TGF- β receptor ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี	60
2.8 การทดสอบ <i>In vivo</i> วัดความหนาและปริมาณคอลลาเจนในหนังหนุ ที่โดนแสงยูวีบี	
2.8.1 สัตว์ทดลองที่ใช้	61
2.8.2 การวัดความหนาของ epidermis โดยตรวจสอบจุลกายวิภาค- ศาสตร์ (histological examination) ของผิวหนังหนุ	62
2.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ใน ตัวอย่างเนื้อเยื่อและการคำนวณปริมาณคอลลาเจน	65
2.8.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative) โดยวิธี immunofluorescence	68
บทที่ 3 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	71

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ	16
ตารางที่ 2 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ isolated artocarpin	17
ตารางที่ 3 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี	18
ตารางที่ 4 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี	19

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 ต้นสาเก (<i>Artocarpus incisus</i>)	10
รูปที่ 2 แก่นต้นสาเกสับ	11
รูปที่ 3 ลักษณะของสารสกัดที่ได้	11
รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ artocarpin	12
รูปที่ 5 NMR spectrum ของ artocarpin reference ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ	12
รูปที่ 6 HPLC chromatogram ของ artocarpin reference ที่ความเข้มข้น 0.0156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	13
รูปที่ 7 HPLC chromatogram ของ artocarpin reference ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	13
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ artocarpin reference และพื้นที่ภายใน chromatogram (peak area)	14
รูปที่ 9 HPLC chromatogram ของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14
รูปที่ 10 HPLC chromatogram ของ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	15
รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของสารสกัดหยาบ	17
รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของ isolated artocarpin	18
รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของวิตามินซี	19
รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของวิตามินอี	20
รูปที่ 15 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า	21
รูปที่ 16 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เคราติโนไซต์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา	21

- 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า
- รูปที่ 17 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อ cell viability ของเซลล์ไฟโบร- 23
 บลาสต์หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125 – 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิ-
 ลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ cell viability \pm ค่าเบี่ยงเบน
 มาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
 (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าจุด
 กลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์
- รูปที่ 18 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ 24
 และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา
 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- รูปที่ 19 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ 24
 และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา
 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า
- รูปที่ 20 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ 25
 และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา
 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- รูปที่ 21 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ 25
 และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา
 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า
- รูปที่ 22 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อ cell viability ของเซลล์ไฟโบร- 26
 บลาสต์หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125 – 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิ-
 ลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ cell viability \pm ค่าเบี่ยงเบน
 มาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
 (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าจุด
 กลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์
- รูปที่ 23 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ 27
 และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา
 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- รูปที่ 24 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ 27

- และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า
- รูปที่ 25 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 28
- รูปที่ 26 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 28
- รูปที่ 27 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อ cell viability ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125 – 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ cell viability \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าจุดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ 29
- รูปที่ 28 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 30
- รูปที่ 29 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 30
- รูปที่ 30 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 31
- รูปที่ 31 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 31
- รูปที่ 32 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125 – 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 33

- (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)
- รูปที่ 33 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 34
- รูปที่ 34 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 34
- รูปที่ 35 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 35
- รูปที่ 36 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 35
- รูปที่ 37 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125 – 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) 36
- รูปที่ 38 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 37
- รูปที่ 39 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 37
- รูปที่ 40 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 38

- รูปที่ 41 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 38
- รูปที่ 42 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบร- บลาสต์หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125 –75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนเซลล์ \pm ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าดูดกลืน แสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) 39
- รูปที่ 43 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 40
- รูปที่ 44 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 40
- รูปที่ 45 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 41
- รูปที่ 46 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 41
- รูปที่ 47 ผลของความเข้มแสงยูวีบีที่ 64, 128 และ 192 จูลต่อตารางเซนติเมตรต่อการเพิ่ม จำนวนของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ กราฟแท่งแสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อได้รับ แสงยูวีบีที่ความเข้มแสงต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่ถูกฉายแสงยูวีบี) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ 43
- รูปที่ 48 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์กลุ่มควบคุมภายหลังจากการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า 43
- รูปที่ 49 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่ได้รับการความเข้มแสง 64 จูลต่อตาราง- 44

เซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า

- รูปที่ 50 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า 44
- รูปที่ 51 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 192 จุลต่อตารางเซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า 45
- รูปที่ 52 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร (กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, ข) กลุ่ม negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, ค) กลุ่ม positive control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีและวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ ง) คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบี และสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กราฟแสดงปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยปรับให้ค่าความเข้มของ band โปรตีนที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ 47
- รูปที่ 53 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี (control, กลุ่มควบคุม) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า 47
- รูปที่ 54 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร (กลุ่ม negative control) และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า 48
- รูปที่ 55 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร และวิตามินซีเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม positive control) และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า 48
- รูปที่ 56 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร และสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า 49
- รูปที่ 57 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 128 จุล 50

- ต่อตารางเซนติเมตร ก) กลุ่มของเซลล์ที่ป้อนกับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี, ข) กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, ค) กลุ่ม negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว และ ง) กลุ่ม positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแสดงปริมาณโปรคอลลาเจน ชนิดที่ 1 โดยปรับให้ค่าความเข้มของ band โปรตีนที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี)
- รูปที่ 58 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ และ ค่าการดูดกลืนแสง 52
- รูปที่ 59 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบี อย่างเดียว, positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin คือเซลล์ ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้ รับแสงยูวีบี กราฟแห่งแสดงปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ไฟโบร- บลาสต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) 52
- รูปที่ 60 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการ ดูดกลืนแสง 54
- รูปที่ 61 ปริมาณการหลั่ง MMP-1 ที่หลั่งโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin คือเซลล์ที่ได้รับ สารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสง ยูวีบี กราฟแห่งแสดงปริมาณ MMP-1 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test) 54
- รูปที่ 62 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-13 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการ ดูดกลืนแสง 55
- รูปที่ 63 ปริมาณการหลั่ง MMP-13 ที่หลั่งโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin คือเซลล์ที่ได้รับ 55

- สารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแท่งแสดงปริมาณ MMP-13 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test)
- รูปที่ 64 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TNF- α ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง 58
- รูปที่ 65 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการหลั่ง TNF- α โดยเซลล์เคราติโนไซต์เมื่อ negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, crude extract คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบ (มีปริมาณ artocarpin 43.85 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin (มีปริมาณ artocarpin 88.18 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแท่งแสดงปริมาณ TNF- α ที่หลั่งโดยเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบี (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test) 58
- รูปที่ 66 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TNF- α ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง 59
- รูปที่ 67 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการหลั่ง IL-6 โดยเซลล์เคราติโนไซต์เมื่อ negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, crude extract คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบ (มีปริมาณ artocarpin 43.85 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin (มีปริมาณ artocarpin 88.18 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแท่งแสดงปริมาณ IL-6 ที่หลั่งโดยเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบี (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test) 59
- รูปที่ 68 ผลของสารสกัดต่อความหนาของผิวหนังหนูก เมื่อ control group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, positive control คือได้รับแสงยูวีบีและวิตามินซีเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์, test group คือได้รับแสงยูวีบี และสารสกัด isolated artocarpin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ กราฟแท่งแสดงความหนาของผิวหนังหนูกที่ได้รับแสงยูวีบี (N=4) (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test) 62
- รูปที่ 69 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูกที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี (control group) ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 63

รูปที่ 70 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูที่ได้รับ แสงยูวีบี ร่วมกับการทาน้ำเปล่า (negative control) ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	63
รูปที่ 71 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูที่ได้รับ แสงยูวีบี ร่วมกับการทาวิตามินซี 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	64
รูปที่ 72 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูที่ได้รับ แสงยูวีบี ร่วมกับการทาสารสกัดisolated artocarpin0.02 เปอร์เซ็นต์ (test group) ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	64
รูปที่ 73 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างไฮดรอกซีโปรลีนกับความเข้มข้นต่างๆ และ ค่าการดูดกลืนแสง	66
รูปที่ 74 กราฟแท่งแสดงปริมาณของไฮดรอกซีโปรลีนในเนื้อเยื่อตัวอย่าง เมื่อ control group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ isolated artocarpin คือ ได้รับแสงยูวีบี และสารสกัดเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (N=4) (*, $p < 0.05$, Student's <i>t</i> -test)	66
รูปที่ 75 กราฟแท่งแสดงปริมาณคอลลาเจนในเนื้อเยื่อตัวอย่าง เมื่อ control group คือไม่ได้ รับแสงยูวีบี, negative control คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, positive control คือ ได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์, isolated artocarpin คือได้รับแสงยูวีบี และสารสกัดเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (N=4) (*, $p < 0.05$, Student's <i>t</i> -test เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม)	67
รูปที่ 76 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อไม่ได้รับแสง ยูวีบี (control group) ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า	69
รูปที่ 77 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาน้ำเปล่า (positive control) ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมอง ผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	69
รูปที่ 78 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาวิตามินซี 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	70
รูปที่ 79 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาสารสกัดisolated artocarpin0.02 เปอร์เซ็นต์ (positive control) ควบ	70

ตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

รูปที่ 80 แผนภาพแสดงฤทธิ์ของสารสกัด isolated artocarpin ในการยับยั้งการทำลาย 77

คอลลาเจน โดยสารสกัดมีฤทธิ์ free radical scavenging และยับยั้งการปลดปล่อย สารสื่ออักเสบ เช่น TNF- α และ IL-6 จากเซลล์เคราติโนไซต์ที่อยู่ในชั้น epidermis รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-13 ฤทธิ์ต่างๆ เหล่านี้ จะส่งผลให้การทำลายคอลลาเจนในผิวหนังชั้น dermis ลดลง

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

ผิวหนัง เป็นอวัยวะหลักที่สะท้อนให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของร่างกายที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากความแก่ (aging) การเปลี่ยนแปลงของผิวหนังที่เห็นได้ชัดคือความยืดหยุ่นของผิวที่ลดลง ซึ่งเกิดควบคู่กับการเกิดริ้วรอย (wrinkles) หรืออาจกล่าวได้ว่าริ้วรอยเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงความแก่ เป็นที่ทราบกันดีว่าความแก่เกิดจากการที่ร่างกายมีการสะสมโมเลกุลที่เสื่อมสภาพที่ร่างกายผลิตขึ้นมา โมเลกุลที่เสื่อมสภาพ เช่น โปรตีน และยีน ที่ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงโดย reactive oxygen species (ROS) หรืออนุมูลอิสระ (free radicals) [1-3] ซึ่งสามารถเกิดขึ้นเองในร่างกายอันเป็นผลมาจากกระบวนการสันดาปภายในร่างกาย หรืออนุมูลอิสระที่มีสาเหตุจากสิ่งแวดล้อมจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสง UV จากการศึกษพบว่ากระบวนการทางชีววิทยา และชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำให้ผิวหนังแก่ขึ้น ได้แก่ 1) การสังเคราะห์โปรตีนคอลลาเจน (collagen) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ลดลง โดยเฉพาะการแสดงออกของยีนโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I procollagen) [4-7] และ 2) เส้นทางการส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) ซึ่งส่งผลทำให้การแสดงออกของยีนต่างๆ ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังเพิ่มขึ้น [8-10] ยีนเหล่านี้ ได้แก่ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสชนิดที่ 1 (metalloproteinase-1, MMP-1) หรือที่รู้จักกันในนาม collagenase I และ MMP-13 หรือที่รู้จักกันในนาม collagenase III [11] เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายโปรตีนคอลลาเจน เช่น คอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) ซึ่งพบในผิวหนัง [12-13] และนอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังสูญเสียศักยภาพในการเคลื่อนตัว (migration) ไปยังเส้นใยคอลลาเจน และยึดเกาะ (adhesion) กับเส้นใยดังกล่าว ส่งผลให้การจัดระเบียบหรือจัดเรียงตัว (reorganization) ของเส้นใยคอลลาเจนโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ รวมทั้งการสูญเสียศักยภาพในการเกาะติดกับเส้นใยคอลลาเจนของไฟโบรบลาสต์ยังทำให้คุณสมบัติเชิงกล เช่น ศักยภาพในการหดตัว (contractile capacity) ของเซลล์ลดลงด้วย [14-16] อาจกล่าวได้ว่าปริมาณคอลลาเจนที่ลดลง การทำลายคอลลาเจนที่มากขึ้น การจัดระเบียบเส้นใยคอลลาเจนที่ผิวหนังชั้น dermis ที่ไม่สมบูรณ์ และการสูญเสียความสามารถในการหดตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อันเนื่องมาจากอายุมากขึ้น ทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลง และนำไปสู่การเกิดริ้วรอยที่ผิวหนังและสูญเสียความยืดหยุ่น

จากที่กล่าวมาข้างต้น อาจสรุปได้ว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีความสำคัญต่อการคงสภาพของผิวหนังในไม่ให้เกิดริ้วรอย เป็นที่ทราบกันดีว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 ประกอบไปด้วยสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) จำนวน 3 สาย ได้แก่ สาย $\alpha 1(I)$ จำนวน 2 สาย และ $\alpha 2(I)$ จำนวน 1 สาย โดยมีไฮดรอก-

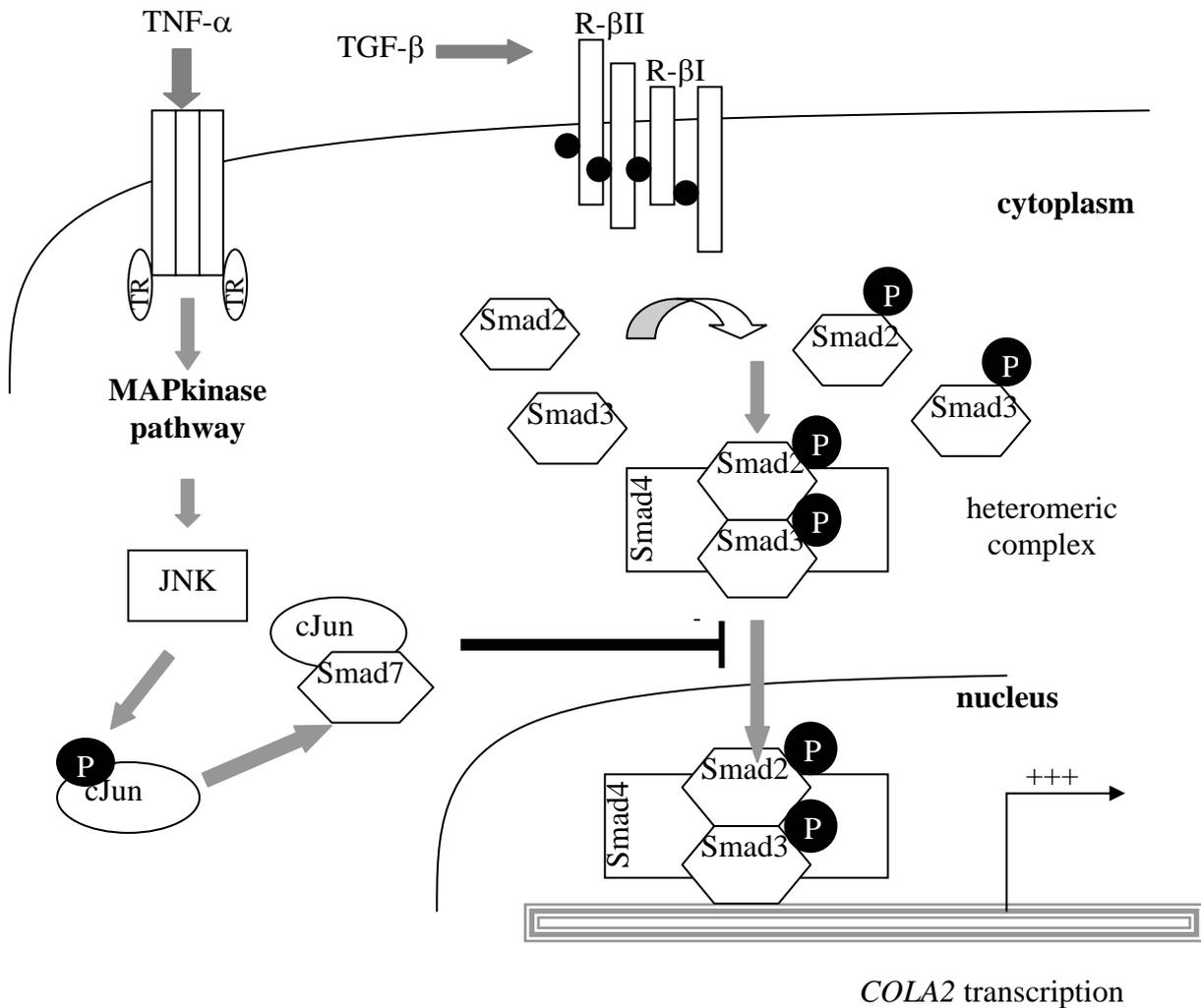
ซีโปรลีน (hydroxyproline) เป็นองค์ประกอบหลัก ขั้นตอนการสังเคราะห์โดยไฟโบรบลาสต์เริ่มจากที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของสายพอลิเปปไทด์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ COL1A1 และ COL1A2 ถูกกระตุ้นส่งผลให้ได้สายพอลิเปปไทด์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งเรียกว่า pro- α 1(I) และ pro- α 2(I) ที่มีกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) และโปรลีน (proline) ที่เป็นองค์ประกอบหลัก สายพอลิเปปไทด์เหล่านี้เคลื่อนที่เข้าสู่ endoplasmic reticulum ซึ่งเป็นหน่วยภายในเซลล์ที่เกิดการไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) ของกรดอะมิโนโปรลีน ได้เป็นไฮดรอกซีโปรลีน ซึ่งการเกิด hydroxylation นี้จะส่งผลให้สาย pro- α 1(I) และ pro- α 2(I) ประสานกันผ่าน hydrogen bond เกิดเป็นโปรคอลลาเจนที่ประกอบไปด้วยพอลิเปปไทด์ 3 สาย (triple helix procollagen) ซึ่งโปรคอลลาเจนที่เกิดขึ้นนี้จะถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์ผ่านทาง Golgi apparatus แล้วตามด้วยการตัดสายพอลิเปปไทด์ตรงบริเวณ N-terminal และ C-terminal โดยเอนไซม์ที่จำเพาะได้เป็นคอลลาเจน ซึ่งคอลลาเจนหลายๆ โมเลกุลจะเกาะกลุ่มรวมกันได้เป็นไฟบริล (fibril) ไฟบริลนี้จะทำงานร่วมกับองค์ประกอบอื่นๆ [17] ในการทำหน้าที่เป็นโครงร่างให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ยึดเกาะ และทำงานได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อพิจารณาในระดับชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน COL1A1 และ COL1A2 นั้น มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ชี้ให้เห็นว่า transforming growth factor- β (TGF- β) เป็นกลุ่มชีวโมเลกุลที่สำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตคอลลาเจน รวมทั้งการจัดระเบียบ [18-21] โดย TGF- β จะจับกับรีเซปเตอร์ (receptor; serine/threonine kinase transmembrane ได้แก่ T β RI และ T β RII) การกระตุ้นการทำงานของรีเซปเตอร์ที่เกิดขึ้นจากการจับกับ TGF- β ส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ที่โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มที่มีชื่อเรียกว่า mothers against decapentaplegic (Smads) ได้แก่ Smad2 และ Smad3 ที่อยู่ใน cytoplasm และทำหน้าที่เป็นสื่อกลาง (mediator) Smad2 และ 3 ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตนี้เป็นสารสื่อกลางที่อยู่ในภาวะที่พร้อมจะทำงาน (active) และเกิดการฟอร์มเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนกับ Smad4 (heteromeric complex) ก่อนที่จะเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียส และทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยการจับกับ DNA การเติมหมู่ฟอสเฟต และการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสนี้ถูกยับยั้งได้โดย Smad7 [22, 23] หรืออาจกล่าวได้ว่า Smad7 นั้นขัดขวางผลของ TGF- β ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน เช่น คอลลาเจน โดยการทำงานของ Smad7 นั้นมีการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าเป็นผลสืบเนื่องมาจาก (tumor necrosis factor α (TNF- α) [24 - 26] ที่เป็น cytokine ที่กระตุ้นให้เซลล์ผลิตเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเอส (matrix metalloproteinases; MMPs) ที่มาทำลายคอลลาเจน แผนภาพแสดงการทำงานของ TGF- β ต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 แสดงในรูปที่ 1

ที่กล่าวมาข้างต้นก็เพื่อต้องการชี้ให้เห็นว่าการศึกษาและเข้าใจผลที่เกิดจาก TGF- β ในระดับเซลล์ และชีวโมเลกุลเป็นสิ่งจำเป็นในทางวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง เพื่อนำมาใช้เป็นแม่แบบในการพัฒนาและ/

หรือค้นหาสารสำคัญที่ส่งผลในทางเดียวกับ TGF- β ในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน จากการศึกษา ค้นคว้าของผู้วิจัยพบว่าในปัจจุบันมีสารที่มีต้นกำเนิดจากธรรมชาติ ที่มีวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้เพื่อลด เลื่อนริ้วรอยและ/หรือเพิ่มการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยแสง UVB เช่น asiaticoside ที่พบในใบบัวบก (*Centella asiatica*) [27] สารสกัดจากรากโสม (*Panax ginseng*) [28, 29] สารสกัดจากใบของ *Magnolia obovata* [30] สารสกัดจากเฟิร์น (*Polypodium leucotomos*) [31] สารสกัดจากชาเขียว (*Camellia sinensis*) [32] และสารสกัดจาก *Eucommia ulmoides* [33] สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ผลิตโปรคอลลาเจนมากขึ้น โดยกลไกในการเหนี่ยวนำเกี่ยวข้องกับ การกระตุ้นการแสดงออกของยีน TGF- β และ/หรือกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Smad

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายทางชีวภาพ วัตถุดิบ จากธรรมชาติหลายชนิด เช่น วัตถุดิบที่ได้จาก พืช สัตว์ และแร่ธาตุ มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อเป็น ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในทางเครื่องสำอาง เมื่อไม่นานมานี้ผู้ดำเนินการวิจัยได้ นำสารสกัดจากแก่นสาเก (*Artocarpus incisus*) ที่อยู่ในวงศ์ Moraceae ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองที่พบทั่วไปใน ประเทศไทย มาศึกษาถึงศักยภาพของสารสกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลการศึกษาที่ได้ พบว่าสารสกัดแก่นสาเกที่มีสารอาร์โทคาร์พิน (artocarpin) เป็นองค์ประกอบหลัก (มีสารนี้อยู่ในปริมาณ 40-45 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิว (melanin) ในเซลล์เมลานोไซต์ (melanocyte) และใน หนูที่ถูกกระตุ้นให้สีผิวเข้มขึ้น (UVB-induced hyperpigmentation) [34-36] โดยที่สารสกัดในความ เข้มข้นน้อยกว่าเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมลานोไซต์ ในขณะที่สารอาร์โทคาร์พิน (purified) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลทำให้การแบ่งตัวของเซลล์ลดลง และรูปร่างเซลล์ เปลี่ยนแปลง [34] ผลที่ได้บ่งชี้ว่าการนำสารสกัดหยาบมีประโยชน์เหนือสารสกัดบริสุทธิ์ในแง่ความเป็นพิษ ต่อเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบดังกล่าวสามารถฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ แยกจากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย โดยสารสกัดกระตุ้นการสร้างโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ยับยั้งการ สร้าง MMP ชนิดที่ 1 (MMP-1) รวมทั้งสามารถฟื้นฟูศักยภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) คอลลา เจน และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย [37] และ เพื่อทำการต่อยอดการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ผู้ดำเนินการวิจัยจึงออกแบบการศึกษาเพื่อประเมินประโยชน์ ของสารสกัด ในแง่ของความสามารถของการฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ผิวหนังที่ถูกทำลายด้วย แสงยูวีบี รวมทั้งกลไกที่เกี่ยวข้อง โดยในโครงการวิจัยนี้ผู้ดำเนินการวิจัยจะนำสารสกัดมาศึกษาผลต่อการ ป้องกัน หรือฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวีบี ในแง่ของการสร้างโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยมีความคาดหวังว่าผลที่ได้ จะเป็นไปในแนวทางเดียวกับการ ศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากเซลล์ผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย นอกจากนี้ผู้ดำเนินการ



แผนภาพแสดงการทำงานของ transforming growth factor β (TGF- β) ต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดย TGF- β จะจับกับรีเซปเตอร์ (receptor; serine/threonine kinase transmembrane ได้แก่ T β RI และ T β RII) การกระตุ้นการทำงานของรีเซปเตอร์ที่เกิดขึ้นจากการจับกับ TGF- β ส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ที่โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มที่มีชื่อเรียกว่า mothers against decapentaplegic (Smads) ได้แก่ Smad2 และ Smad3 ที่อยู่ใน cytoplasm และทำหน้าที่เป็นสื่อกลาง (mediator) Smad2 และ 3 ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตนี้ เป็นสารสื่อกลางที่อยู่ในภาวะที่พร้อมจะทำงาน (active) และเกิดการฟอร์มเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนกับ Smad4 (heteromeric complex) ก่อนที่จะเคลื่อนตัวเข้าสู่ นิวเคลียส และทำหน้าที่กระตุ้นการแสดง ออกของยีนโดยการจับกับ DNA การเติมหมู่ฟอสเฟต และการเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียส นี้ถูกยับยั้งได้โดย Smad7

วิจัยยังศึกษากลไกในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของสารสกัด โดยมีสมมติฐานที่ว่าสารสกัดอาจส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน TGF- β และ Smads เช่นเดียวกับสารสกัดจากธรรมชาติอื่น ที่เป็นที่ยอมรับว่ามีศักยภาพในการนำมาใช้ในการต้านริ้วรอย เช่น asiaticoside ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในเชิงลึก ที่ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากพืชที่พบในประเทศไทยต่อการฟื้นฟูเซลล์ผิวหนังที่เสื่อมสภาพโดยแสงยูวีบี

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ตรวจสอบผลของสารสกัดจากแก่นต้นสาเก ต่อการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เสื่อมสภาพด้วยแสงยูวีบี
2. ศึกษากลไกในระดับชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ และยับยั้งการทำลายคอลลาเจนโดยสารสกัดอาร์โทคาร์ปินที่แยกได้จากแก่นต้นสาเก ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เสื่อมสภาพด้วยแสงยูวีบี

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1.1 แหล่งพืช

1. แก่นต้นสาเก (*Artocarpus incisus*, จังหวัดพิษณุโลก)

1.2 สารเคมี

1. Acetone (A.R. grade, Batch No. 09061216, LabScan Asia Co., Ltd., Thailand)
2. Acrylamide, 99% (Control 210008680, BIO-RAD Laboratories, China)
3. DL-alpha tocopherol (Lot No. LB84486V, TTK science Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
4. Ammonium Persulfate; APS (Control 210001146, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
5. Amphotericin B; Fungizone (Lot No. 933505A, GIBCO, Auckland, NZ)
6. L(+)-Ascorbic acid (ACS, PH EUR) pure P.A.; vitamin C (Batch No. 1031/04/09, POCH SA, Poland)
7. BLUeye Prestained Protein Ladder (Genedirex, Lot No. 11PM185402, USA)
8. Bovine serum albumin; BSA (Lot No. 036K07341, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)
9. Cell proliferation kit II (XTT) (Lot No 11465015001, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA)
10. Cell proliferation ELISA; BrdU (Lot No. 12196100, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
11. DC protein Assay Reagent A (Control. 21005950, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
12. DC protein Assay Reagent B (Control. 21005954, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
13. Diethyl ether; Et₂O (A.R. grade, Batch No. 10050039, LabScan Asia Co., Ltd., Thailand)
14. Dimethylsulfoxide; DMSO (A.R. grade, Batch. #76096AM, Sigma chemical Co., Ltd., USA)
15. Dispase® (Lot No. 17105-041, GIBCO, Auckland, NZ)

16. Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose; DMEM - LG (Batch. # 029K8309, Sigma-Aldrich CO., St. Louis, Missouri, USA)
17. ELISA kit for MMP-1 (Ray Biotech, Inc., Norcross, Germany)
18. ELISA kit for MMP-13 (Ray Biotech, Inc., Norcross, Germany)
19. Eosin (Lot No. NOV2009, C.V. Laboratories Co., Ltd., Thailand)
20. Ethyl acetate; ET₂O (A.R. grade, Batch No. 11020181, LabScan Asia Co., Ltd., Thailand)
21. Fetal bovine serum;FBS (A.R. grade, Lot No.41F5498K, GIBCO, Auckland, NZ)
22. Glycine (Control 219996447, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
23. Goat Anti-Mouse IgG, ¹²⁻³⁴⁹HRP Conjugate (Lot No. NG 1850774, Millipore Co., Ltd., California, USA)
24. Hematoxylin (Lot No. NOV2009, C.V. Laboratories Co., Ltd., Thailand)
25. Hexane (A.R. grade, Batch No. 11100001, LabScan Asia Co., Ltd., Thailand)
26. Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Lot No. 121673, Milipore Co., Ltd., Billerica, MA, USA)
27. Methanol; MeOH (HPLC grade, Batch No. 11030307, LabScan Asia Co.,Ltd., Thailand)
28. N, N, N', N'-Tetra-methylethylenediamine; TEMED (Lot No. 210001692, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
29. Monoclonal Antibody to Human Procollagen Type I C-peptide (PIP) (Lot No. AA08519Z, TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)
30. N, N'-Methylene-bis-acrylamide (Control 210003895,BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
31. Penicillin Streptomycin; Penstrep (10,000 Units/mL Pennicillin and 10,000 µg/mL Streptomycin, Lot No. 1116257, Gibco, New York, USA)
32. Potassium dihydrogen orthophosphate; KH₂PO₄ (Batch No. AF501339, Ajax Finechem, NSW, Australia)
33. Secondary antibodies, Cy5 conjugated goat polyclonal to rabbit IgG (Cat No. ab6564, Abcample, Cambridge, UK)
34. Skim milk powder (Lot No. VL321563126, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
35. Sodium bicarbonate; Na₂CO₃ (Lot No. 050M0127V, Sigma-aldrich Co., Ltd., St.Louis, MO, USA)

36. Sodium chloride (Batch No. 0811292, Ajax Finechem Pty Ltd., New South Wales, Australia)
37. Sodium dodecyl sulfate; SDS (Control 210001229, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
38. di-Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous; Na₂HPO₄ (Batch No. 9909123199, Fisher Scientific UK Limited, UK)
39. Sodium sulphide x-hydrate (Lot.0000190568, Panreac, Castellar del Valles, Barcelona, Spain)
40. Sterile water for injection (Lot No. 534392, A.N.B. Laboratories Co., Ltd., Thailand)
41. T-PER[®] Tissue Protein Extraction Reagent (Lot No. LC144879, Thermo scientific, IL, USA)
42. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Tris-base (Lot No. 8382A003734, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
43. Triton X-100 (Batch No. 0265700, Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, Leics, UK)
44. Trypan blue solution (R&D grade, Lot No. 55K2342, Sigma Chemical Co., Ltd., USA)
45. Trypsin EDTA (A.R. grade, Lot No.917999, GIBCO, Canada)
46. Tween 20 (Lot No. S4571815619, VWR International Ltd., Poole, UK)
47. Procollagen type I c-peptide (PIP) EIA Kit (Lot No. AB07534C, TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)

1.3 สัตว์ทดลอง

1. หนูทดลองเพศผู้ (หนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR, อายุ 5 สัปดาห์, สำนักทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล, จังหวัดนครปฐม)

1.4 อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. ChemiDocTM XRS+ with Image LabTM Software (BIO-RAD Laboratories, California, USA)
2. Fluorescent sunlamps emitting rays between 275-305 nm (Toshiba FL8BLB, Japan)
3. Gemini column C18 250 x 4.60 mm (Phenomenex, Fortune Scientific CO., LTD., Bangkok, Thailand)
4. High performance liquid chromatographer; HPLC (model LC-20A, Shimadzu, Japan)

5. Hot air oven (Memmert GmbH & Co. KG, Germany)
6. Incubator (model 311, ThermoForma, USA)
7. Inverted microscope (model AE2000, Motic, New York, USA)
8. Mass spectrometer (API4000, Applied Biosystems, USA)
9. Microplate spectrophotometer (Spectra Count, Perkin Elmer, Massachusetts, USA)
10. Mini PROTEAN[®] 3 systems Glass Plates (Work Order No. INN118814, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
11. Mini PROTEAN[®] Tetra Cell (Serial No. 552BR007509, BIO-RAD, China)
12. 1H Nuclear magnetic resonance; NMR (Bruker av400, Billerica, Massachusetts, USA)
13. pH meter (Mettler Toledo Model S20-K, GmbH Schwerzenbach, Switzerland)
14. Polyvinylidene fluoride transfer membrane 0.45 μm (BioTrace[™] PVDF, Lot No. T02639, Pall Co., Ltd., Mexico)
15. Rotavapor (model R-200, Buchi, Switzerland)
16. Select BioProduct (model BioVolt 300V, Serial No. 7626021, Lio lab international Co., Ltd., Taiwan)
17. Silica gel 60 (Lot No. TA1653934017, Merck KGaA, Thailand)
18. Semi-dry blotters (TE70XP, Serial No. 30022272, Hoefer Inc, California, USA)
19. Ultracentrifuge (Beckman Model J2-MC, Beckman Instruments, Inc., USA)
20. Ultracentrifuge (Hettich Model Mikro 120, Bangkok Equipment & Chemical Co. Ltd., Bangkok, Thailand)
21. UV-VIS detector (model SPD-20A, Shimadzu, Japan)
22. UV-VIS Spectrophotometer (Varian Model Gray 1E, Thaiunique Co. Ltd., Bangkok Thailand)
23. Vertical laminar flow cabinet (model BHG2004S, Faster s.r.l., Italy)
24. Water bath (model LWB-211A, Daihom LabTech Co. Ltd., Korea)

2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

2.1 รายละเอียดของพืชที่ใช้ในการทดลอง

ต้นสาเก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus incisus* ชื่อสามัญคือ ขนนลำปะลอส เป็นพืชวงศ์ Moraceae ลักษณะเป็นไม้ต้นขนาดกลาง สูง 15-20 เมตร ไม้ผลัดใบ เรือนยอดทรงกลม แตกกิ่งก้านแผ่กว้างเปลือกต้นสีน้ำตาล เจริญเติบโตได้ดีในที่โล่งแจ้ง แสงแดดจัดลักษณะใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปไข่ ขนาด 30-60 เซนติเมตร ขอบใบเป็นแฉกลึกเกือบถึงเส้นกลางใบแผ่นใบหนา สีเขียวเข้มเป็นมันออกดอกเป็นช่อที่ซอกใบบริเวณปลายกิ่งดอกสีเหลือง ช่อดอกเพศผู้ห้อยลงรูปร่างคล้ายกระบอง ยาวประมาณ 30 เซนติเมตรช่อดอกเพศเมียทรงกลม ออกดอกตลอดปีผลเกือบกลม ขนาด 15-20 เซนติเมตรสีเขียวอมเหลือง ภายในมีเนื้อนุ่ม ไม่มีเมล็ดสามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย [38] โดยแก่นสาเกที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้มาเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2554 จากโรงเรียนอนุบาลโรจนวิทย์ จังหวัดพิษณุโลก ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ต้นสาเก (*Artocarpus incisus*)

2.2 การสกัดและการแยก artocarpin จากแก่นของต้นสาเก [34, 37]

นำแก่นของต้นสาเกมาสับเป็นชิ้นขนาด $3 \times 3 \times 0.3$ ลูกบาศก์เซนติเมตรดังแสดงในรูปที่ 2 นำไปอบให้แห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปสับให้มีขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.3$ นำชิ้นแก่นสาเกจำนวน 2.7 กิโลกรัมมาหมักด้วย ET_2O โดยใช้วิธี maceration ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 2 รอบ (1 รอบใช้เวลา 2 วัน) นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน จากนั้นกำจัด ET_2O โดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสจะได้สารสกัดหยาบปริมาณ 33.13 กรัม โดยประมาณ (คิดเป็นร้อยละ 1.23 ของแก่นสาเกที่นำมาสกัดทั้งหมด) นำสารสกัดหยาบที่แห้งแล้วในปริมาณ 2.7 กรัม แપ้คลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Silica gel 60 เก็บ fraction แบบ gradient โดยใช้ mobile phase คือ

hexane และ ethyl acetate จะได้ผงสีเหลืองของสาร artocarpin (ในการศึกษานี้ใช้ชื่อว่า isolated artocarpin) ในปริมาณ 0.47 กรัม โดยประมาณ (คิดเป็นร้อยละ 17.41 ของสารสกัดหยาบ) ลักษณะของสารสกัดที่ได้แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 แก่นต้นสาเกลับ



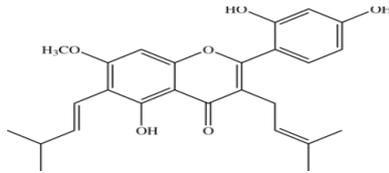
สารสกัดหยาบ



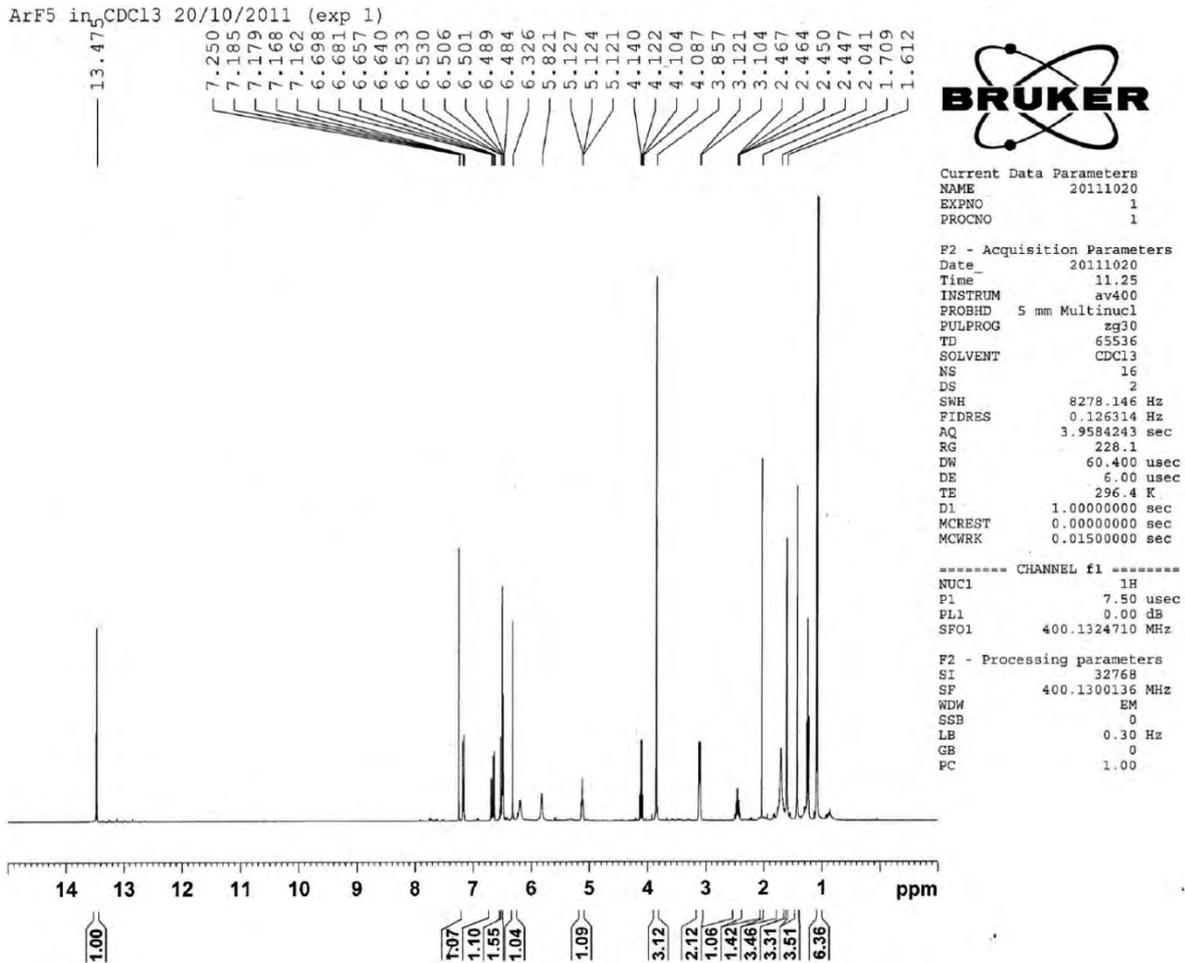
isolated artocarpin

รูปที่ 3 ลักษณะของสารสกัดที่ได้

นำสารสกัดหยาบ และ isolated artocarpin มาวิเคราะห์ปริมาณ artocarpin โดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ artocarpin reference ที่แยกได้ในการศึกษาก่อนหน้านี้มาใช้เป็น standard material โครงสร้างทางเคมี และ nuclear magnetic resonance, (NMR) ของ artocarpin reference ได้แสดงในรูปที่ 4 และ 5



รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ artocarpin



รูปที่ 5 NMR spectrum ของ artocarpin reference ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณ artocarpin โดย HPLC

โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังต่อไปนี้ [34, 37]

Column: Gemini column C18 ขนาด 250 มิลลิเมตร x 4.60 มิลลิเมตร

Mobile phase: Methanol : น้ำ (80 : 20)

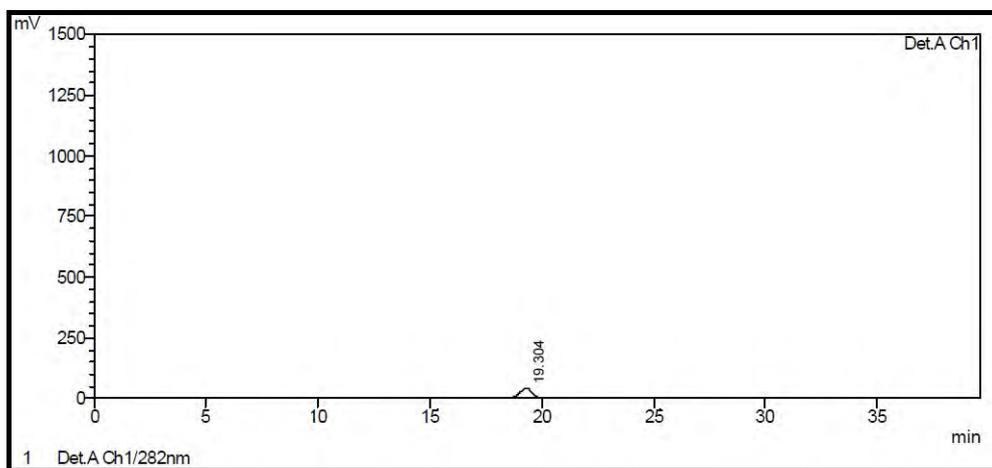
Flow rate: 1 มิลลิลิตรต่อนาที

Injection Volume: 20 ไมโครลิตร

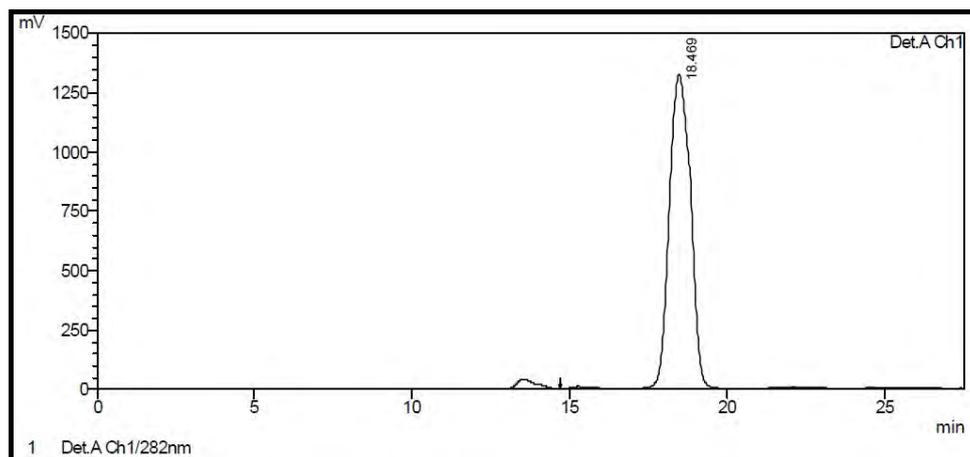
UV absorption: 282 นาโนเมตร

Standard material: artocarpin reference (มี artocarpin 90.6%)

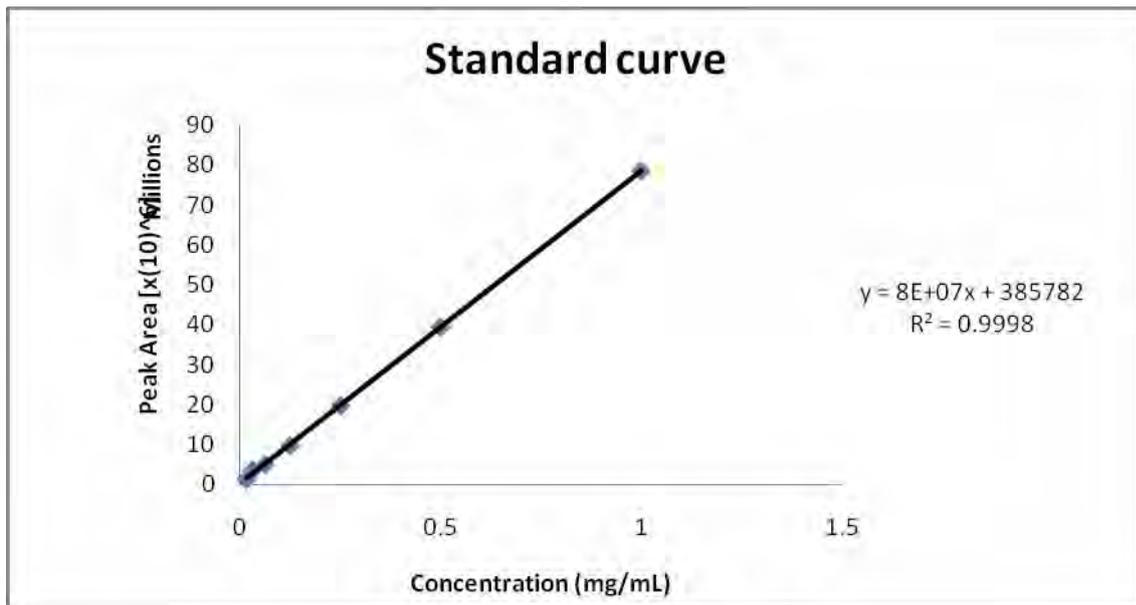
ตัวอย่าง chromatogram ของ artocarpin reference ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (0.0156 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) และสูงสุด (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) แสดงใน รูปที่ 6 และ 7 และกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่าง artocarpin reference ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0156, 0.0313, 0.0625, 0.0125, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และพื้นที่ภายใน chromatogram (peak area) แสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 6 HPLC chromatogram ของ artocarpin reference ที่ความเข้มข้น 0.0156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

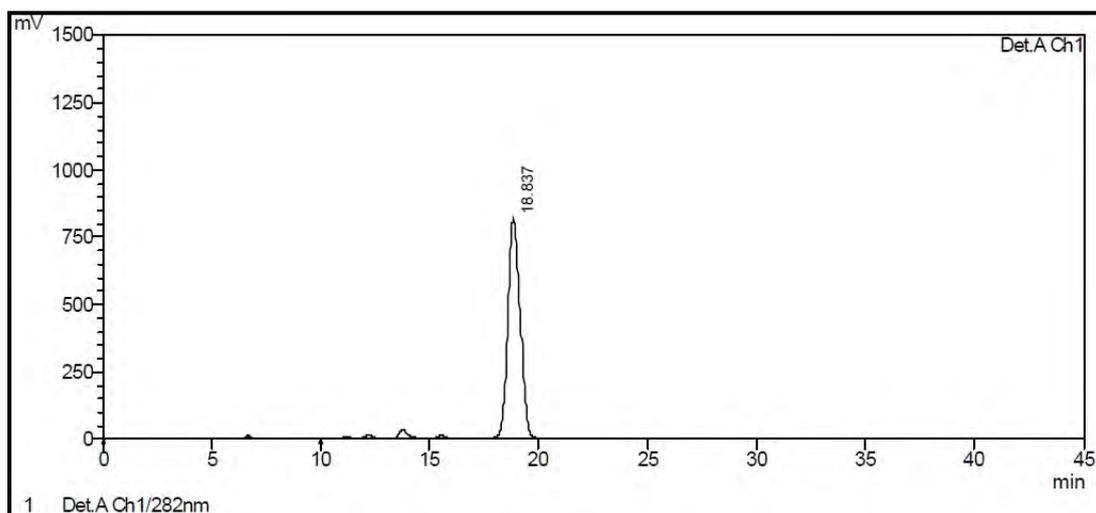


รูปที่ 7 HPLC chromatogram ของ artocarpin reference ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

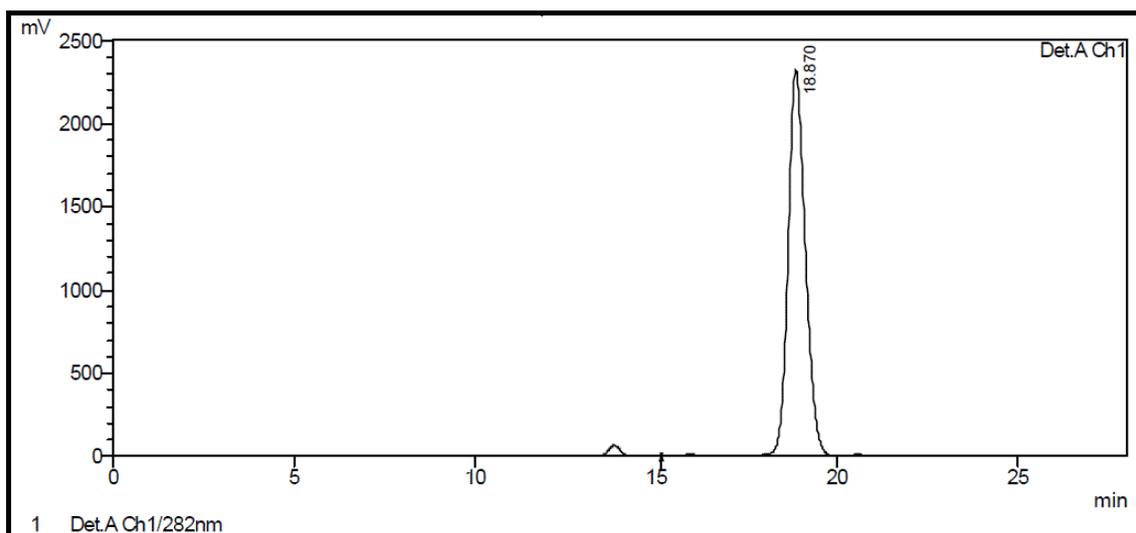


รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ artocarpin reference และพื้นที่ภายใน chromatogram (peak area)

พบว่าในสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin มีปริมาณ artocarpin โดยเฉลี่ยเท่ากับ 43.85 ± 0.03 และ 88.18 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ตัวอย่าง chromatogram ของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแสดงในรูปที่ 9 และ 10



รูปที่ 9 HPLC chromatogram ของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 10 HPLC chromatogram ของ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบ และ isolated artocarpin ที่เตรียมได้จะถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป เพื่อต้องการทราบว่าสารสกัดหยาบจะให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระและการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกับสารสกัดที่มีปริมาณ artocarpin สูงมากกว่า 2 เท่า เช่น isolated artocarpin หรือไม่ เนื่องจากในสารสกัดหยาบนอกจาก artocarpin ที่พบเป็นสารหลักแล้ว ยังมีสารในกลุ่ม flavonoids ตัวอื่นๆ [34, 37] ที่อาจส่งผลในทางส่งเสริม หรือต้านผลของ artocarpin ต่อการต้านอนุมูลอิสระ และ/หรือ อาจผลต่อลักษณะทางกายภาพ และควมมีชีวิตต่อเซลล์

2.4 การวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบ และ isolated artocarpin [34]

สารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) โดยใช้สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในการทดสอบ ซึ่ง จะทำการศึกษาเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างควบคุม (วิตามินซีและวิตามินอี) โดยตัวชี้วัดประสิทธิภาพในการทดสอบสารละลายตัวอย่างคือการจางลงของสี DPPH

สารละลายตัวอย่างในการทดสอบ (สารสกัดหยาบ, isolated artocarpin, วิตามินซี และวิตามินอี) จะใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย จากนั้นจะนำสารละลายที่ได้ในความเข้มข้นต่างๆ (0.5–2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หยดลง 96-well plate ปริมาณ 75 ไมโครลิตรให้เกิดปฏิกิริยากับ DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ปริมาณ 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องในความมืดในการวัดสารละลายมาตรฐาน (blank solution) จะใช้ methanol แทนสารตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากัน เมื่อครบเวลา จึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Spectra

Count[®] microplate reader โดยจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาหาประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระเป็นจำนวนร้อยละของการจางสีของ DPPH โดยสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ} = [1 - (A_S / A_B)] \times 100$$

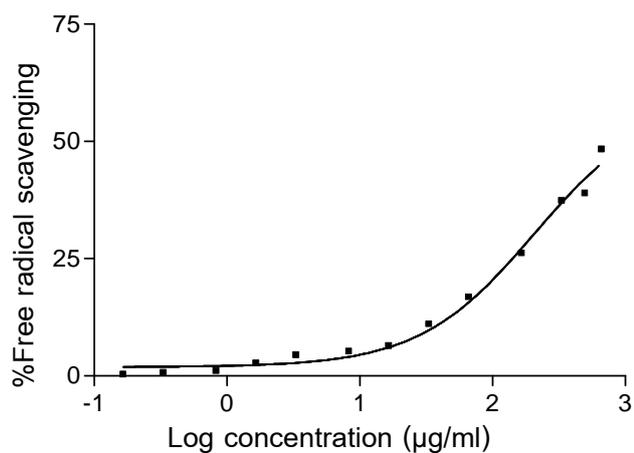
ซึ่ง A_S = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH โดยมีสารละลายตัวอย่างและ

A_B = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH โดยไม่มีสารละลายตัวอย่าง

ประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระดังแสดงโดยค่า EC_{50} (ค่าความเข้มข้นสมมูลที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50 ของประสิทธิภาพสูงสุด) ของสารสกัดหยาบ, isolated artocarpin, วิตามินซี และวิตามินอี แสดงในตารางที่ 1-4 ตามลำดับรูปที่ 11-14 ตามลำดับผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ (EC_{50} มีค่า 207.47 ± 9.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) น้อยกว่าของ isolated artocarpin (EC_{50} มีค่า 132.77 ± 2.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ประมาณ 2 เท่า อย่างไรก็ตามสารทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย free radical scavenging น้อยกว่าวิตามินซีและวิตามินอี

ตารางที่ 1 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ

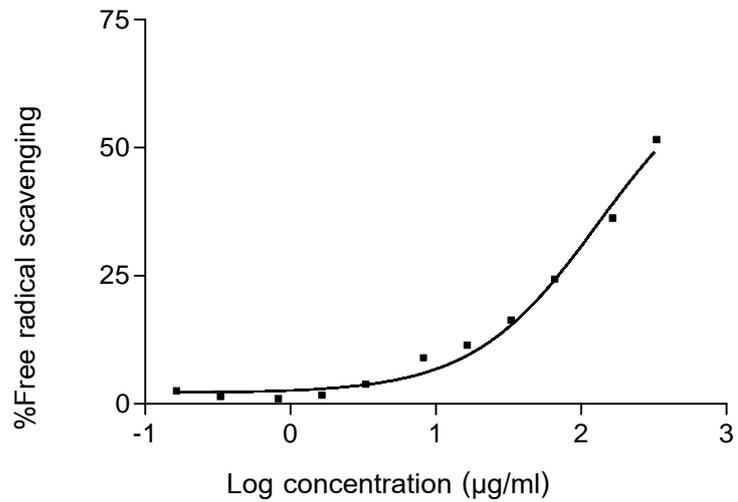
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ ($\mu\text{g/ml}$)	Free radical scavenging (%)	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
0.5	0.27 ± 0.2	207.5 ± 9.9
1	0.63 ± 0.6	
2.5	1.03 ± 0.8	
5	2.67 ± 0.5	
10	4.39 ± 0.3	
25	5.18 ± 0.1	
50	6.35 ± 0.1	
100	10.97 ± 1.2	
200	16.71 ± 2.3	
500	26.05 ± 0.3	
1000	37.25 ± 2.8	
1500	38.93 ± 1.8	
2000	48.26 ± 3.2	



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของสารสกัดหยาบ

ตารางที่ 2 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ isolated artocarpin

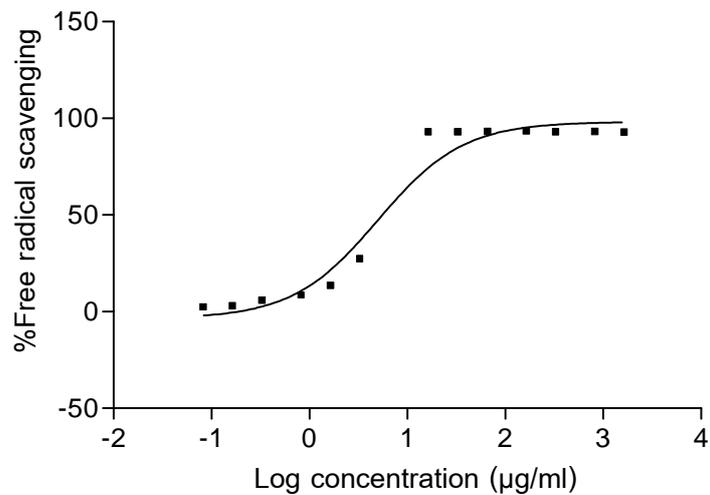
ความเข้มข้นของ isolated artocarpin (µg/ml)	Free radical scavenging (%)	EC ₅₀ (µg/ml)
0.5	2.38±1.5	132.7±2.7
1	1.27±1.3	
2.5	0.92±0.7	
5	1.52±0.6	
10	3.63±1.5	
25	8.38±3.7	
50	11.33±1.4	
100	16.24±0.5	
200	24.23±2.1	
500	36.18±1.2	
1000	51.48±2.1	



รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของ isolated artocarpin

ตารางที่ 3 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี

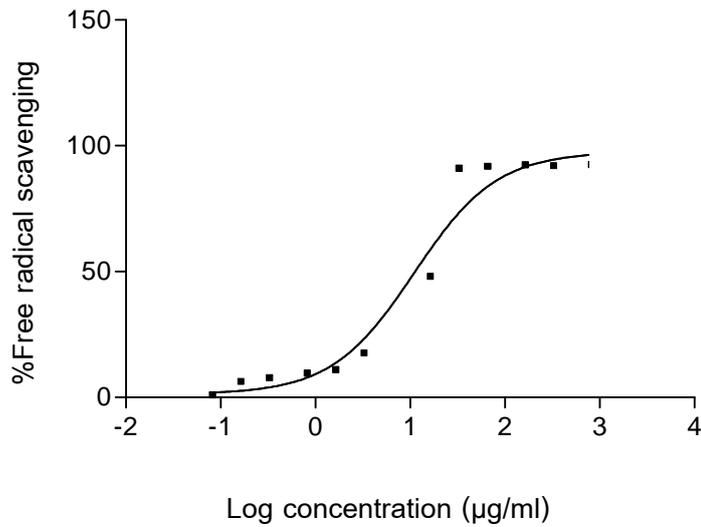
ความเข้มข้นของวิตามินซี (µg/ml)	Free radical scavenging (%)	EC ₅₀ (µg/ml)
0.25	2.06±3.0	4.9±0.1
0.5	2.75±1.4	
1	5.53±1.1	
2.5	8.21±1.0	
5	13.21±1.4	
10	27.01±4.2	
50	92.69±0.3	
100	92.82±0.4	
200	92.98±0.4	
500	93.01±0.3	
1000	92.78±0.4	
2500	92.88±0.2	
5000	92.61±1.0	



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของวิตามินอี

ตารางที่ 4 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี

ความเข้มข้นของวิตามินอี (µg/ml)	Free radical scavenging (%)	EC ₅₀ (µg/ml)
0.25	0.78±0.1	11.0±0.5
0.5	6.05±1.3	
1	7.55±1.6	
2.5	9.48±1.3	
5	10.78±1.1	
10	17.46±2.6	
50	47.86±1.8	
100	90.76±0.8	
200	91.54±0.4	
500	92.20±0.1	
1000	91.83±0.8	
2500	92.29±0.1	
5000	92.41±0.5	



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้น (log) ของวิตามินอี

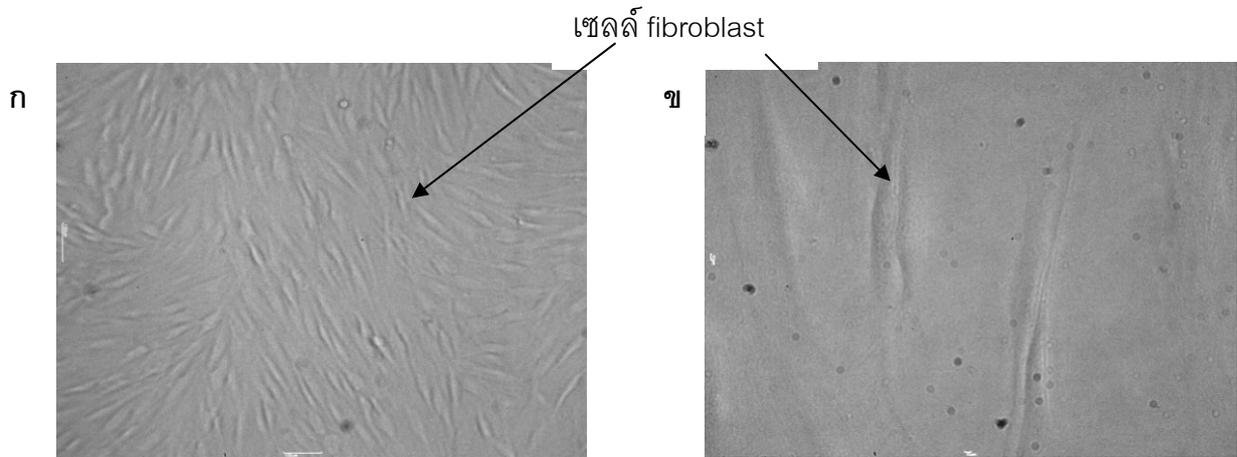
2.5 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) [16, 37] และ เคราติโนไซต์ (keratinocytes) [39]

ชิ้นเนื้อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากหน้าท้อง (human abdominal) ของผู้หญิงไทยสุขภาพดีวัย 47 ปี นำชิ้นเนื้อที่ได้จากห้องผ่าตัดล้างใน PBS (phosphate buffer saline) ที่มี penstrep 1 เฟอร์เซ็นต์แช่เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ซึ่งเปลี่ยนสารละลายทุกครั้งที่ครบกำหนดเวลา จากนั้นแช่ชิ้นเนื้อใน complete medium ซึ่งประกอบด้วย DMEM – LG, FBS, penstrep และ fungizone แล้วทำการตัดชิ้นไขมันทิ้ง พร้อมทั้งตัดให้มีขนาดประมาณ 5 x 5 ตารางมิลลิเมตรนำไปแช่ใน dispase solution เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลาให้ทำการลอกชั้น epidermis และ dermis ออกจากกัน

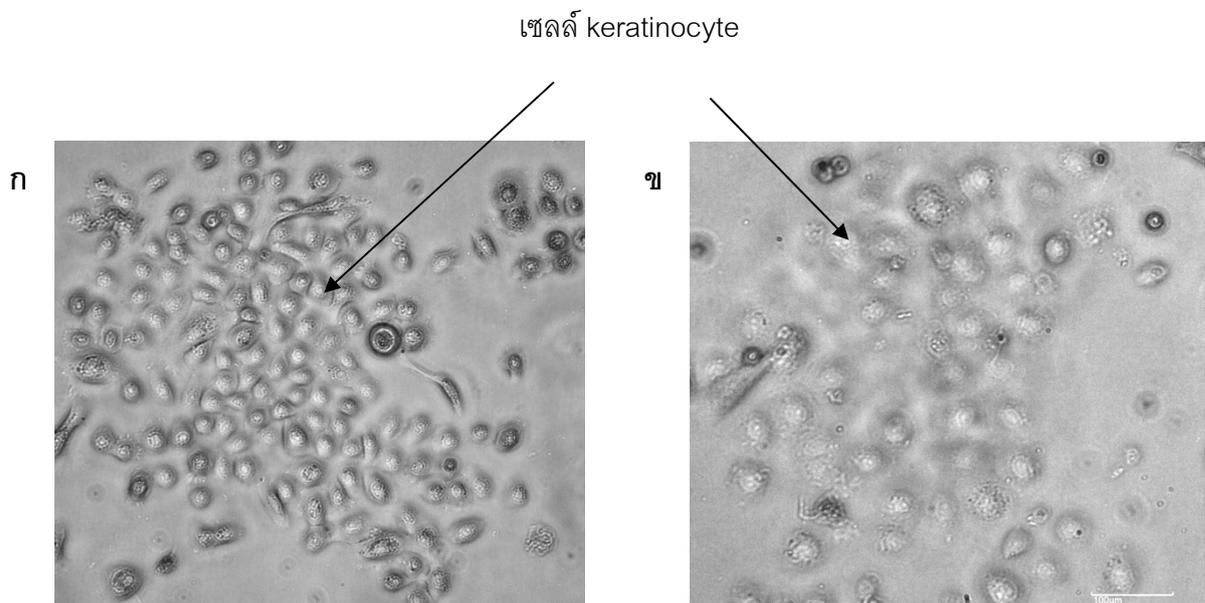
- การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ นำผิวหนังชั้น dermis มาตัดให้มีขนาด 2 x 2 ตารางมิลลิเมตรใน DMEM – LG วางลงใน Petri dish 5 นาที แล้วเติม complete medium ลงไป โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณ CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบร-บลาสต์ซึ่งมีรูปร่างเป็นแบบ spindle แสดงในรูป 15

- การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์เคราติโนไซต์ นำผิวหนังชั้น epidermis มาตัดละเอียดใน 0.25% trypsin solution แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนกระจายใน K-SFM แล้วกรองด้วย cell stainer ที่มีขนาดความละเอียด 100 ไมโครเมตร เซลล์ที่ได้จะถูกเลี้ยงใน Petri

dish โดยทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณ CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เคราติโนไซต์ที่มีรูปร่างเป็นแบบ cuboid แสดงในรูป 16



รูปที่ 15 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 16 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เคราติโนไซต์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า

2.6 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

2.6.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบ และ isolated artocarpin

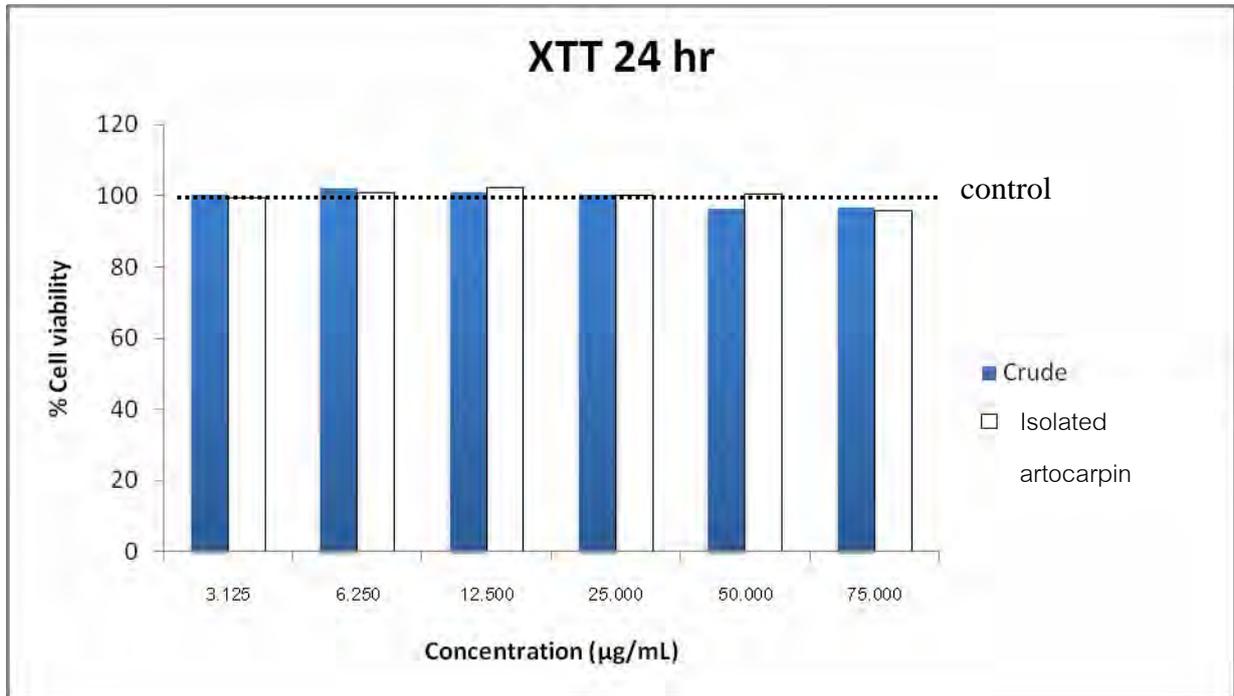
ผลของสารสกัดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์จะศึกษาเพื่อคัดเลือกช่วงความเข้มข้นของสารสกัด และระยะเวลาที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และ/หรือทำให้เซลล์ตาย เพื่อที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายในปริมาณไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) เพื่อช่วยให้สารสกัดสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้สารสกัดที่ความเข้มข้นมากกว่า 75 ช่วงระยะเวลาที่เซลล์ถูกบ่มกับสาร (incubation period) เท่ากับ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง [34, 40, 41] เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วง log phase (ช่วงที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่คงที่) ณ สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ จะพบในช่วง 1 – 3 วันของการเพาะเลี้ยง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

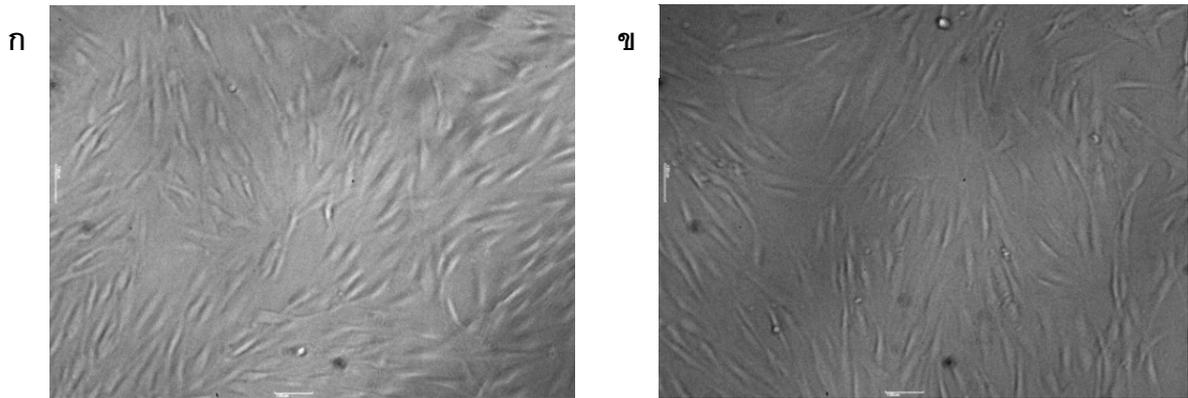
1. นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ passage 5 (#5) จำนวน 1×10^4 เซลล์ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน 96well microplate นาน 24 ชั่วโมง มาบ่มกับสารสกัดหยาบ หรือ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่กำหนด

2. ทำการวัด cell viability โดยวิธี XTT (sodium 3'-[(phenyl-amino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) assay ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะปลดปล่อยเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลง tetrazolium salt XTT (สีเหลือง) ไปเป็น formazan dye (สีส้ม) ที่สามารถละลายได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate spectrophotometer ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (% cell viability) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

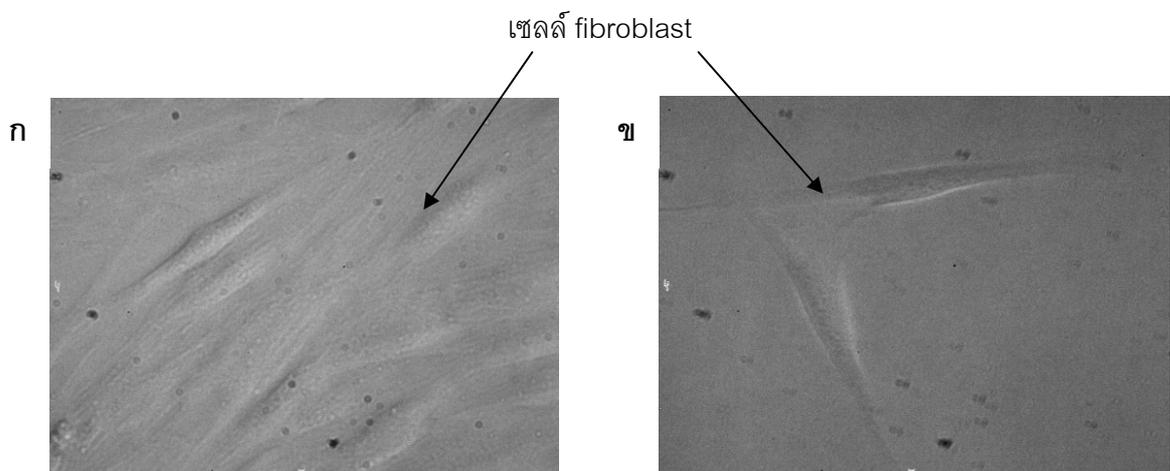
ผลของสารสกัดหยาบ และ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษา cell viability ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และลักษณะทางกายภาพของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากถูกบ่มกับสารเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 17-31 ตามลำดับผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบ หรือ isolated artocarpin ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตหลังจากที่ถูกบ่มกับสารนั้นที่ระยะเวลาต่างๆ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งรูปร่างของเซลล์ไม่แตกต่างไปจากเซลล์ปกติ คือยังคงลักษณะรูปกระสวย (spindle shape)



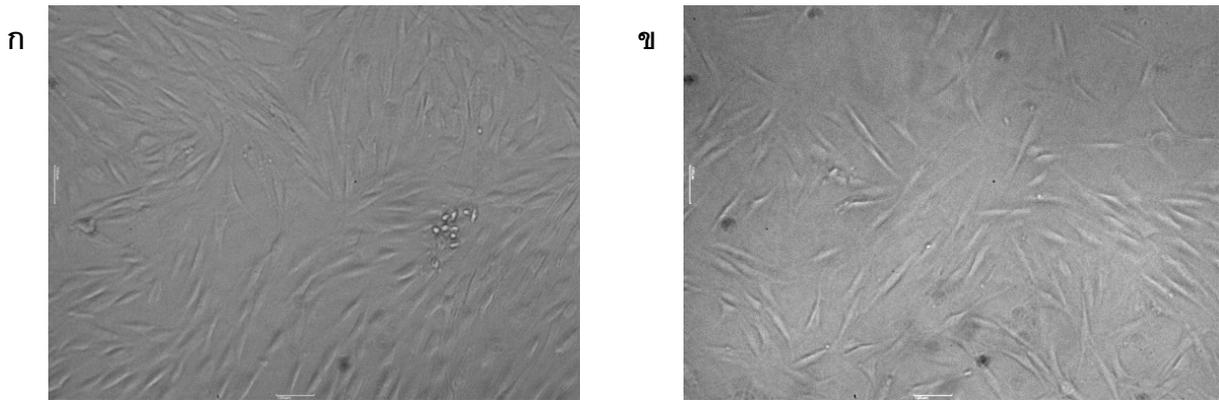
รูปที่ 17 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อ cell viability ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ หลังจากเซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125 - 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ cell viability \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



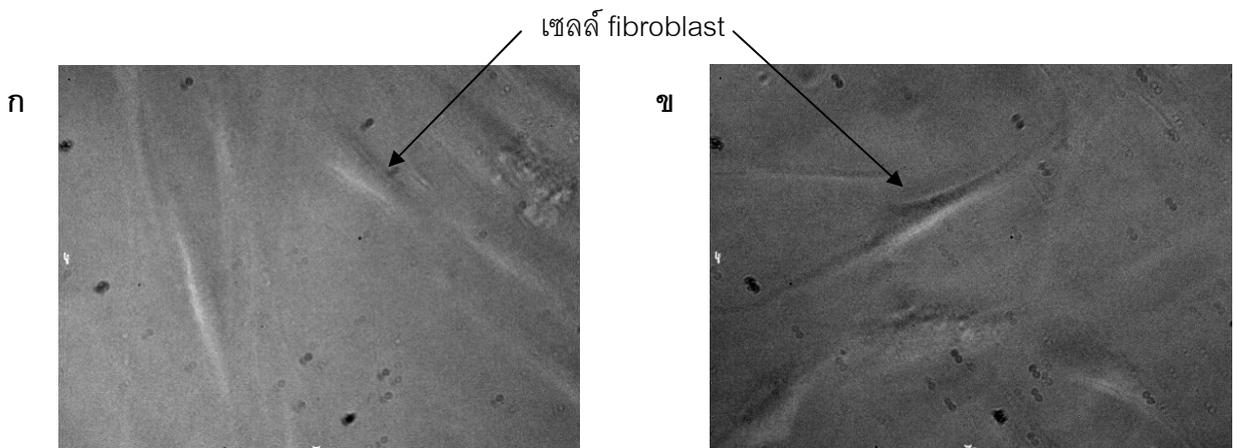
รูปที่ 18 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



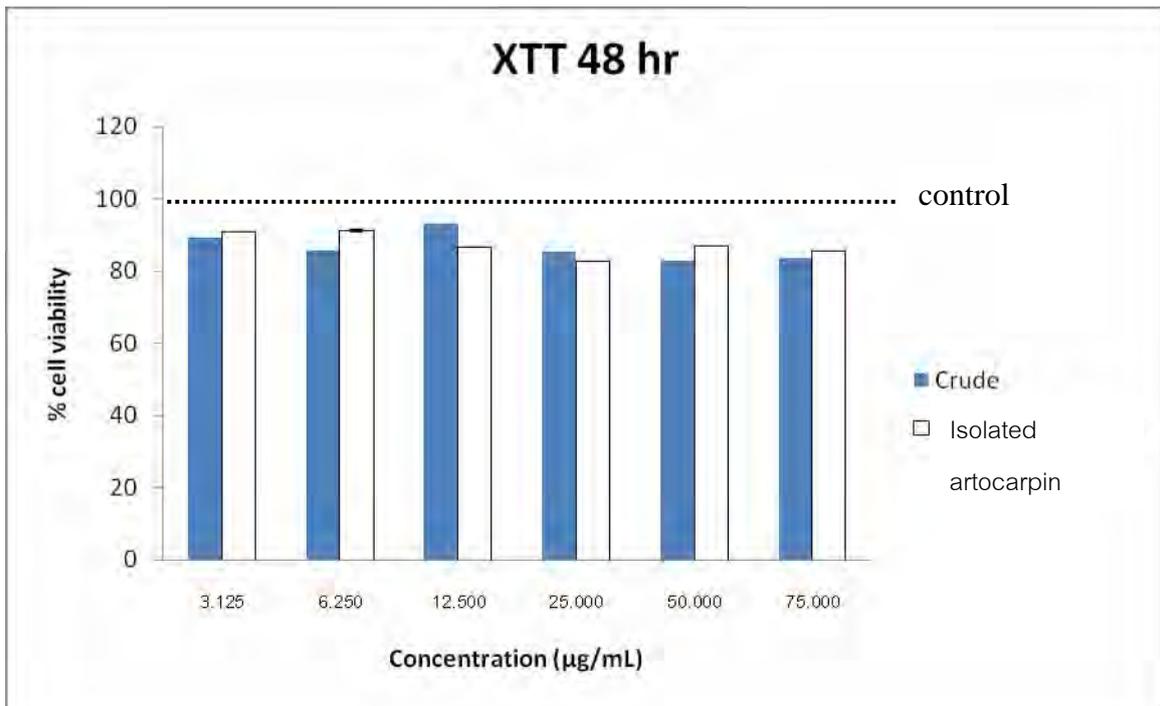
รูปที่ 19 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



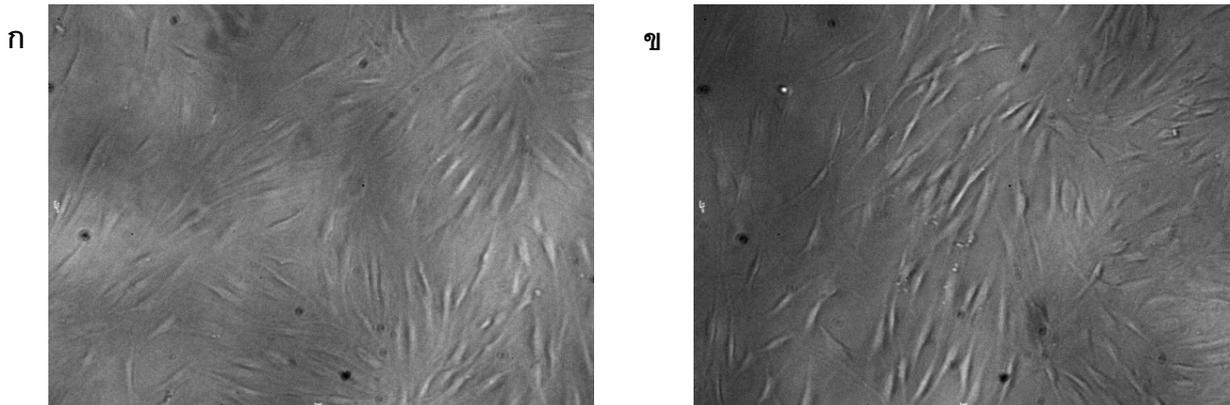
รูปที่ 20 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



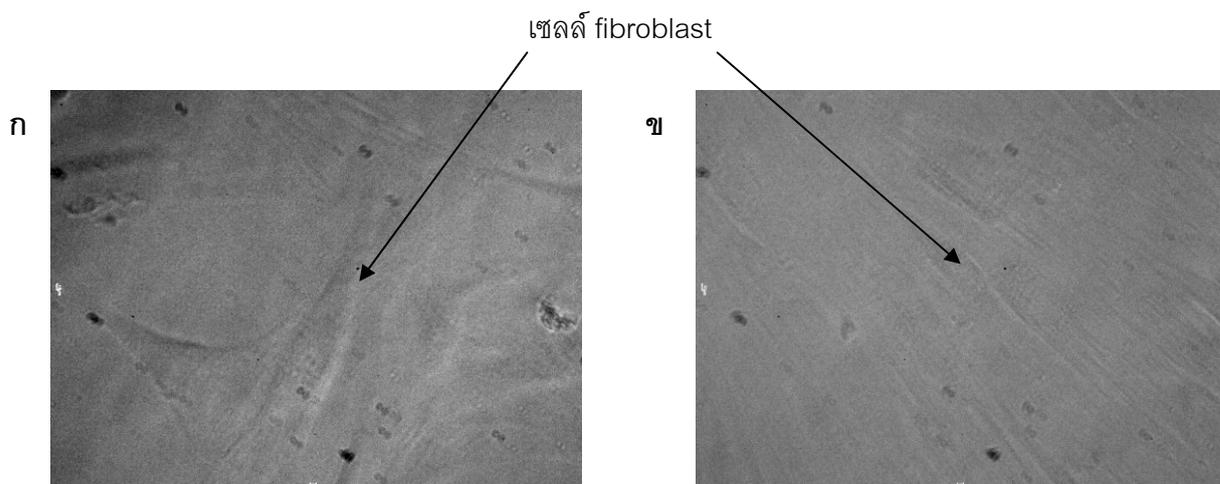
รูปที่ 21 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



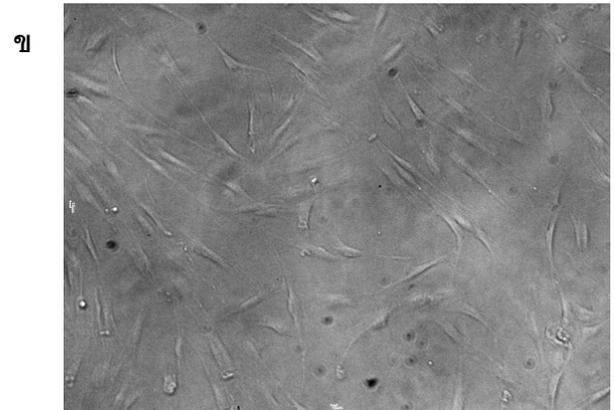
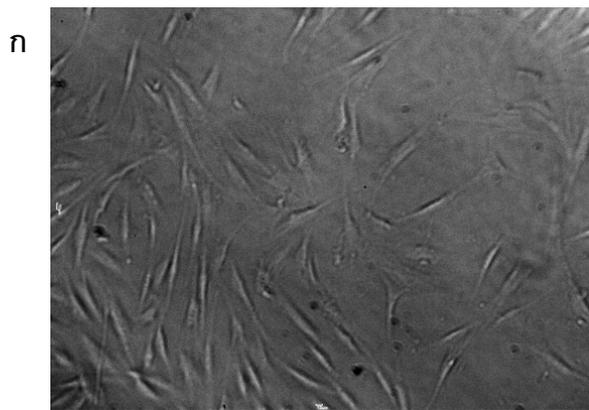
รูปที่ 22 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อ cell viability ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากเซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125–75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ cell viability ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



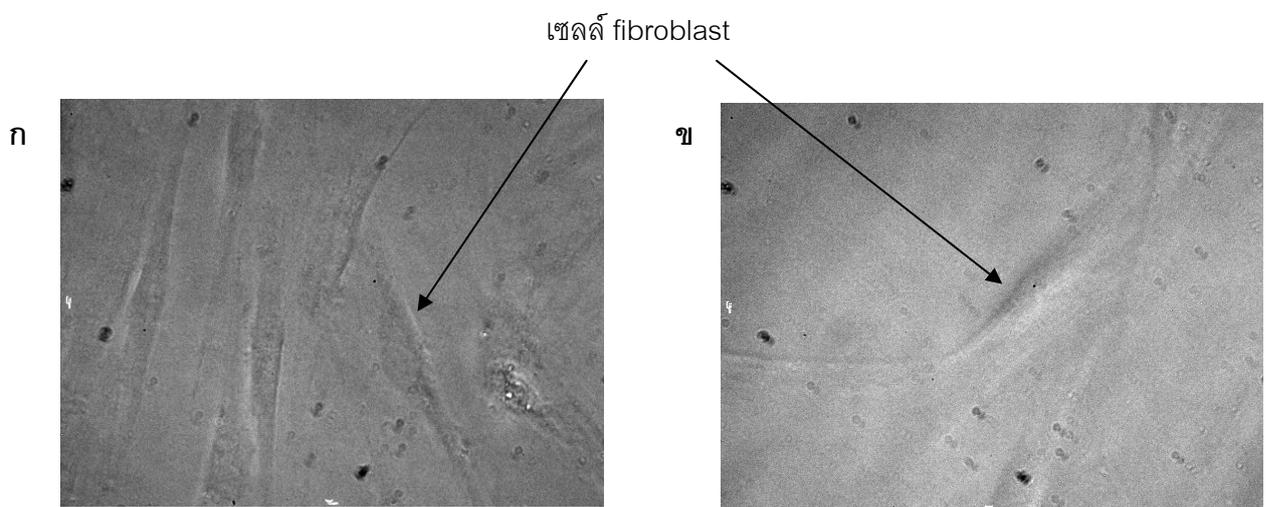
รูปที่ 23 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



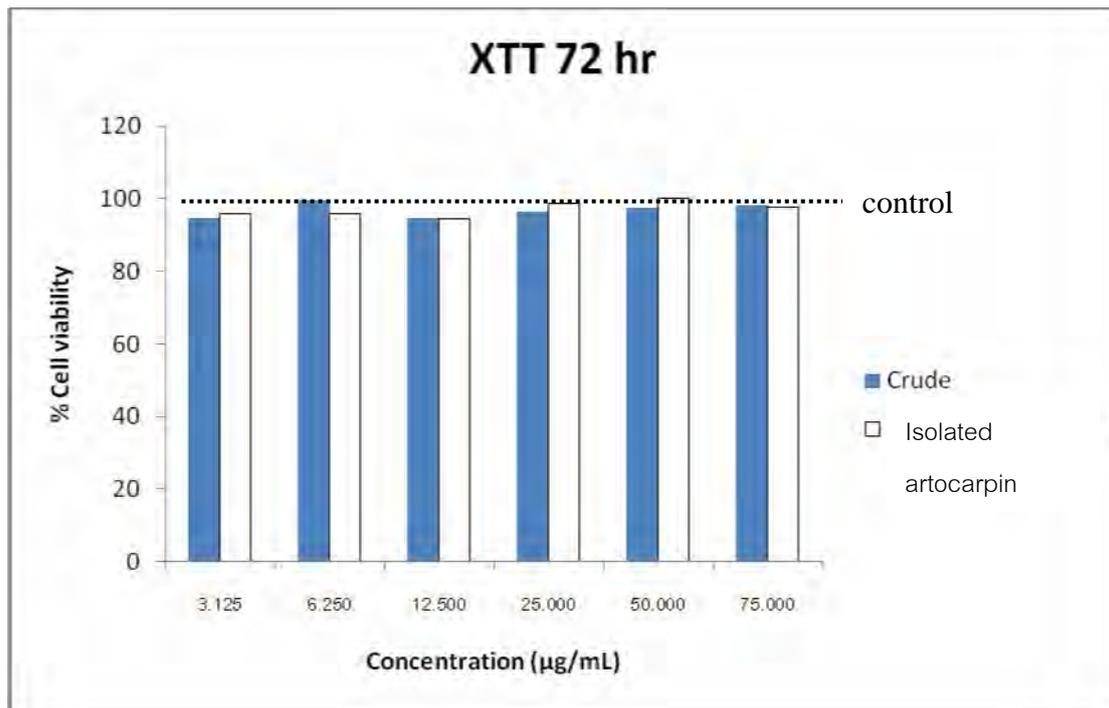
รูปที่ 24 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



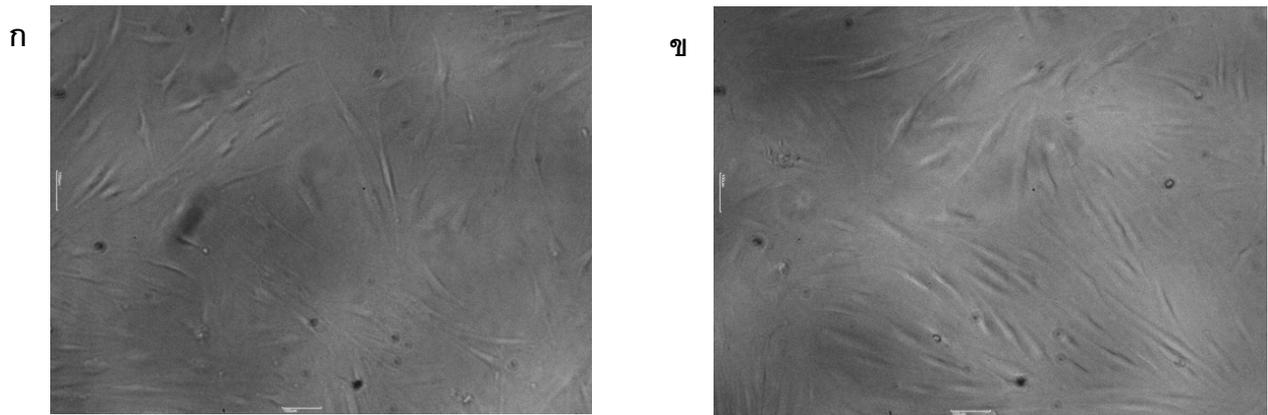
รูปที่ 25 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



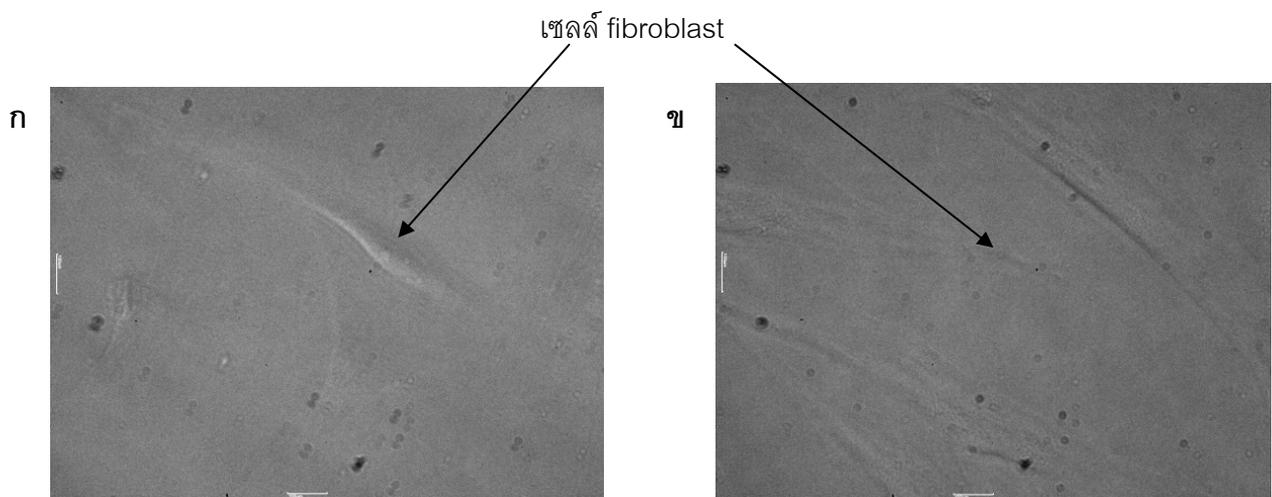
รูปที่ 26 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 27 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อ cell viability ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากเซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125–75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของ cell viability \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าจุดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

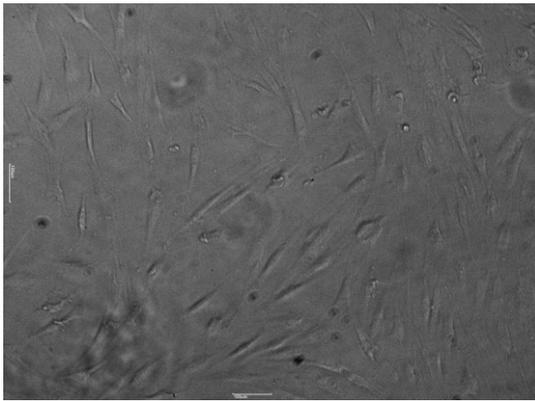


รูปที่ 28 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

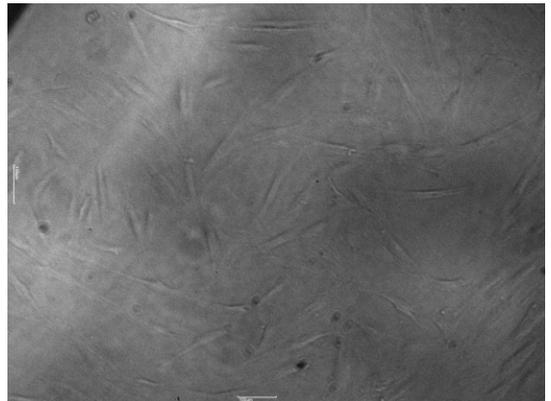


รูปที่ 29 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ก

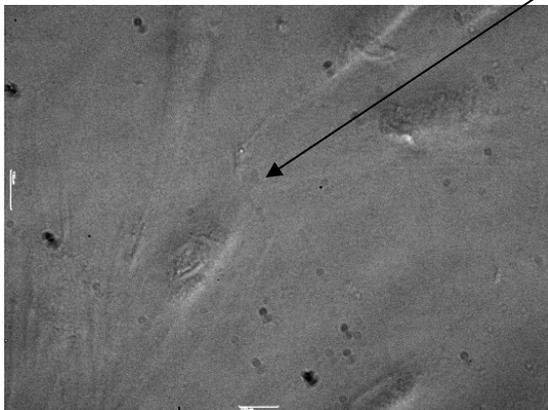


ข



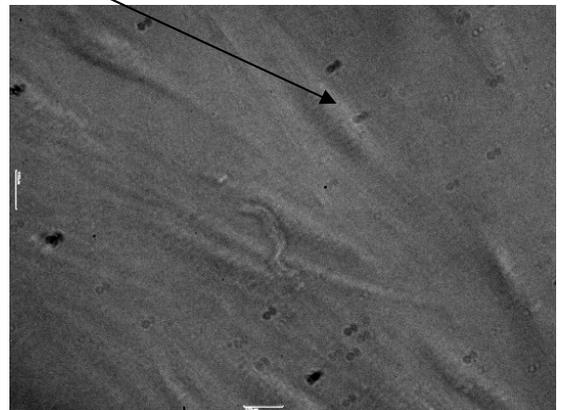
รูปที่ 30 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

ก



เซลล์ fibroblast

ข



รูปที่ 31 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2.6.2 การทดสอบผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (proliferation)

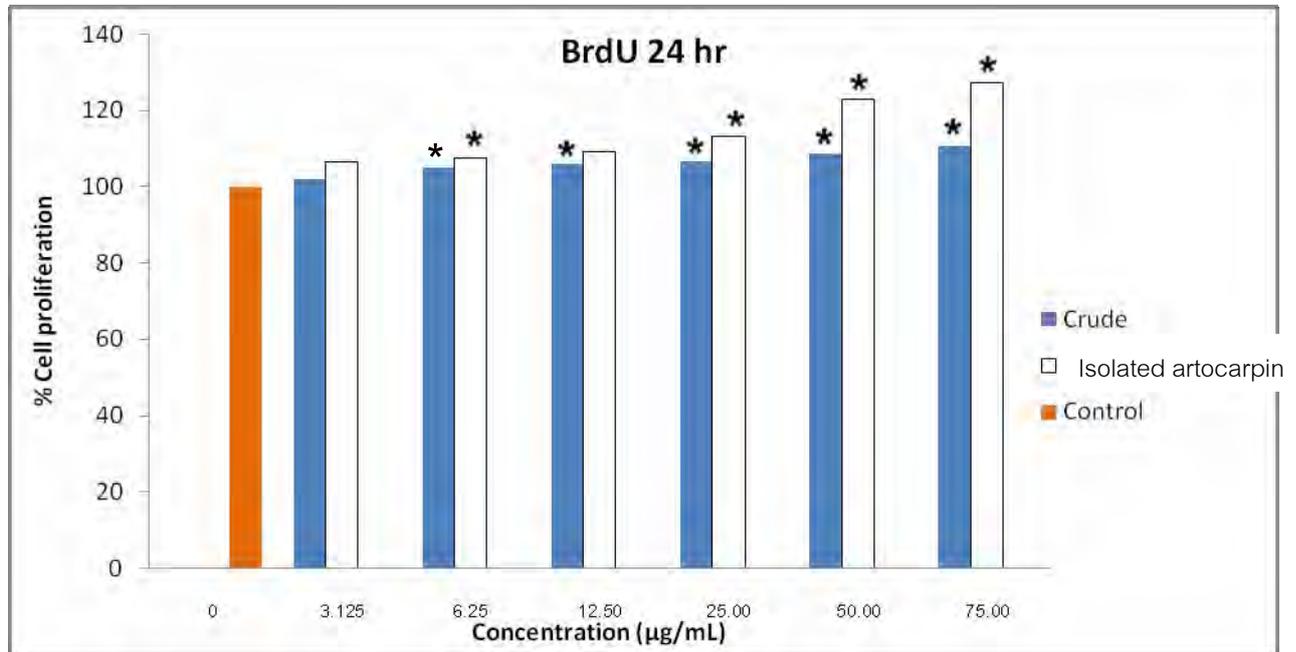
การประเมินผลของสารสกัดต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ใช้ thymidine analog 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)- colorimetric detection เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่เซลล์เพิ่มจำนวนได้ดีและไม่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง เพื่อจะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายในปริมาณไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) เพื่อช่วยให้สารสกัดสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ ช่วงระยะเวลาที่เซลล์ถูกบ่มกับสาร (incubation period) เท่ากับ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง [40, 41] เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่วง log phase (ช่วงที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่คงที่) ณ สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ จะพบในช่วง 1 – 3 วันของการเพาะเลี้ยง

การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

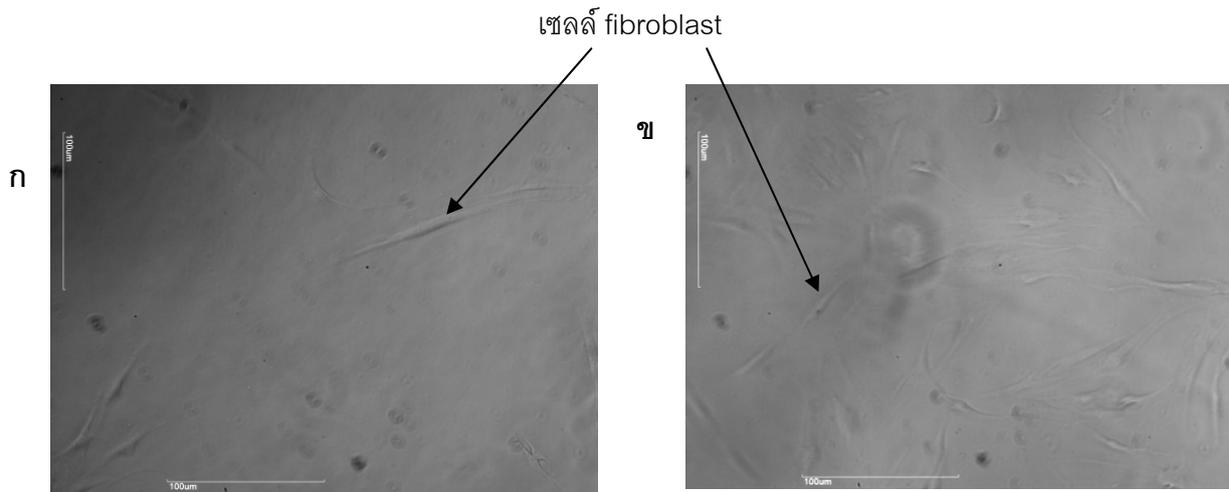
1. นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ #6 จำนวน 1×10^4 เซลล์ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน 96well microplate นาน 24 ชั่วโมง มาบ่มกับสารสกัดหยาบ หรือ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่กำหนด
2. ทำการวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยวิธี BrdU (thymidine analog 5-bromo-2-deoxyuridine) assay ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่า BrdU จะเข้าไปจับกับ DNA ของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว จากนั้นจึงตรวจโดยการที่ใช้ anti-BrdU antibody เข้าจับ แล้วสามารถวิเคราะห์ได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ปริมาณการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์จะแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (% cell proliferation) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นค่าดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจึงแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้น

ผลของสารสกัดหยาบ และ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และลักษณะทางกายภาพของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากถูกบ่มกับสารเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 32-46 ตามลำดับ ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ หรือ isolated artocarpin มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนของเซลล์หลังจากที่ถูกบ่มกับสารนั้น จะเพิ่มขึ้นหลังจากมีการเพิ่มเวลาในการบ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งลักษณะของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับผลที่ได้จากการศึกษา cell viability ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

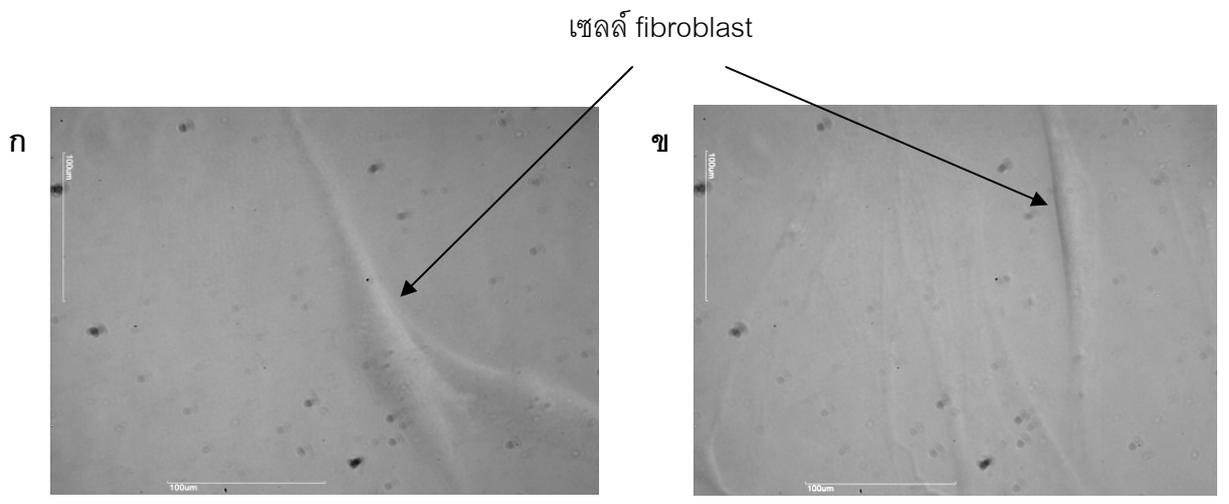
จากผลการศึกษา cell viability และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ทำให้ตัดสินใจเลือกใช้ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อการผลิตโปรตีนและเอนไซม์ที่มีผลต่อการสังเคราะห์และทำลายคอลลาเจน



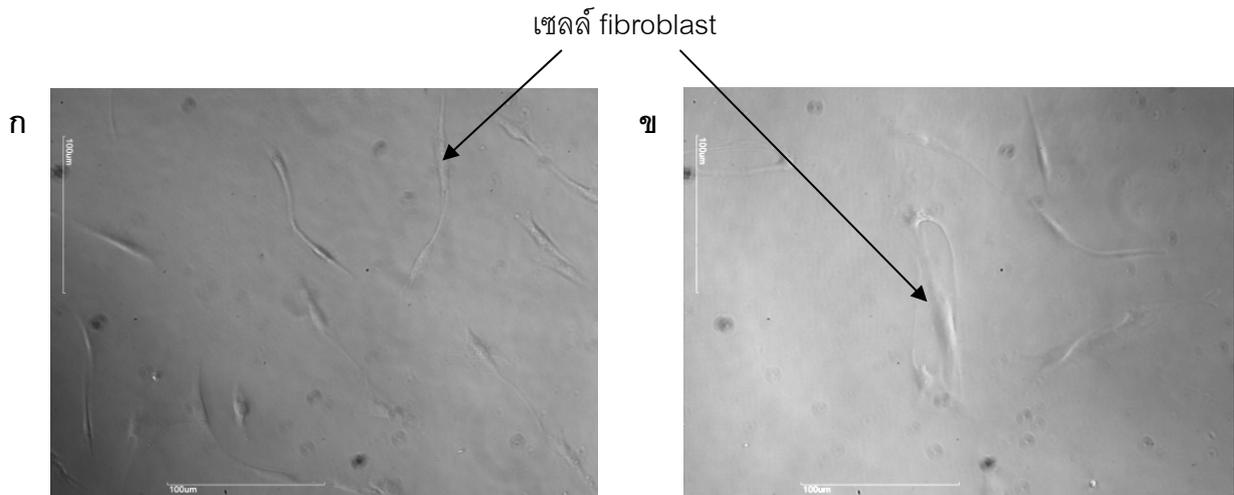
รูปที่ 32 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125–75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟแห่งแสดงค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าจุดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-testเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)



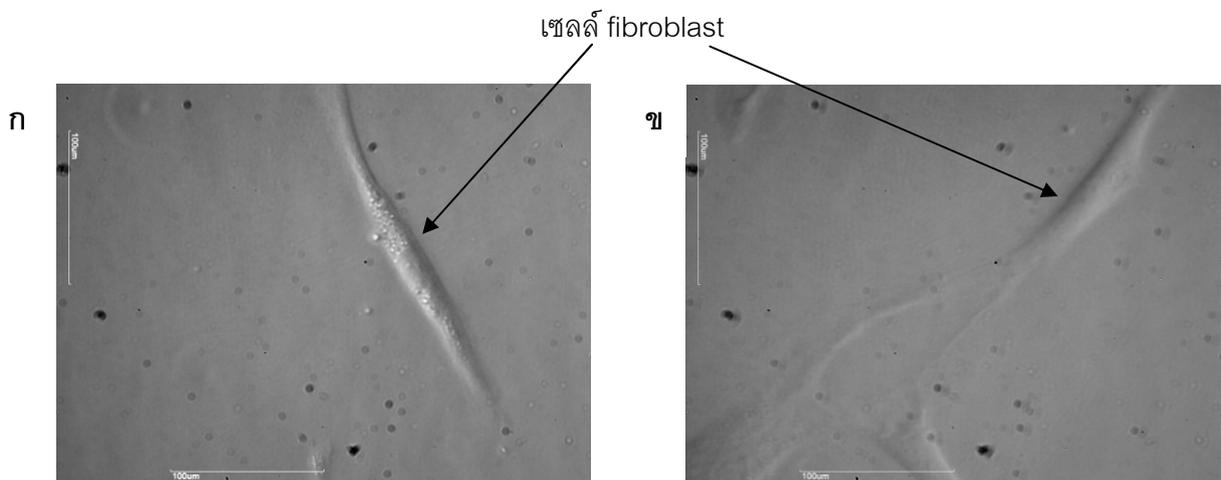
รูปที่ 33 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



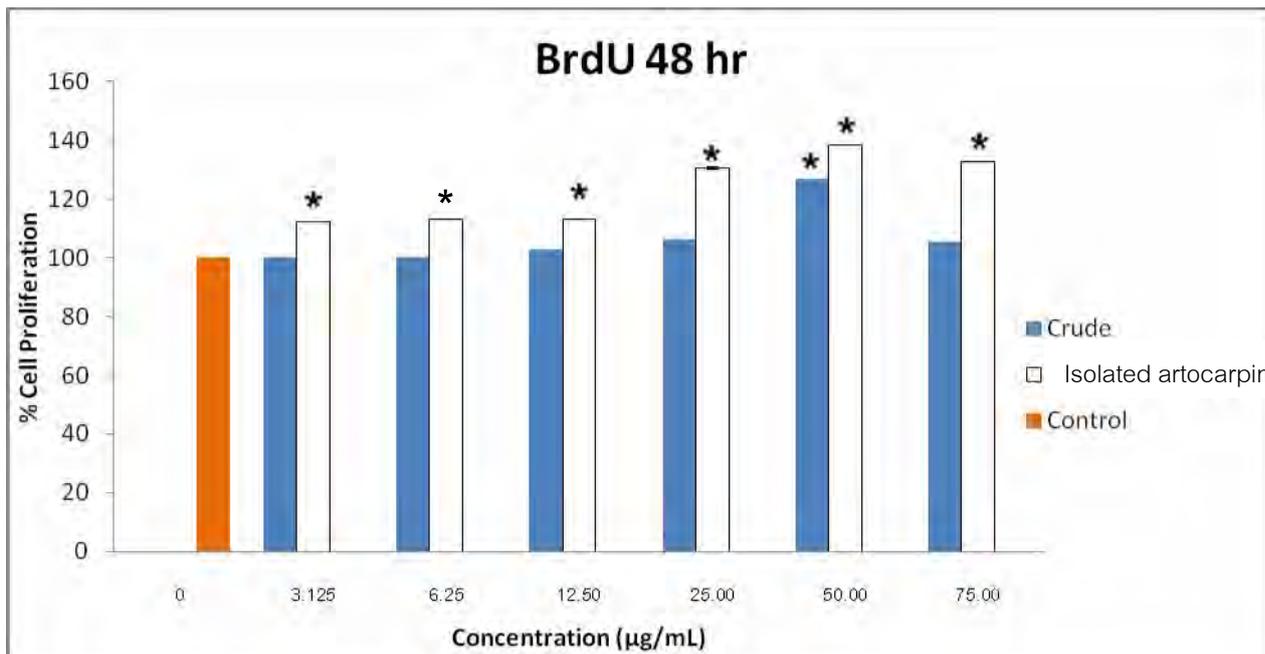
รูปที่ 34 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



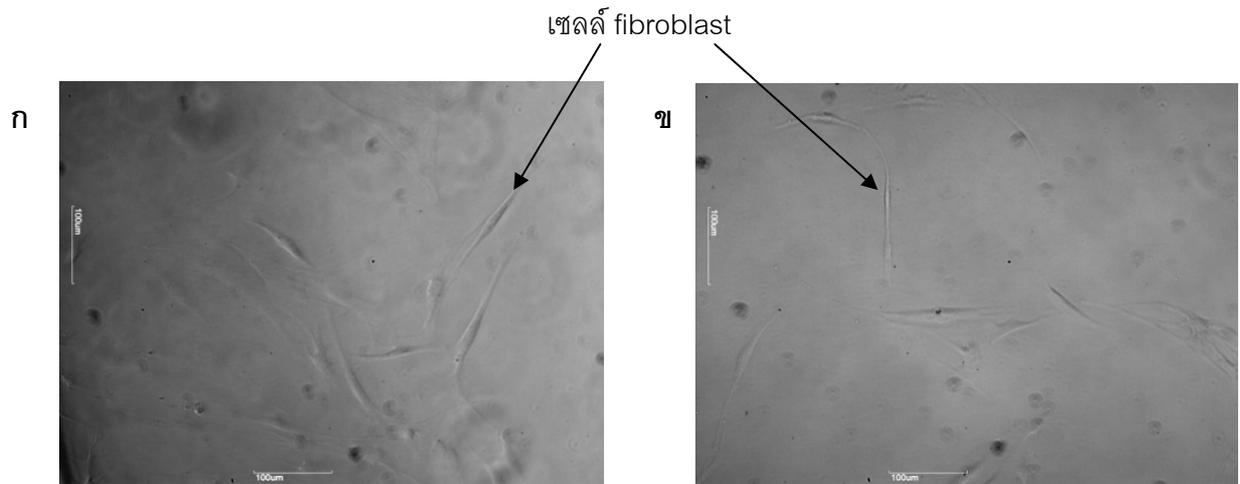
รูปที่ 35 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



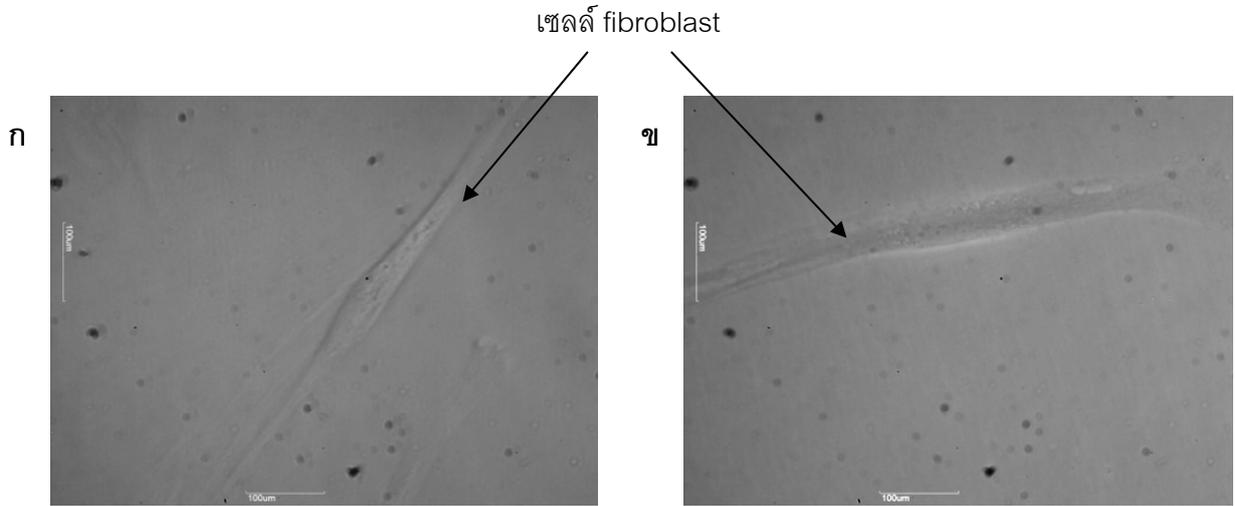
รูปที่ 36 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



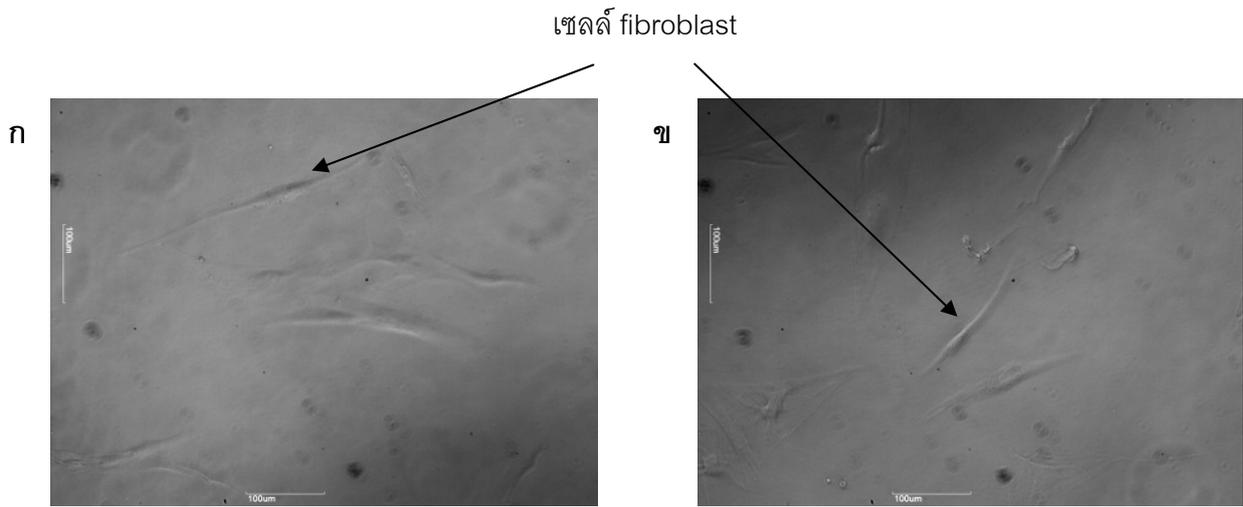
รูปที่ 37 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่ใช้เซลล์ถูกบ่มกับสารที่ความเข้มข้น 3.125–75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าจุดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)



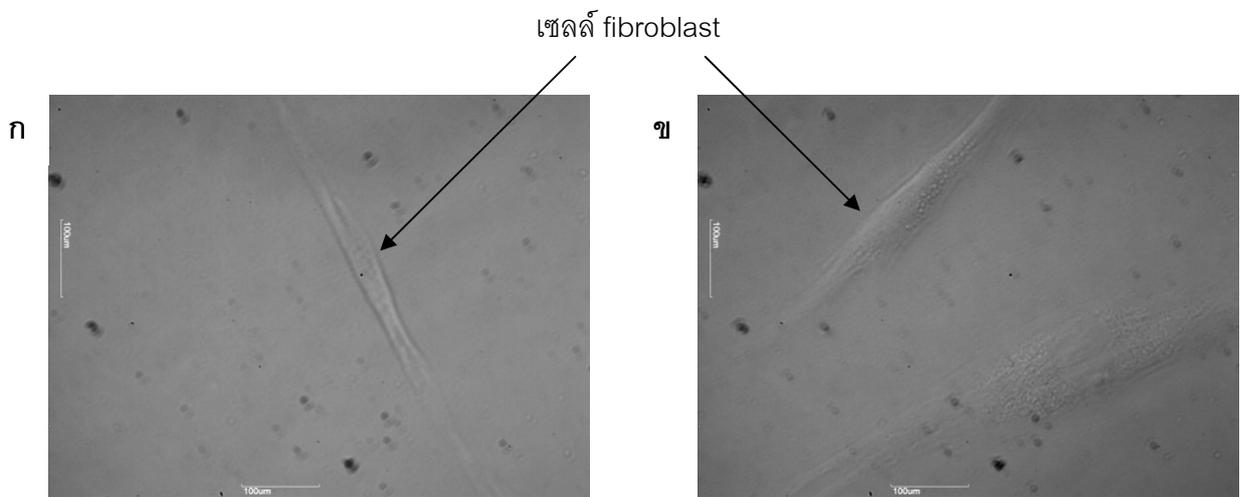
รูปที่ 38 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



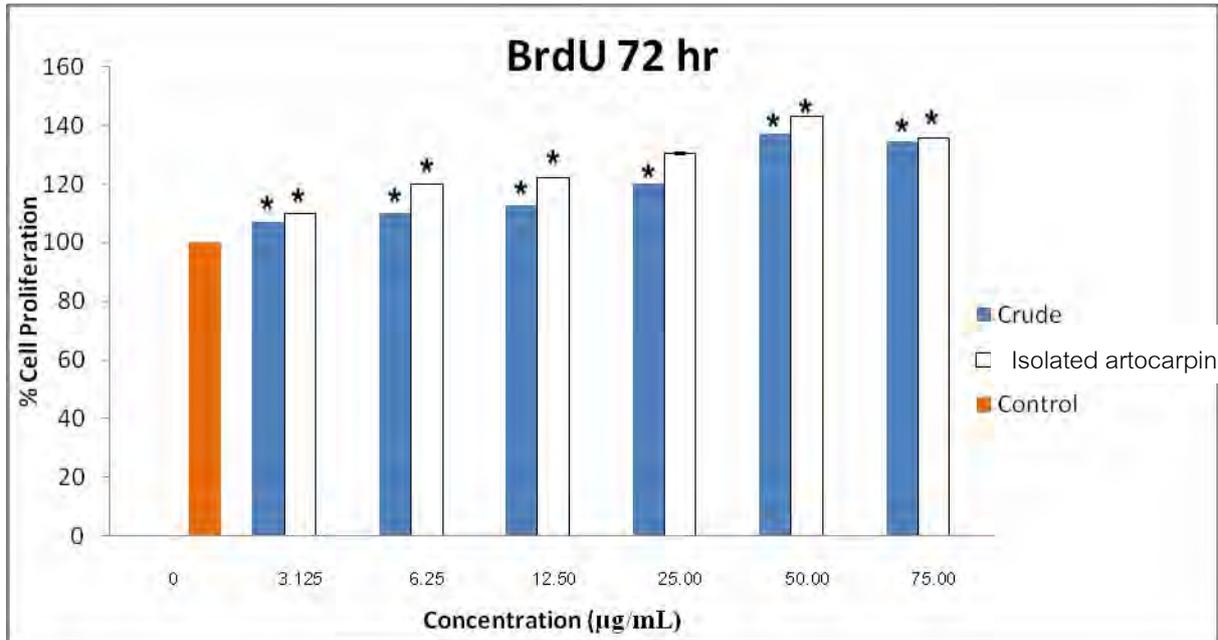
รูปที่ 39 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



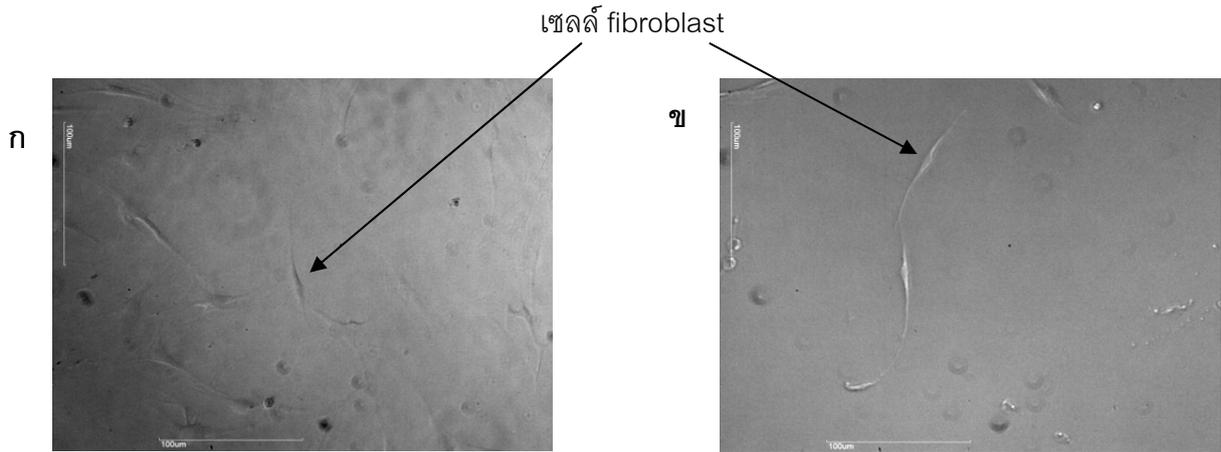
รูปที่ 40 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



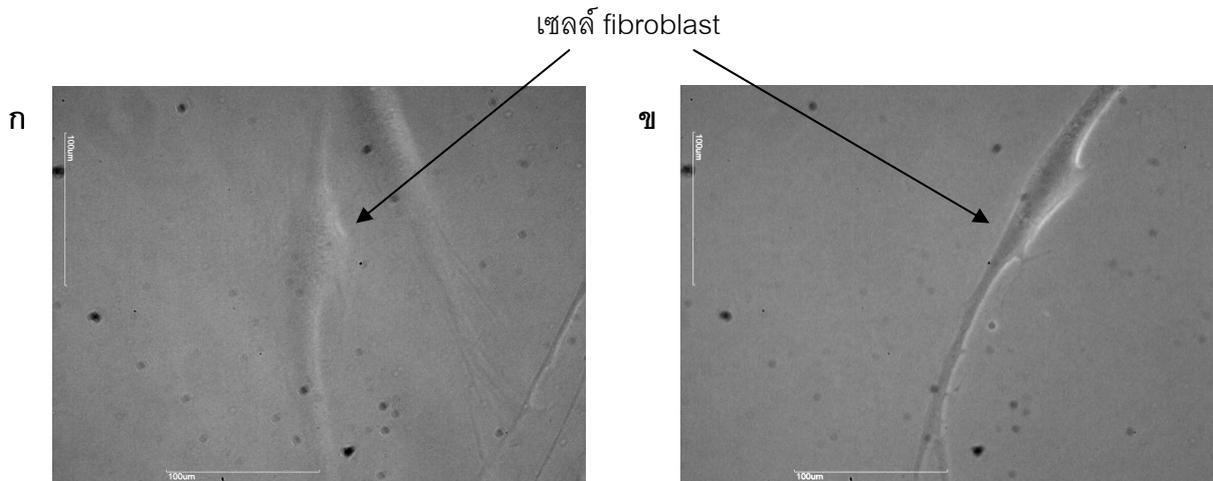
รูปที่ 41 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



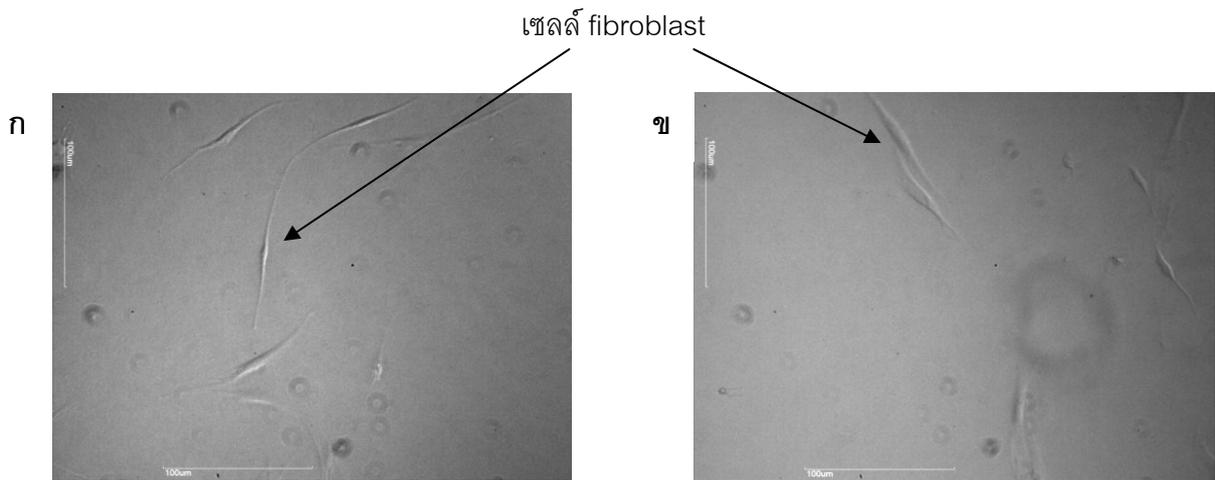
รูปที่ 42 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังจากที่เซลล์ถูกบ่มกับสารที่มีความเข้มข้น 3.125–75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (triplicate study) ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับให้ค่าจุดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)



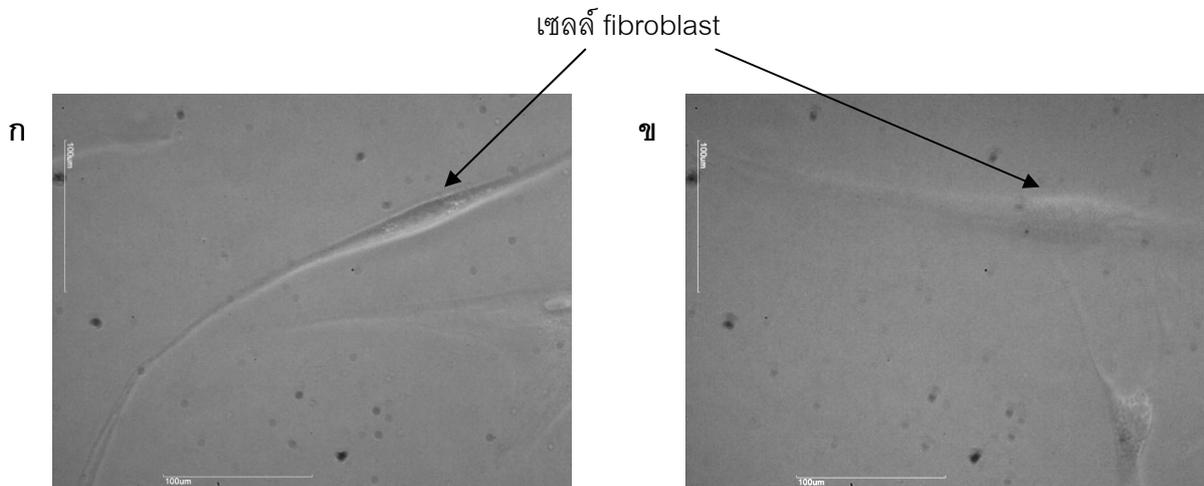
รูปที่ 43 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 44 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 45 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 46 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากที่ถูกบ่มกับ ก) สารสกัดหยาบ และ ข) isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2.7 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivities) ของ isolated artocarpin ต่อเซลล์ไฟโบร- บลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี

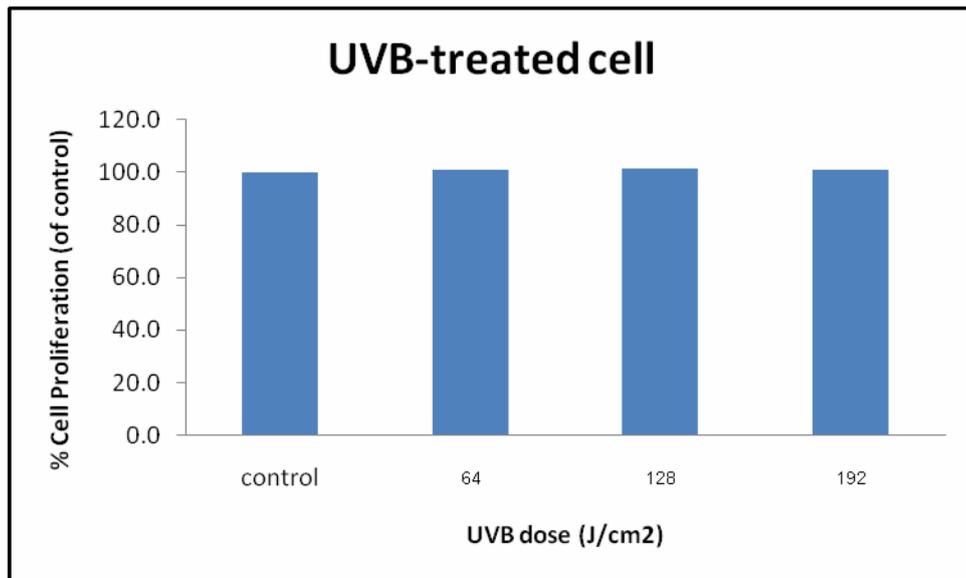
2.7.1 ทดสอบผลของความเข้มแสงของแสงยูวีบีต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ isolated artocarpin ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี ในขั้นแรกจำเป็นต้องหาความเข้มแสงที่เหมาะสม ในการฉายแสงยูวีบีโดยไม่ทำให้เซลล์ตายและ/หรือเปลี่ยนรูปร่างไป จึงใช้หลักการของ BrdU assay เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเซลล์หลังจากได้รับแสงยูวีบีที่ความเข้มต่างๆ แสงยูวีบีที่ใช้มีแหล่งกำเนิดจาก UVB chamber ที่ประกอบด้วยหลอด UVB Lamp (ชนิด 8 วัตต์ ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 275-305 นาโนเมตร, Toshiba, Japan) ที่ความเข้มแสง 64, 128 และ 192 จูลต่อตารางเซนติเมตร ช่วงระยะเวลาหลังฉายแสงยูวีบีก่อนทำการประเมินด้วย BrdU เท่ากับ 24 ชั่วโมง [40, 41] เนื่องจากการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (doubling time) จะใช้เวลาประมาณ 20 ชั่วโมง

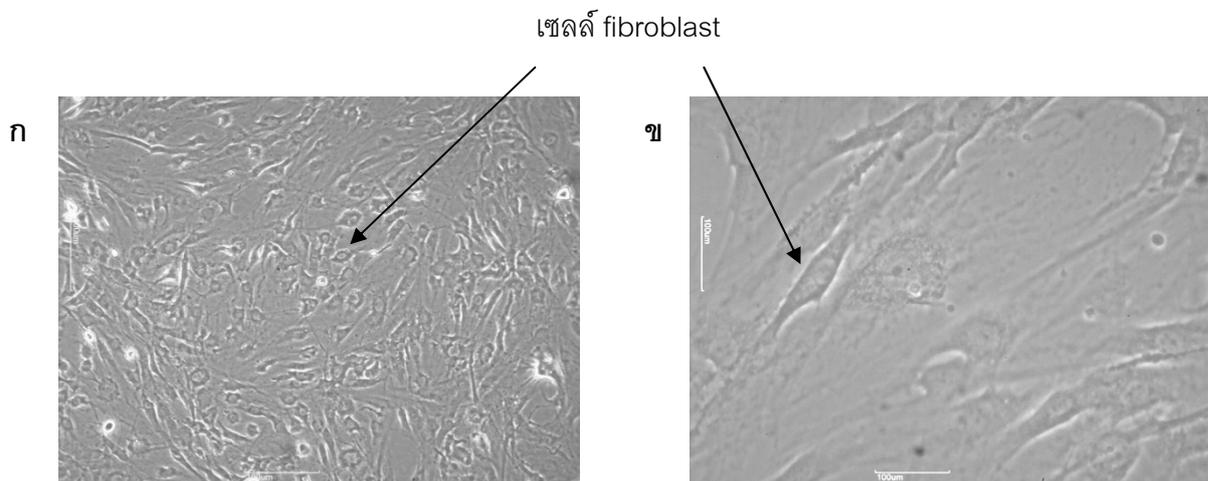
การทดสอบหาความเข้มแสงในการฉายยูวีบี มีดังนี้

1. นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ #5 จำนวน 2×10^6 เซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงใน flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ฉายแสงยูวีบีตามความเข้มแสงที่กำหนด
2. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ทำการวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยวิธี BrdU assay ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่า BrdU จะเข้าไปจับกับ DNA ของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว จากนั้นจึงตรวจโดยการใส่ anti-BrdU antibody เข้าจับ แล้วสามารถวิเคราะห์ได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ปริมาณการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์จะแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (% cell proliferation) โดยปรับให้ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุม (control, เซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี) มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นค่าดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจึงแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้น

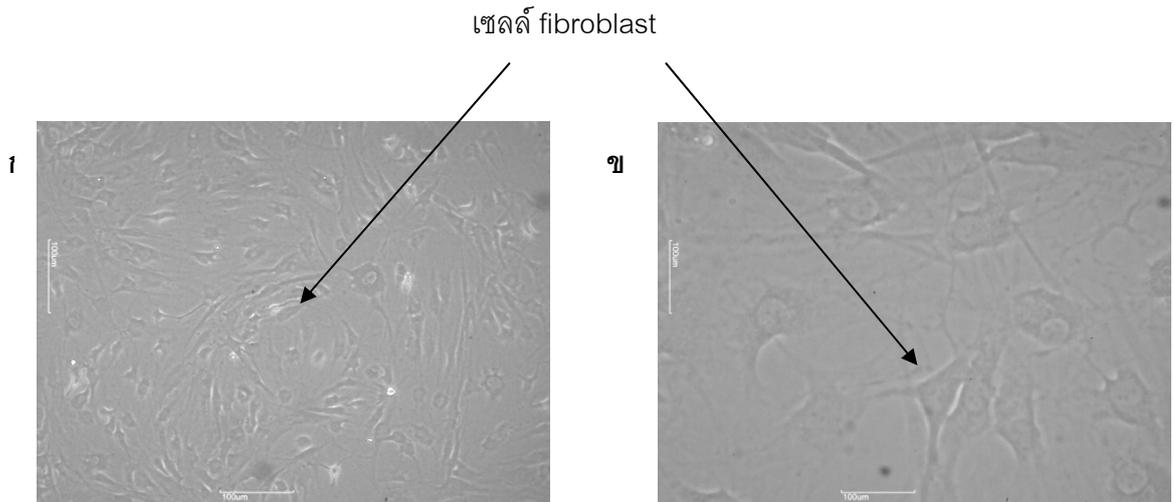
ผลของแสงยูวีบีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และลักษณะทางกายภาพของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากถูกบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในรูปภาพที่ 47-51 พบว่าจำนวนเซลล์ภายหลังที่ได้รับแสงยูวีบีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของเซลล์ พบว่าที่ความเข้มแสง 64 และ 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อพิจารณาที่ความเข้มแสง 192 จูลต่อตารางเซนติเมตร พบว่ารูปร่างของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจึงเลือกความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตรเป็นความเข้มแสงที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป



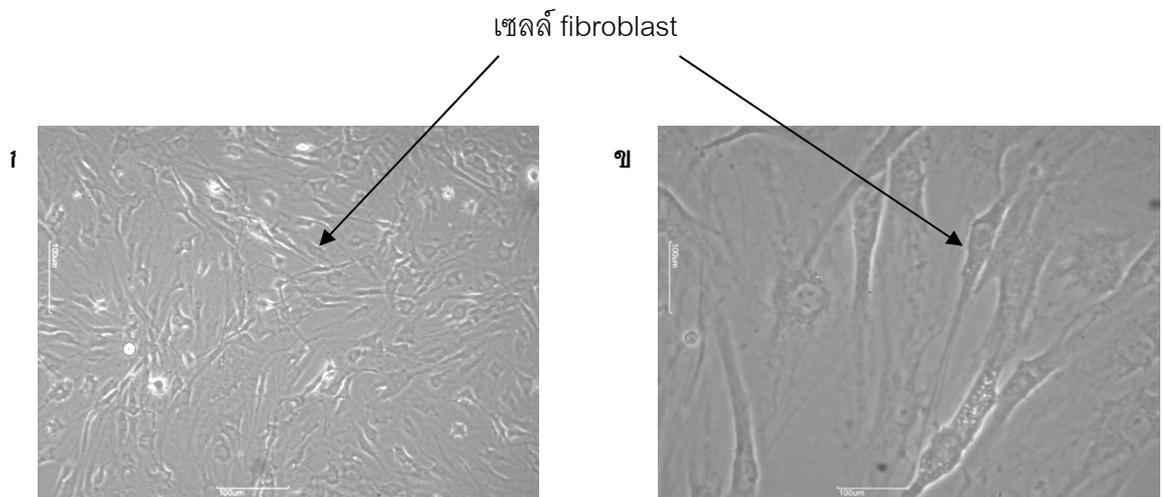
รูปที่ 47 ผลของความเข้มแสงยูวีบีที่ 64, 128 และ 192 จูลต่อตารางเซนติเมตรต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ กราฟแท่งแสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อได้รับแสงยูวีบีที่ความเข้มแสงต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่ถูกฉายแสงยูวีบี) โดยปรับให้ค่าจุดกลับแสงที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



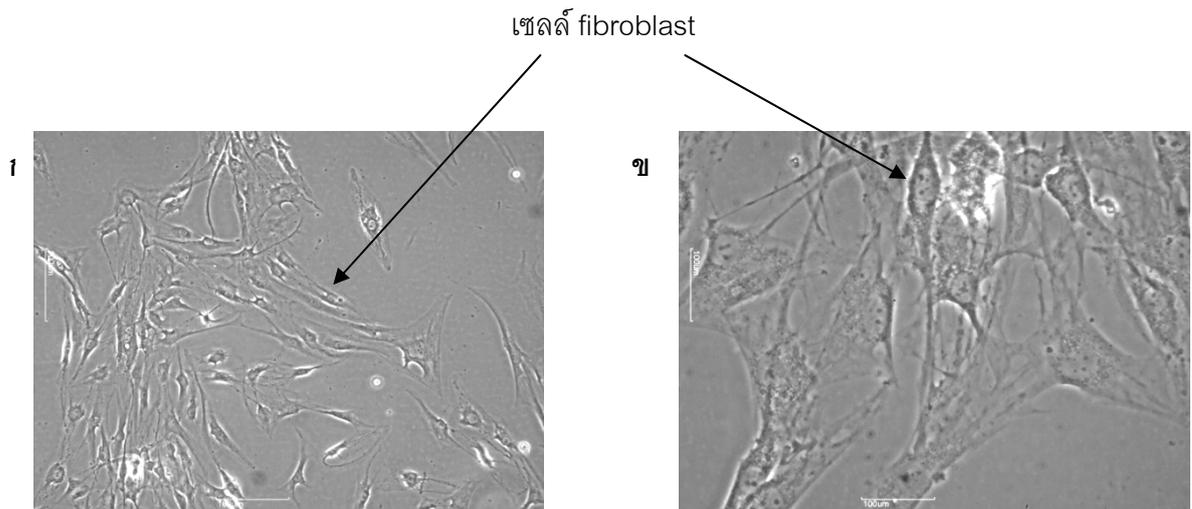
รูปที่ 48 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์กลุ่มควบคุมภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 49 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 64 จูลต่อตารางเซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 50 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 51 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสง 192 จุลต่อตารางเซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า

2.7.2 ผลของสารสกัดต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ผลิตโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี [28, 30, 33]

2.7.2.1 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารสกัดภายหลังจากรับแสงยูวีบี

ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ผลิตขึ้นในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหลังจากโดนแสงยูวีบีสามารถวัดในเชิงเปรียบเทียบได้โดยใช้เทคนิค Western blot ในการศึกษาครั้งนี้ความเข้มข้นของสารสกัด isolated artocarpin ที่ใช้คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายในปริมาณไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) เพื่อช่วยให้สารสกัดสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้เปรียบเทียบกับ control (กลุ่มควบคุม ไม่ได้รับรังสีแสงยูวีบี และเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์), negative control (ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว) และ positive control (ได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในการศึกษาครั้งนี้ แสงยูวีบีที่ใช้มีแหล่งกำเนิดจาก UVB chamber ที่ประกอบด้วยหลอด UVB Lamp (ชนิด 8วัตต์ ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 275-305 นาโนเมตร, Toshiba, Japan) ที่ความเข้มแสง 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร

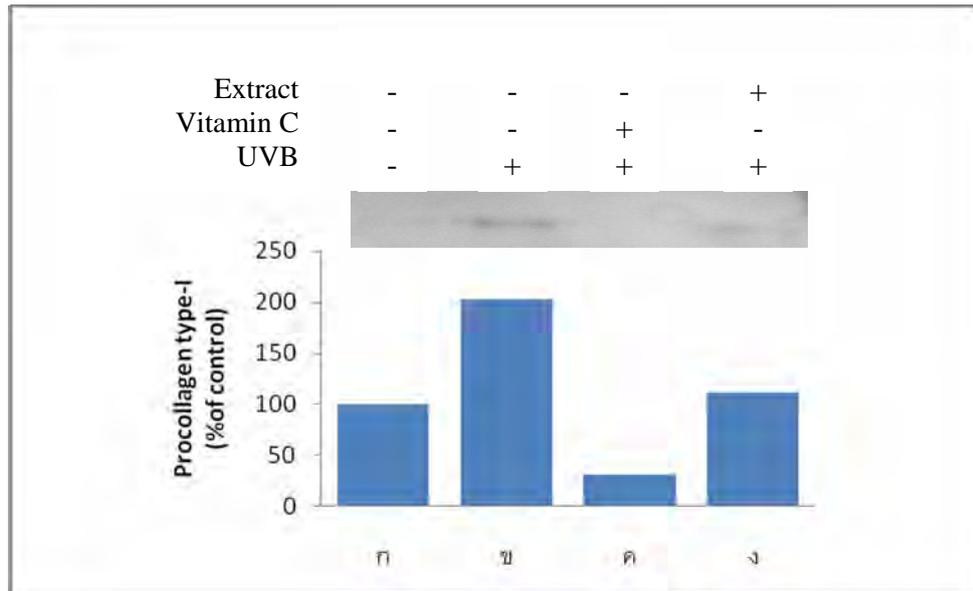
การหาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยใช้ Western blot มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ #5 จำนวน 2×10^6 เซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงใน flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วฉายแสงยูวีบีที่ความเข้มแสง 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 6 ชั่วโมง

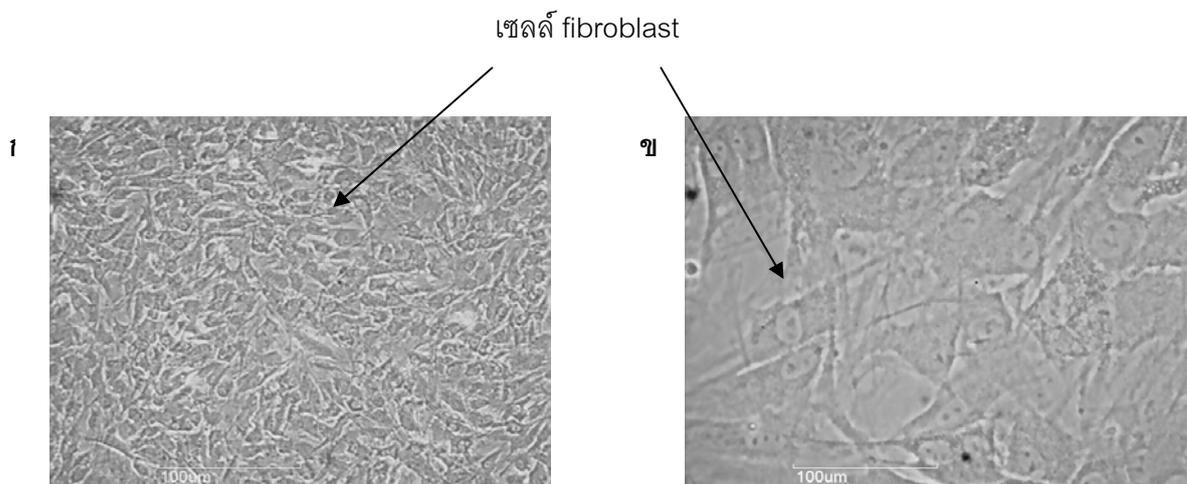
2. นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วบ่มกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบอีก 18 ชั่วโมง (รวมเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากได้รับแสงยูวีบีเท่ากับ 24 ชั่วโมง)

3. ทำการวัดปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยใช้เทคนิค Western blot โดยเริ่มจากการทำลายผนังเซลล์และแยกเก็บโปรตีนในเซลล์จากนั้นใช้หลักการของ gel electrophoresis ซึ่งใช้แยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยที่ทำการควบคุมปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ให้เท่ากันในแต่ละครั้งของการแยก (90 ไมโครกรัม) ต่อมาโปรตีนจะถูก transfer ไปยัง nitrocellulose membrane แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดย primary antibody ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 และใช้ secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ primary antibody เพื่อความจำเพาะและถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มของ band โปรตีนโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธี chemiluminescent detection

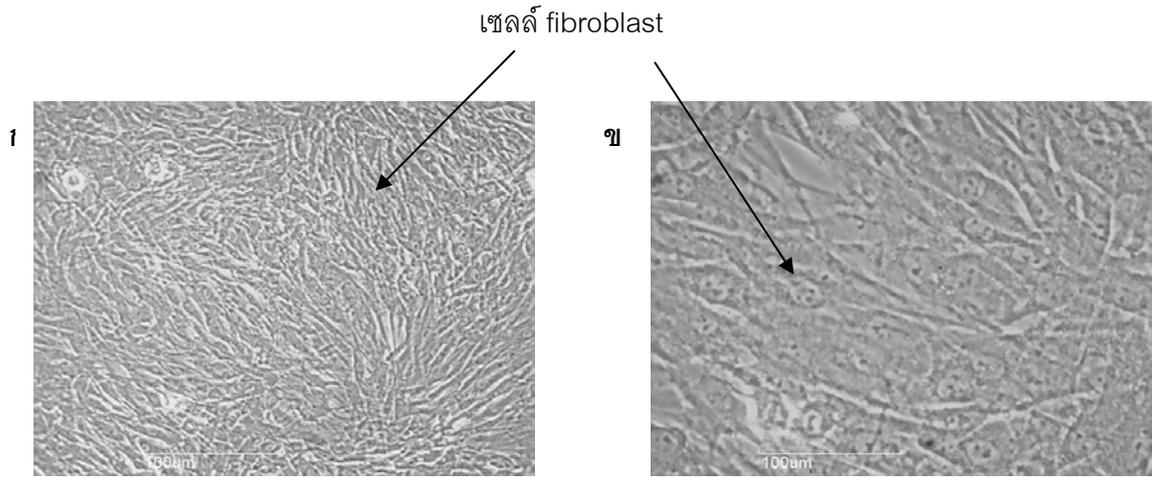
ผลของสารทดสอบต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 และลักษณะทางกายภาพของเซลล์หลังจากได้รับแสงยูวีบีแสดงดังรูปที่ 52-56 ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าแสงยูวีบีมีผลทำให้ปริมาณโปรคอลลาเจนที่คงอยู่ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการได้รับแสงยูวีบีแบบครั้งเดียว (acute dose) กระตุ้นให้เซลล์เกิดการผลิตและสะสมโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 มากขึ้นเพื่อทดแทนคอลลาเจนที่ถูกทำลายโดยแสงยูวีบี และเมื่อสังเกตดูปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดและวิตามินซีภายหลังที่ได้รับแสง พบว่าสารทั้งสองส่งผลให้เกิดการสะสมของปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสาเหตุอาจเป็นได้ว่าสารทั้งสองชนิดกระตุ้นให้โปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ถูกผลิตขึ้นมาเพิ่มขึ้นจากการได้รับแสงยูวีบีหลังออกนอกเซลล์ (extracellular procollagen) ซึ่งโปรคอลลาเจนที่อยู่นอกเซลล์นี้มีความสำคัญในแง่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นคอลลาเจนที่มีผลต่อโครงร่างและความยืดหยุ่นของผิวหนังชั้น dermis สมมติฐานนี้มาจากพื้นฐานที่ว่านอกจากวิตามินซีจะมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างโปรคอลลาเจนแล้ว ยังมีผลต่อ hydroxylation, glycosylation และ triple-helix formation ของโปรคอลลาเจนที่สร้างใหม่ภายในเซลล์ซึ่งขั้นตอนนี้มีผลทำให้โปรคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่พร้อมออกนอกเซลล์ นำไปสู่การตัดสายเปปไทด์การเกิดเป็นไฟบริลและครอสลิงค์ของคอลลาเจน (mature collagen) นอกเซลล์



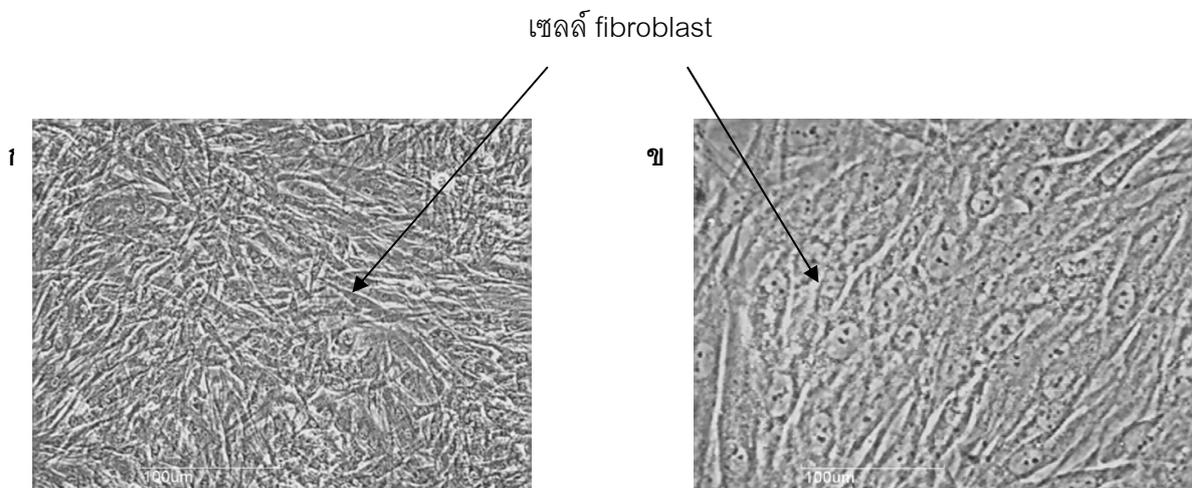
รูปที่ 52 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร) กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, ข) กลุ่ม negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, ค) กลุ่ม positive control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีและวิตามินซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ ง) คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบี และสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กราฟแสดงปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยปรับให้ค่าความเข้มของ band โปรตีนที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์



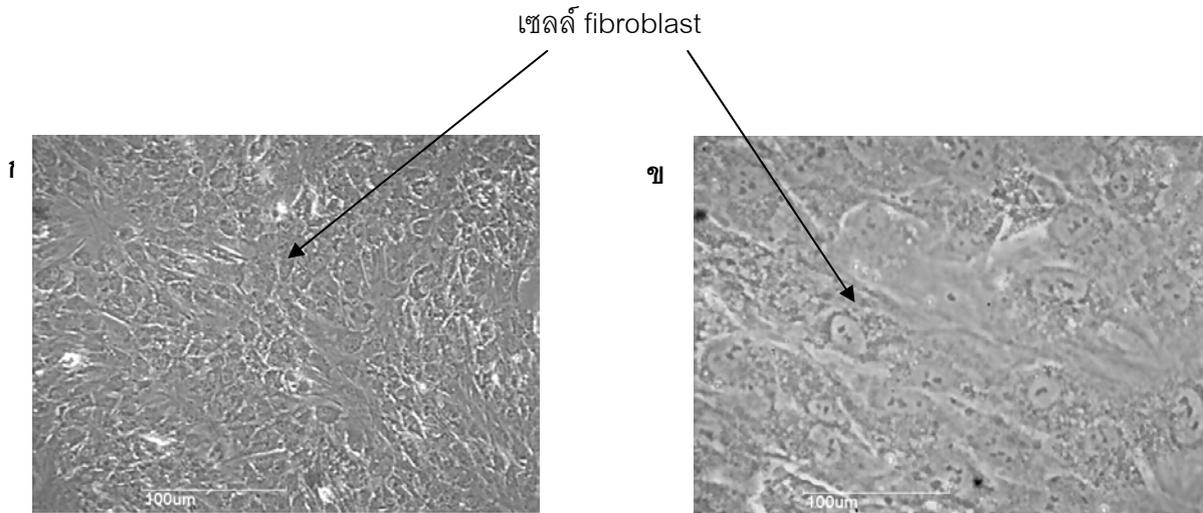
รูปที่ 53 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี (control, กลุ่มควบคุม) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 54 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร (กลุ่ม negative control) และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 55 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร และวิตามินซีเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่ม positive control) และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า



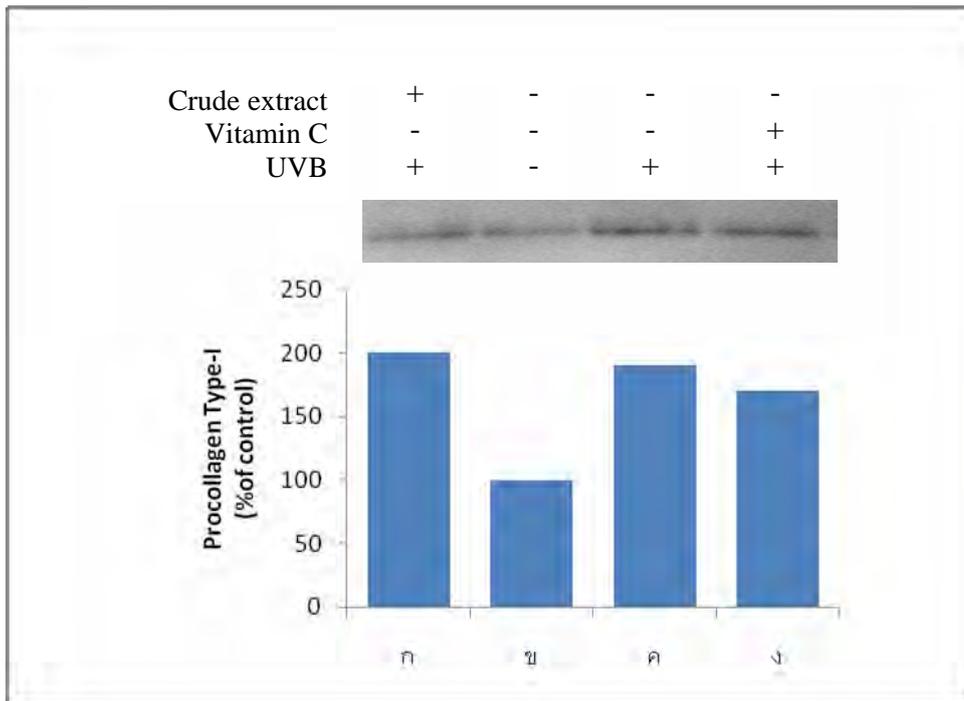
รูปที่ 56 ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีความเข้ม 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร และสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ก) กำลังขยาย 100 เท่า และ ข) กำลังขยาย 400 เท่า

2.7.2.2 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารสกัดก่อนได้รับแสงยูวีบี

ในการศึกษานี้ออกแบบขึ้นมาเพื่อทดสอบว่า ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกบ่มกับสารสกัดก่อนได้รับแสงยูวีบีจะแตกต่างกับผลที่จากการศึกษา 2.7.2.1 หรือไม่ โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ #5 จำนวน 2×10^6 เซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงใน flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มกับสารตัวอย่างทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ให้ความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตรแก่เซลล์แล้วเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง
3. ทำการวัดปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยใช้เทคนิค Western blot โดยวิธีการที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

ผลของสารทดสอบต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 แสดงดังรูปที่ 57 เซลล์เมื่อได้รับแสงยูวีบี (กลุ่ม negative control) จะมีการผลิตและสะสมคอลลาเจนภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 57 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร ก) กลุ่มของเซลล์ที่ป่มกับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี, ข) กลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, ค) กลุ่ม negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว และ ง) กลุ่ม positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแสดงปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยปรับให้ค่าความเข้มของ band โปรตีนที่วัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี)

ซึ่งผลที่ได้นี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาขั้นตอนก่อนหน้า (2.7.2.1) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณคอลลาเจนในเซลล์ซึ่งป่มกับสารสกัดและวิตามินซี พบว่าปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่พบมีค่าไม่แตกต่างกับกลุ่ม negative control คือผลผลิตและสะสมอยู่ในเซลล์มาก ซึ่งผลที่ได้นี้แตกต่างกับผลที่ได้จากการศึกษาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับวิตามินซีหรือสารสกัดภายหลังจากที่ได้รับแสงยูวีบี ผลการศึกษาที่ได้นี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจมากหากพบต่อไปว่าสารสกัดและวิตามินซีมีผลไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือมีผลต่อทั้งกระตุ้นการสร้างโปรคอลลาเจนภายในเซลล์และหลังโปรคอลลาเจนออกนอกเซลล์ นำไปสู่การเกิดเป็น mature collagen ใน extracellular matrix ด้วยเหตุนี้จึงทำการหาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ในการทดลองต่อไปโดยเน้นไปที่การศึกษาปริมาณโปร

คอลลาเจนชนิดที่ 1 นอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารสกัดภายหลังจากที่ได้รับแสงยูวีบีพร้อมทั้งศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายคอลลาเจน เช่น matrix metalloproteinases (MMPs) อีกด้วย

2.7.2.3 ผลของสารสกัดต่อปลดปล่อยสร้างโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี

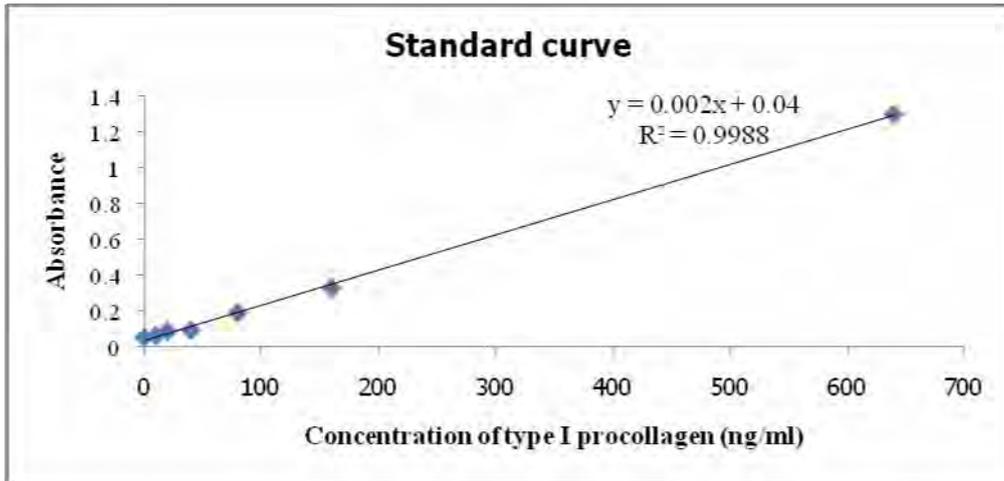
การทดลองนี้ใช้ ELISA kit ที่มีความไวในระดับพิโคกรัม ในการหาปริมาณโปรคอลลาเจนภายนอกเซลล์ที่ได้รับสารสกัดก่อนการได้รับแสงยูวีบีความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายในปริมาณไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) เพื่อช่วยให้สารสกัดสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี), negative control (คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว) และ positive control (คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซี 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี

การหาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยใช้ ELISA kit มีขั้นตอนดังนี้

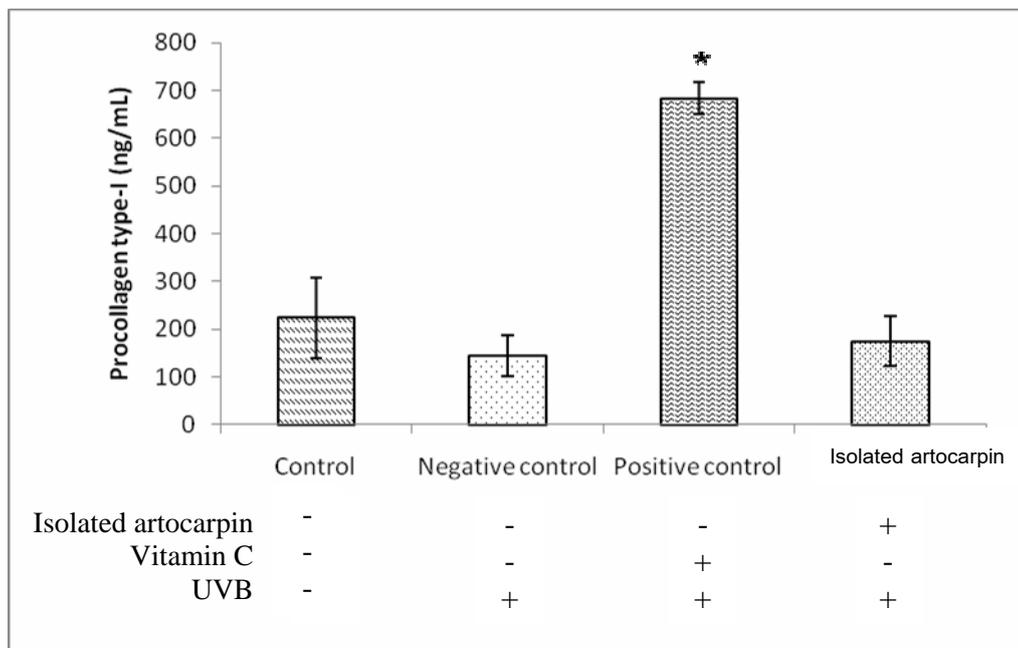
1. นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ #5 จำนวน 1×10^4 เซลล์ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน 96-well microplate มาบ่มกับสารตัวอย่างทดสอบ 24 ชั่วโมง
2. ให้ความเข้มข้นแสง 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร แก่เซลล์แล้วเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง
3. ทำการหาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยใช้ ELISA kit ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่า antigen ในสารตัวอย่างจะถูกตรวจวิเคราะห์โดยใช้ antibody ที่เชื่อมโยงกับ enzyme ซึ่งเมื่อเติม enzyme's substrate ลงไปจะสามารถวิเคราะห์ได้ที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 20, 40, 80, 160, 640 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง แสดงดังรูปที่ 58 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในสารตัวอย่างทดสอบแสดงดังรูปที่ 59

เป็นที่น่าสนใจที่พบว่า การได้รับแสงยูวีบีในความเข้มข้นที่ใช้ มีผลต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่อยู่ในเซลล์และนอกเซลล์แตกต่างกัน กล่าวคือในการศึกษาข้างต้นพบว่าโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สะสมอยู่ในเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีมีมากกว่ากลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี) อย่างชัดเจนขณะที่ในการศึกษานี้พบว่าปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่อยู่นอกเซลล์ของกลุ่มควบคุม (223.45 ± 84.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (145.15 ± 42.71 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว) แต่เมื่อเซลล์ถูกบ่มกับวิตามินซีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะได้รับแสงยูวีบี นอกจากวิตามินซีจะช่วยเพิ่มการสร้างและสะสมโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์แล้วยังส่งผลให้เซลล์ปลดปล่อยโปรตีนชนิดนี้ออกมานอกเซลล์ด้วย (683.30 ± 32.95 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อพิจารณาผลของสารสกัด ถึงแม้ว่าสารสกัดจะส่งผลให้เกิดการผลิตและสะสมโปรคอลลาเจนภายในเซลล์เช่นเดียวกับวิตามินซีแต่โปรคอลลาเจนที่ผลิตขึ้นถูกปลดปล่อยออกมาน้อย



รูปที่ 58 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 59 ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกลุ่มควบคุม(control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแท่งแสดงปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

กว่า (173.2 ± 174.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดไม่มีผลในการกระตุ้นการปลดปล่อยโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณ mature collagen ที่อยู่ภายนอกเซลล์ที่ทำหน้าที่พยุงโครงร่างและให้ความยืดหยุ่นแก่ผิวหนังชั้น dermis ด้วยเหตุนี้จึงได้ออกแบบการศึกษาเพิ่มเติมโดยศึกษาผลของสารสกัดต่อการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายคอลลาเจนที่อยู่ภายนอกเซลล์ (matrix metalloproteinases, MMPs) ได้แก่ MMP-1 และ 13 เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้จะมีผลต่อการคงอยู่ของ mature collagen ในผิวหนังชั้น dermis

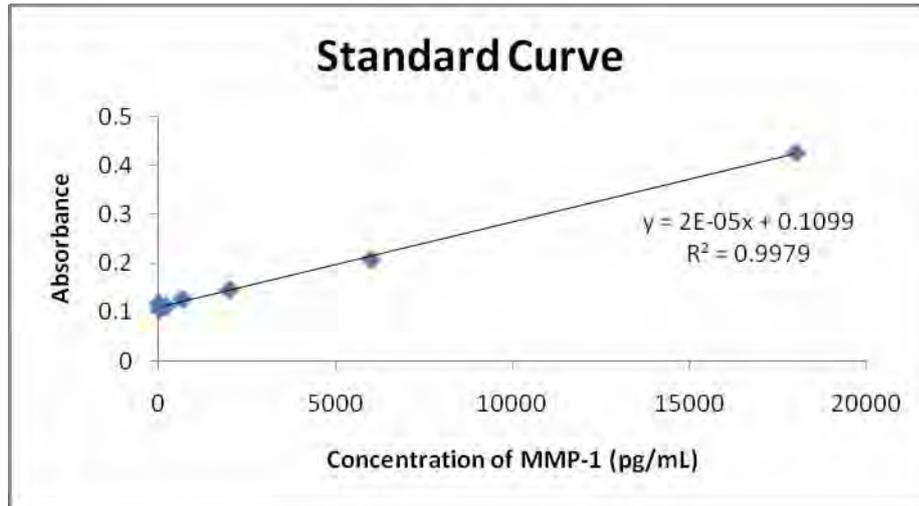
2.7.3 ผลของสารสกัดต่อการหลั่ง MMP-1 และ 13 ที่ผลิตโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี

การทดลองนี้ใช้ ELISA kit ในการหาปริมาณ MMP-1 และ 13 ที่หลั่งโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารก่อนการได้รับแสงยูวีบีความเข้มข้นของ isolated artocarpin ที่ใช้คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายในปริมาณไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) เพื่อช่วยให้สารสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี), negative control (ได้รับแสงยูวีบี) และ positive control (ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี

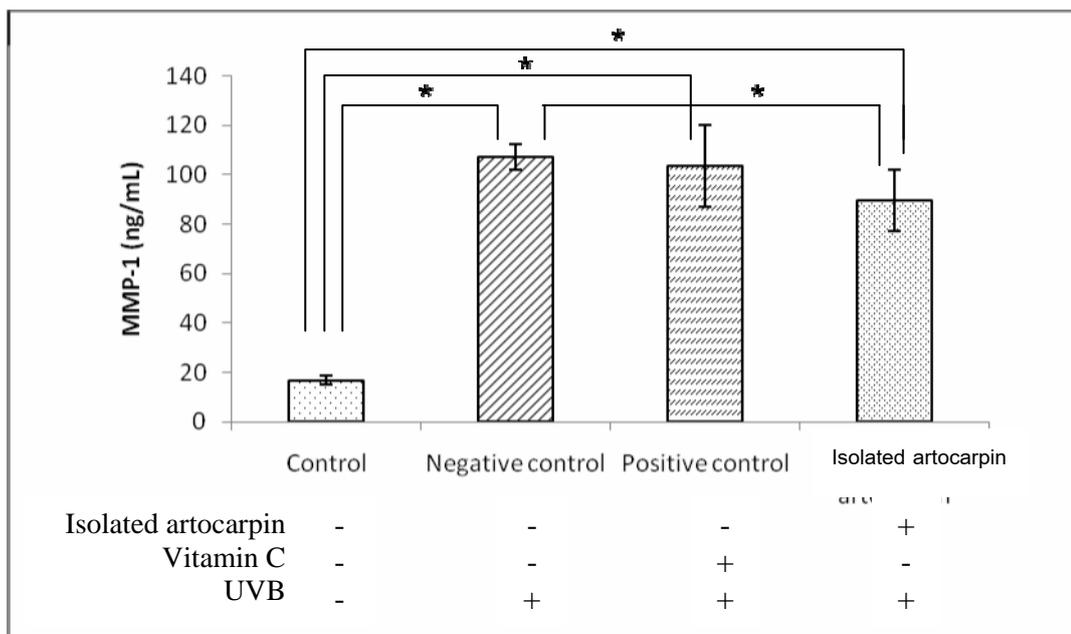
การหาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยใช้ ELISA kit มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ #6 จำนวน 1×10^4 เซลล์ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน 96-well microplate มาบ่มกับสารตัวอย่างทดสอบ 24 ชั่วโมง
2. ให้ความเข้มแสง 128 จุลต่อตารางเซนติเมตร แก่เซลล์แล้วเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง
3. ทำการหาปริมาณ MMP-1, 13 โดยใช้ ELISA kit ซึ่งอาศัยหลักการ sandwich enzyme immunoassay technique ที่ว่า antigen ในสารตัวอย่างจะเข้าจับกับ antibody ที่มีความจำเพาะเคลือบอยู่ที่ microplate ซึ่ง antibody นี้จะมี enzyme ซึ่งเมื่อเติม enzyme's substrate ลงไปจะสามารถวิเคราะห์ได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง

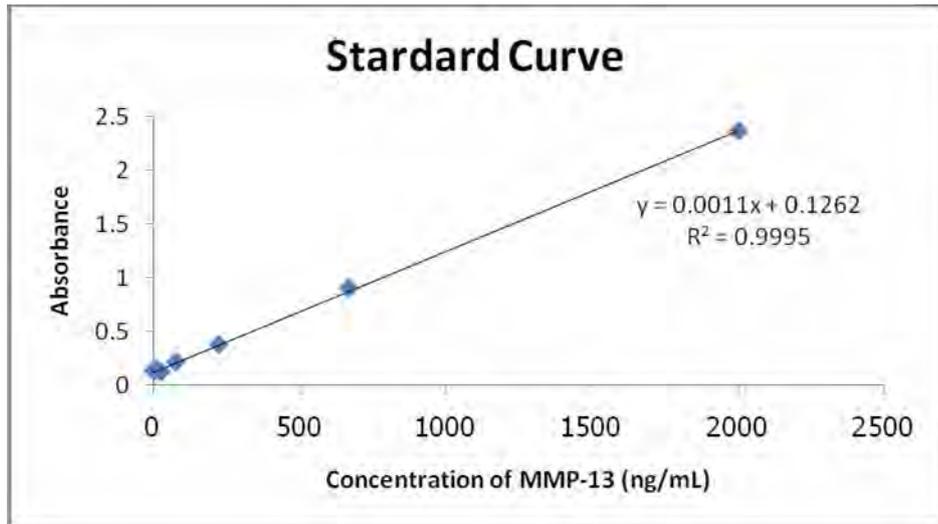
กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 20, 40, 80, 160, 640 พิกโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-13 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 20, 40, 80, 160, 640 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง รวมทั้งปริมาณ MMP-1 และ MMP-13 ที่หลั่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบีแสดงดังรูปที่ 60-63 ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า แสงยูวีบีมีผลเพิ่มการหลั่ง MMP-1 อย่างมีนัยสำคัญ (16.82 ± 1.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุม และ 107.22 ± 5.16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว,



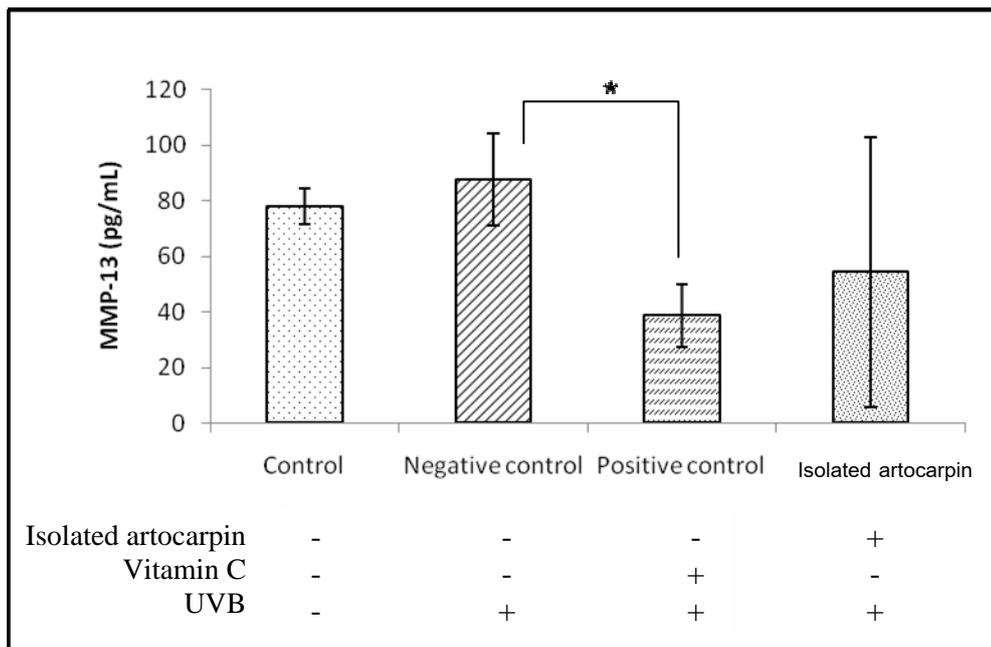
รูปที่ 60 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 61 ปริมาณการหลั่ง MMP-1 ที่หลั่งโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแท่งแสดงปริมาณ MMP-1 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test)



รูปที่ 62 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-13 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 63 ปริมาณการหลั่ง MMP-13 ที่หลั่งโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, positive control คือเซลล์ที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแท่งแสดงปริมาณ MMP-13 ภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test)

negative control) และเป็นที่น่าสนใจที่พบว่า isolated artocarpin สามารถลดการหลั่งของ MMP-1 (89.62 ± 12.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จากเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบี ในขณะที่วิตามินซีไม่มีผลในการลดการหลั่ง MMP-1 (103.39 ± 16.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

ในกรณีของ MMP-13 พบว่าปริมาณเอนไซม์ชนิดนี้ที่หลั่งภายนอกเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นในเซลล์กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว (negative control, 87.70 ± 16.69 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (78 ± 6.36 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การที่เซลล์ได้รับวิตามินซีก่อนที่จะได้รับแสงยูวีบี มีผลทำให้ปริมาณ MMP-13 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (38.65 ± 11.24 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว ซึ่งการลดลงของ MMP-13 พบในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ isolated artocarpin เช่นกัน (54.40 ± 48.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่การลดลงนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาร่วมกันทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า สารสกัดมีประสิทธิภาพในเชิงยับยั้งการทำลายคอลลาเจนมากกว่าการกระตุ้นหรือฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนดังสมมติฐานที่ตั้งไว้ในตอนแรก ซึ่งจะเห็นได้จากการที่สารสกัดมีฤทธิ์ในการป้องกันการปลดปล่อย MMP-1 ร่วมกับมีแนวโน้มในการลดการปลดปล่อย MMP-13 ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง MMP-1 มีฤทธิ์โดยตรงในการทำลาย mature collagen ด้วยเหตุนี้แผนการศึกษาจึงเบนเข็มไปในทางทิศทางที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและปลดปล่อย MMPs เช่น ศึกษาผลของสารสกัดต่อการหลั่งสารสื่ออักเสบ ได้แก่ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6) เนื่องจากสารสื่ออักเสบทั้ง 2 ชนิด มีความสัมพันธ์กับ MMPs ในแง่กระตุ้นการสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน

2.7.4 ผลของสารสกัดต่อการปลดปล่อย tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6) โดยเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบี

การทดลองนี้จะใช้ ELISA kit ในการหาปริมาณการ TNF- α และ IL-6 ที่ถูกปลดปล่อยออกนอกโดยเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับสารทดลองก่อนการได้รับแสงยูวีบี ความเข้มข้นของ isolated artocarpin ที่ใช้คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายในปริมาณไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ณ ความเข้มข้นสุดท้าย) เพื่อช่วยให้สารสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control คือเซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี), negative control (ได้รับแสงยูวีบี) นอกจากนี้ยังทดลองทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวโดยใช้สารสกัดหยาบด้วย (crude extract)

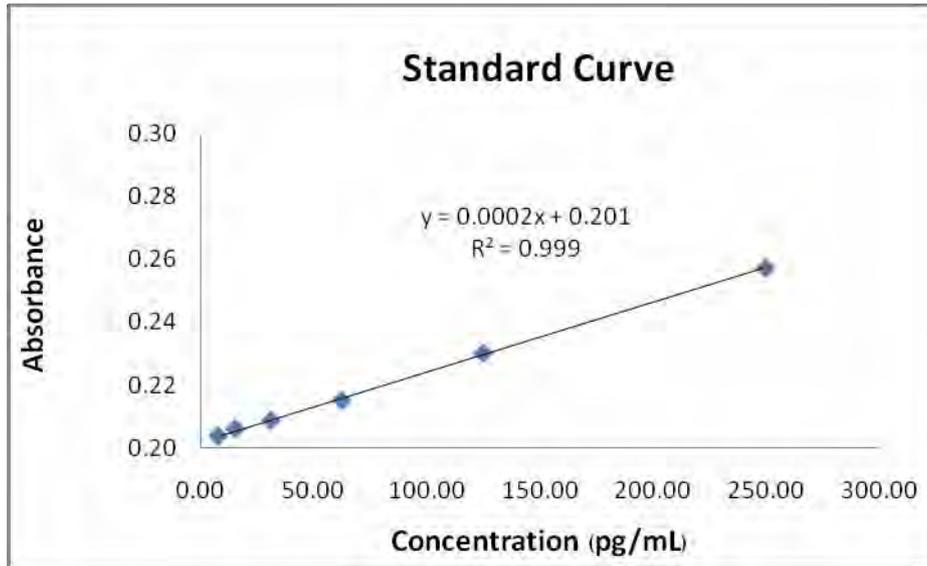
การหาปริมาณ TNF- α และ IL-6 โดยใช้ ELISA kit มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์เคราติโนไซต์ #2 จำนวน 5×10^6 เซลล์ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน 6-well microplate มาบ่มกับสารตัวอย่างทดสอบ 24 ชั่วโมง

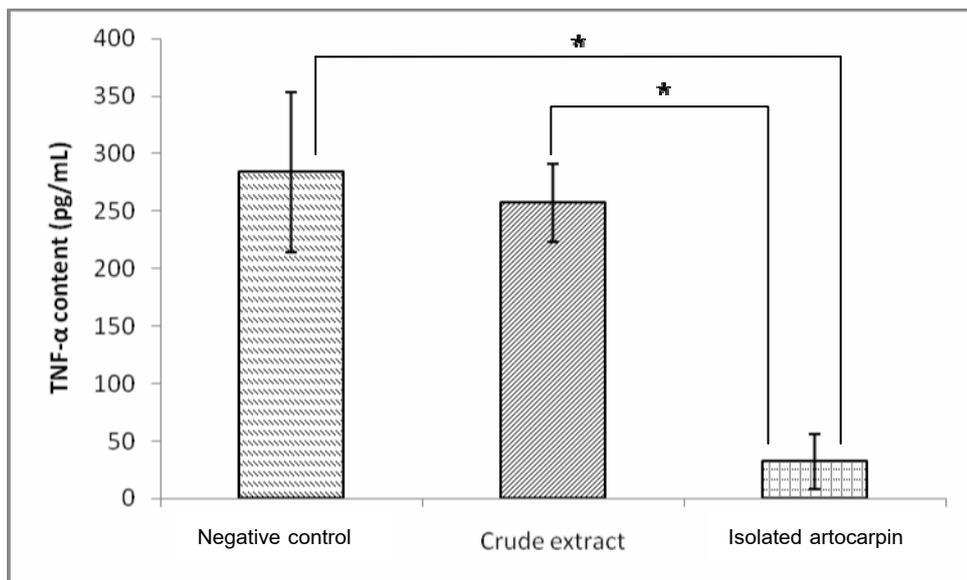
2. ให้ความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร แก่เซลล์แล้วเพาะเลี้ยงต่ออีก 4 ชั่วโมง

3. ทำการหาปริมาณ TNF- α และ IL-6 โดยใช้ ELISA kit ซึ่งอาศัยหลักการ sandwich enzyme immunoassay technique ที่ว่า antigen ในสารตัวอย่างจะเข้าจับกับ antibody ที่มีความจำเพาะเคลือบอยู่ที่ microplate ซึ่ง antibody นี้จะมี enzyme ซึ่งเมื่อเติม enzyme's substrate ลงไปจะสามารถวิเคราะห์ได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง

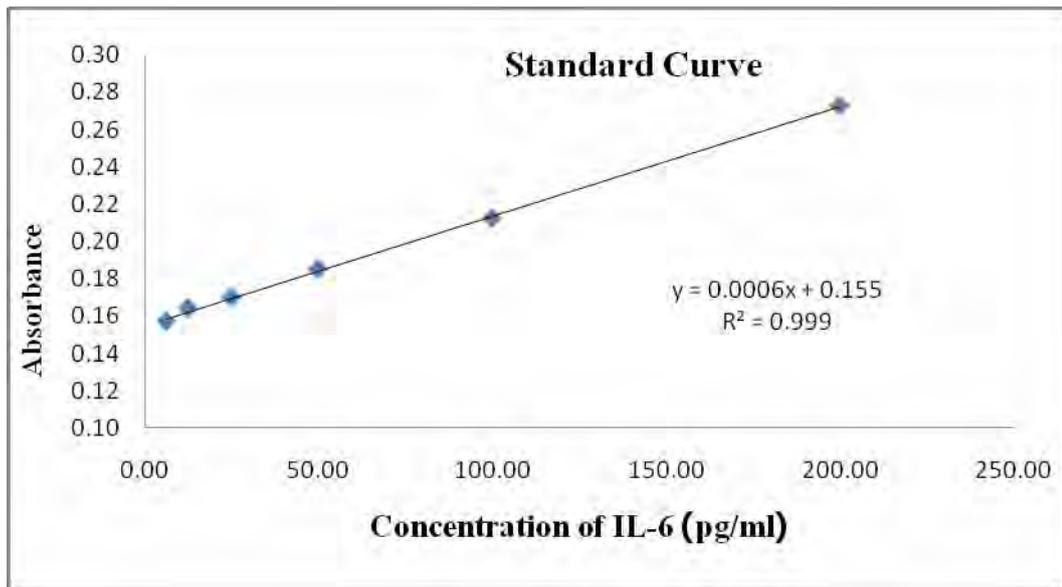
กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TNF- α ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 20, 40, 80, 160, 640 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง IL-6 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 20, 40, 80, 160, 640 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง รวมทั้งปริมาณ TNF- α และ IL-6 ที่หลังจากเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบีแสดงดังรูปที่ 64 - 67 การศึกษาที่ได้พบว่าที่สภาวะปกติเซลล์มีการหลั่งสารสื่ออักเสบที่น้อยมากจนไม่สามารถวัดค่าได้ ในขณะที่แสงยูวีบีมีผลต่อการเพิ่มปริมาณการหลั่ง TNF- α (283.83 ± 70.06 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IL-6 (141.67 ± 20.28 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเซลล์เคราติโนไซต์เมื่อเซลล์ได้รับ isolated artocarpin พบว่าเซลล์มีการหลั่งสารสื่ออักเสบน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (23.17 ± 23.30 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ TNF- α และ 88.33 ± 17.56 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ IL-6) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียว เป็นที่น่าสนใจที่พบว่าสารสกัดหยาบไม่สามารถยับยั้งการปลดปล่อยสารสื่ออักเสบทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ (257.17 ± 34.03 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ TNF- α และ 136.11 ± 17.67 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ IL-6) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าฤทธิ์ในการต้านการปลดปล่อยสารสื่ออักเสบนั้นน่าจะมีผลมาจากปริมาณสาร artocarpin ซึ่งเป็นสารหลักที่พบใน isolated artocarpin



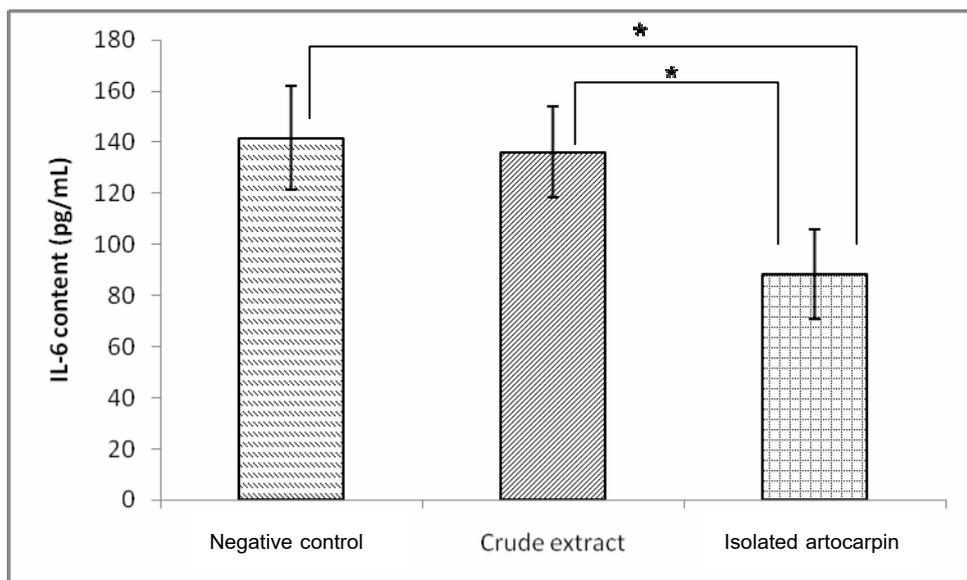
รูปที่ 64 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TNF- α ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 65 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการหลั่ง TNF- α โดยเซลล์เคราตินไนไซต์เมื่อ negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, crude extract คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบ (มีปริมาณ artocarpin 43.85 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin (มีปริมาณ artocarpin 88.18 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแท่งแสดงปริมาณ TNF- α ที่หลั่งโดยเซลล์เคราตินไนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบี (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test)



รูปที่ 66 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TNF- α ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 67 ผลของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ต่อการหลั่ง IL-6 โดยเซลล์โคราติโนไซต์เมื่อ negative control คือเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, crude extract คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบ (มีปริมาณ artocarpin 43.85 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบีและ isolated artocarpin (มีปริมาณ artocarpin 88.18 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) คือเซลล์ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับแสงยูวีบี กราฟแห่งนี้แสดงปริมาณ IL-6 ที่หลั่งโดยเซลล์โคราติโนไซต์ที่ได้รับแสงยูวีบี (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test)

2.7.5 ผลของสารสกัดต่อการหลั่ง SMAD2, 3, 7 และ ระดับ TGF- β receptor ในเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี

ถึงแม้จากการศึกษาพบว่าสารสกัด isolated artocarpin ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการปลดปล่อยโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ออกจากเซลล์ไฟโบร بلاสต์ แต่ก็พบว่าเมื่อมีการผลิตและสะสมโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายในเซลล์ ด้วยเหตุนี้จึงได้ทดลองหาปริมาณ SMAD2, 3, 7 และ TGF- β receptor ในเซลล์หลังจากโดนแสงยูวีบี ซึ่งโปรตีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โดยใช้เทคนิค Western blot ในการวัดปริมาณโปรตีนดังกล่าวว่าความเข้มข้นของ isolated artocarpin ที่ใช้คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การหาปริมาณ SMAD2, 3, 7 และ TGF- β receptor โดยใช้ Western blot มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเซลล์ไฟโบร بلاสต์ #5 จำนวน 2×10^6 เซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงใน flask 25 ตารางเซนติเมตรบ่มกับสารตัวอย่างทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. ให้ความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร แก่เซลล์แล้วเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง
3. ทำการวัดปริมาณ SMAD2, 3, 7 และ TGF- β receptor โดยใช้เทคนิค Western blot โดยเริ่มจากการทำลายผนังเซลล์และแยกเก็บโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นใช้หลักการของ gel electrophoresis ซึ่งใช้แยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลต่อมาโปรตีนจะถูก transfer ไปยัง nitrocellulose membrane แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดย primary antibody ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนแต่ละชนิด และใช้ secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ primary antibody เพื่อความจำเพาะและถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี chemiluminescent detection

ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้มีปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้โดย chemiluminescent detection ได้ อย่างไรก็ตามทางผู้ดำเนินการวิจัยคาดหวังว่าการศึกษาปริมาณ TGF- β receptor และ SMAD2, 3 และ 7 จะสามารถวิเคราะห์ได้จากวิธี immunofluorescence ต่อไป

จากข้างต้นที่กล่าวว่า สารสกัด isolated artocarpin มีประสิทธิภาพในเชิงยับยั้งการทำลายคอลลาเจนมากกว่าการกระตุ้นหรือฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนดังสมมติฐานที่ตั้งไว้ในตอนแรก ซึ่งจะเห็นได้จากการที่สารสกัดมีฤทธิ์ในการป้องกันการปลดปล่อย MMP-1 ร่วมกับมีแนวโน้มในการลดการปลดปล่อย MMP-13 ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง MMP-1 มีฤทธิ์โดยตรงในการทำลาย mature collagen ด้วย ผลที่ได้ชี้ให้เห็นประโยชน์ของการนำสารสกัดไปใช้ในการป้องกันการทำลายคอลลาเจนเนื่องจากแสงยูวีบี อย่างไรก็ตามการนำไปใช้จะเป็นไปได้มากขึ้นหากสามารถพิสูจน์ประสิทธิภาพใน *in vivo* ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจะยืนยันผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยมีสมมติฐานที่ว่า การได้รับสารสกัดโดยการทาที่ผิวหนังอาจส่งผลป้องกันการทำลายคอลลาเจนเนื่องมาจากแสงยูวีบี เนื่องจากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน

2.8 การทดสอบ *In vivo* วัดความหนาและปริมาณคอลลาเจนในหนังหนูที่โดนแสงยูวีบี

2.8.1 สัตว์ทดลองที่ใช้

หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ ซึ่งถูกเลี้ยงในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 55 ± 5 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และหนูต้องได้รับอาหารพื้นฐานที่ใช้ในห้องทดลอง รวมถึงได้รับน้ำอย่างพอเพียงก่อนนำมาทดลอง โครงร่างการศึกษาที่ใช้ในโครงการครั้งนี้ ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ตามเลขที่โครงการ NU-AE550202

โดยสัตว์ทดลองจะแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว

- กลุ่มปกติ (normal group) คือ กลุ่มที่ไม่ฉายยูวีบี
- กลุ่มควบคุม (control group) คือ กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีและได้รับน้ำเปล่า
- กลุ่มเปรียบเทียบ (positive group) คือ กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีและได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ [43]
- กลุ่มทดลอง (test group) คือ กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีและได้รับสารสกัด isolated artocarpin เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (ความเข้มข้นเป็น 4 เท่า ของความเข้มข้นที่ใช้ศึกษา *in vitro*) ซึ่งมี DMSO เป็นตัวทำละลายอยู่น้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อความหนาของผิวหนังและปริมาณคอลลาเจนในหนูเมาส์ที่ได้รับแสงยูวีบี บริเวณส่วนหลังของหนูทดลอง (ตั้งแต่บริเวณขาหน้าถึงขาหลัง) จะถูกถอนออกโดยใช้ sodium sulphide ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ทำไว้เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วใช้สำลีเปียกเช็ดออก 2 รอบ จากนั้นแต่ละกลุ่มจะทาสารตามกำหนดที่บริเวณส่วนหลังของหนูทุกวัน แล้วทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงก่อนรับแสงยูวีบี แสงยูวีบีที่ใช้มีแหล่งกำเนิดจาก UVB chamber ที่ประกอบด้วยหลอด UVB Lamp (ชนิด 8 วัตต์ ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 275-305 นาโนเมตร, Toshiba, Japan)

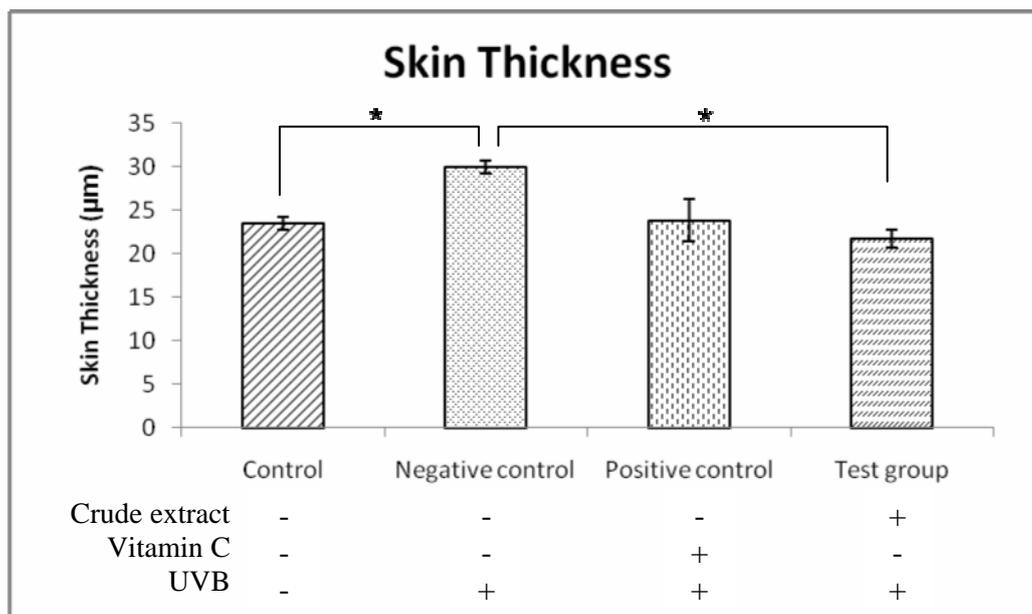
หนูจะได้รับแสงยูวีบีสัปดาห์ละ 3 ครั้ง (จันทร์ พุธ และศุกร์) ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นช่วงดังนี้

- ช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 18 จูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 4-7 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 36 จูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 7-10 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 54 จูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 10-12 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 72 จูลต่อตารางเซนติเมตร [43]

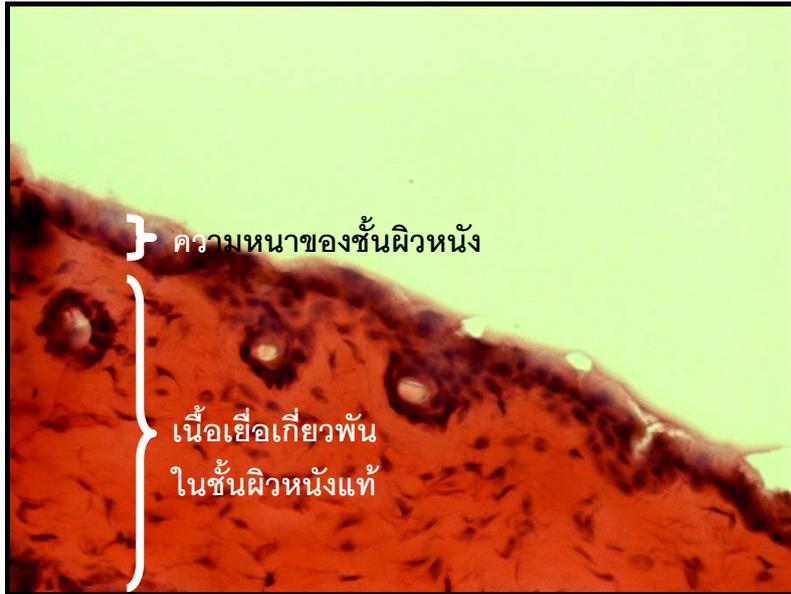
2.8.2 การวัดความหนาของ epidermis โดยตรวจสอบจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological examination) ของผิวหนังหนู

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำการตัดผิวหนังบริเวณส่วนหลัง พื้นที่ประมาณ 3 ตารางเซนติเมตร มาเพื่อทำการ fix ใน pre-labeled base molds โดยใช้ Tissue-Textmatrix และใช้ microtome ตัดให้มีความหนา 8 ไมโครเมตร วางลงบนสไลด์แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin (H&E) เพื่อดูลักษณะโครงสร้างและความหนาของ epidermis เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

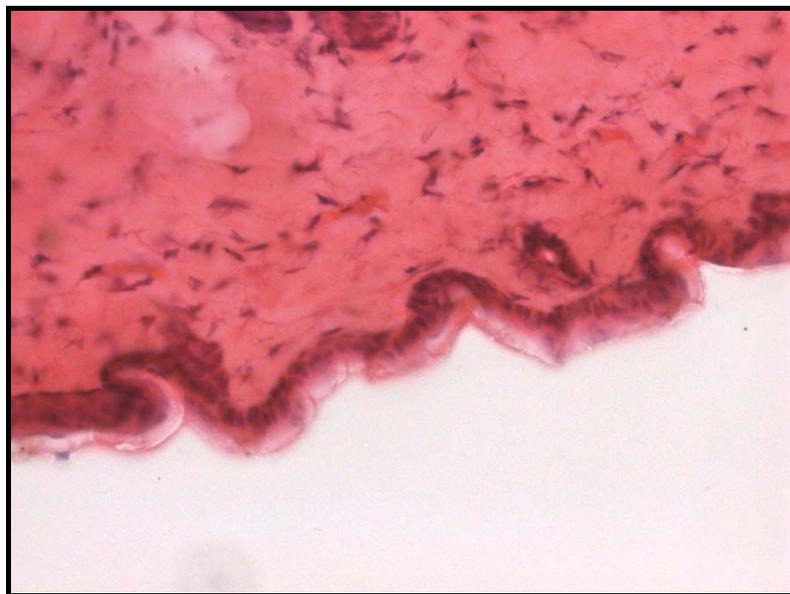
ความหนา epidermis ของผิวหนังหนู และจุลกายวิภาคศาสตร์แสดงดังรูปที่ 68-72 จากกราฟที่ได้ บ่งบอกว่ายูวีบีมีผลทำให้ผิวหนังของหนูหนาขึ้นเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ไม่รับแสงยูวีบี (control, 23.49 ± 0.69 ไมโครเมตร) และกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว (negative control, 29.92 ± 0.74 ไมโครเมตร) อย่างมีนัยสำคัญ และการได้รับสารสกัด (21.74 ± 1.02 ไมโครเมตร) มีผลในการลดความหนาของผิวหนังหนูที่ดีกว่าวิตามินซี (23.83 ± 2.48 ไมโครเมตร) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว



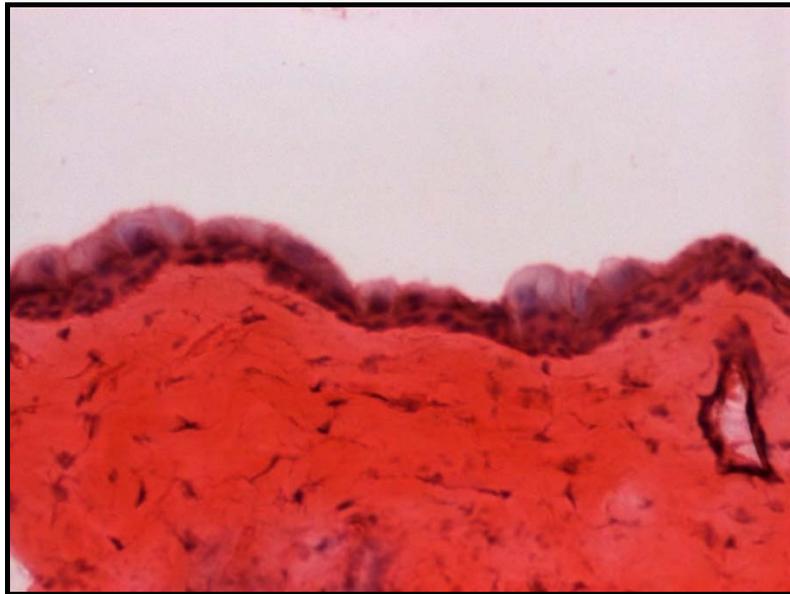
รูปที่ 68 ผลของสารสกัดต่อความหนาของผิวหนังหนู เมื่อ control group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์, test group คือได้รับแสงยูวีบี และสารสกัด isolated artocarpin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ กราฟแท่งแสดงความหนาของผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี (N=4) (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test)



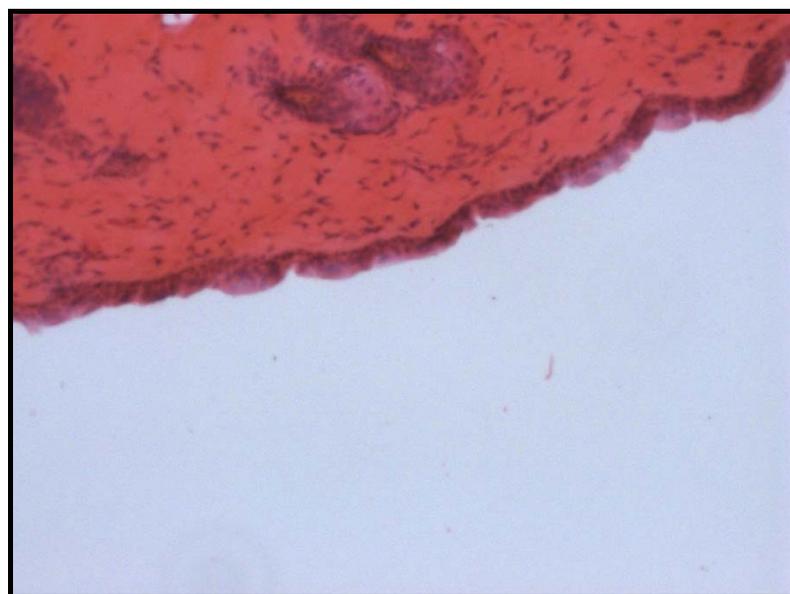
รูปที่ 69 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังหนูที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี (control group) ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 70 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาน้ำเปล่า (negative control) ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 71 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาวิตามินซี 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



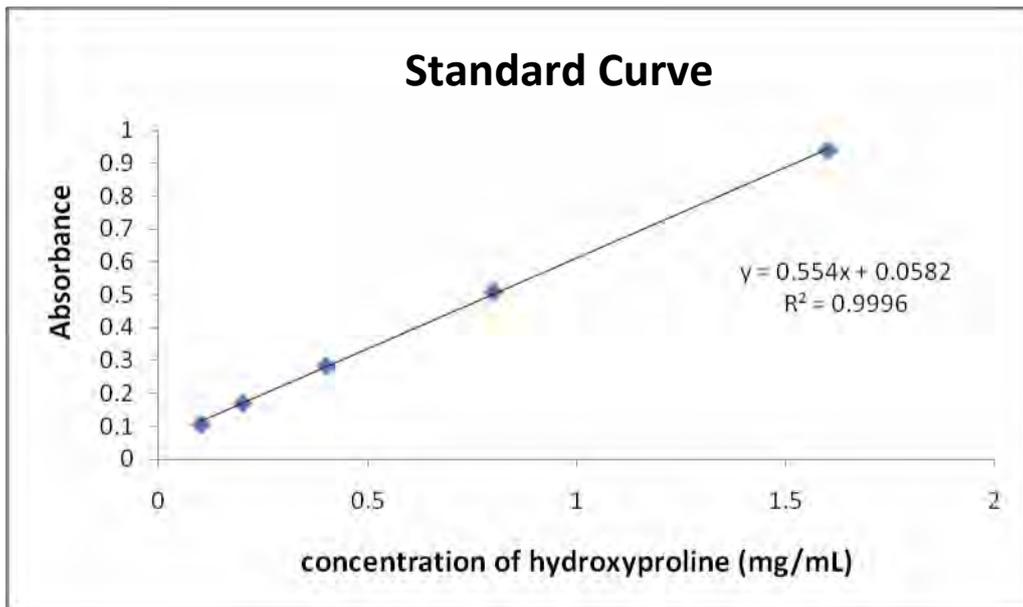
รูปที่ 72 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาสารสกัดisolated artocarpin 0.02 เปอร์เซ็นต์ (test group) ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ และการคำนวณปริมาณคอลลาเจน

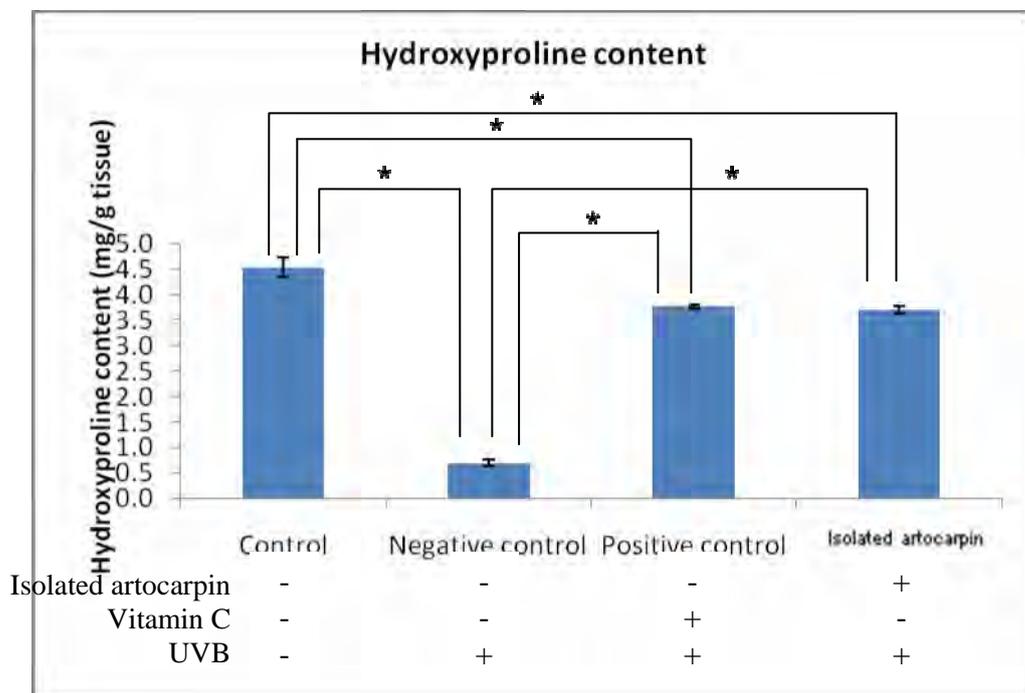
ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนหลักของคอลลาเจนจะถูกวัด โดยแช่ชิ้นเนื้อตัวอย่าง ปริมาณ 25 มิลลิกรัมในคลอโรฟอร์มและเมทานอลเป็นเวลา 60 นาทีเพื่อกำจัดไขมันออก จากนั้นนำชิ้นเนื้อ มาแช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น นอร์มอลที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อ ชิ้นเนื้อตัวอย่างแห้งแล้วจึงเติม PBS (pH 7.4) แล้วจึงนำสารละลายไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ทำการเจือจางสารละลายด้วย PBS ในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 202 นาโนเมตร ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนคำนวณได้จากสมการ standard curve ของไฮดรอกซี โพรลีนและค่าการดูดกลืนแสงและวิธีการคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างเนื้อเยื่อ หาได้จาก สมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณคอลลาเจน} = \frac{\text{ปริมาณ hydroxyproline (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{Conversion factor (7.46)}}{\text{ปริมาณของเนื้อเยื่อใน 1 มิลลิลิตร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

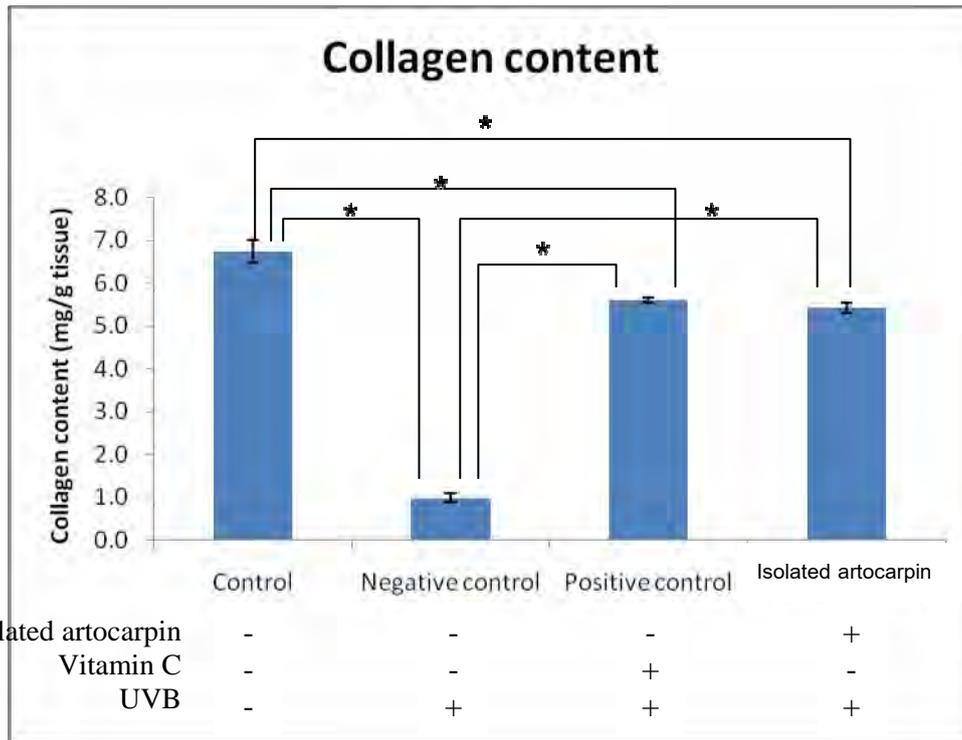
กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ไฮดรอกซีโพรลีนที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสงปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน และปริมาณคอลลา เจนแสดงดังรูปที่ 73-75 ผลที่ได้พบว่า แสงยูวีบีมีผลในการลดปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโน หลักในคอลลาเจนลงเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มควบคุม (control, 4.53 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัมของ เนื้อเยื่อ)และกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียว (negative control, 0.70 ± 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัมของ เนื้อเยื่อ)อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่ามีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนใกล้เคียงกับ กลุ่มที่ได้รับวิตามินซี (3.69 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อสำหรับสารสกัด และ 3.76 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อสำหรับวิตามินซี) โดยทั้งสองกลุ่มมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนมากกว่ากลุ่มที่ ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ จากที่กล่าวข้างต้นว่าไฮดรอกซีโพรลีนเป็นกรดอะมิโนหลัก ในคอลลาเจน ดังนั้นปริมาณคอลลาเจนจึงมีทิศทางไปในทางเดียวกับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน โดยแสงยูวี บีมีผลในการลดปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างชิ้นเนื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่ม ควบคุม (6.74 ± 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) และกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียว (0.99 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) เมื่อพิจารณาปริมาณคอลลาเจนจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัด(5.42 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) พบว่ามีปริมาณคอลลาเจนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี (5.60 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) โดยทั้งสองกลุ่มมีปริมาณคอลลาเจนที่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบี เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 73 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างไฮดรอกซีโปรลีนที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 74 กราฟแท่งแสดงปริมาณของไฮดรอกซีโปรลีนในเนื้อเยื่อตัวอย่าง เมื่อ control group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, positive control คือได้รับแสงยูวีบีและวิตามินซีเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ isolated artocarpin คือได้รับแสงยูวีบี และสารสกัดเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (N=4) (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test)

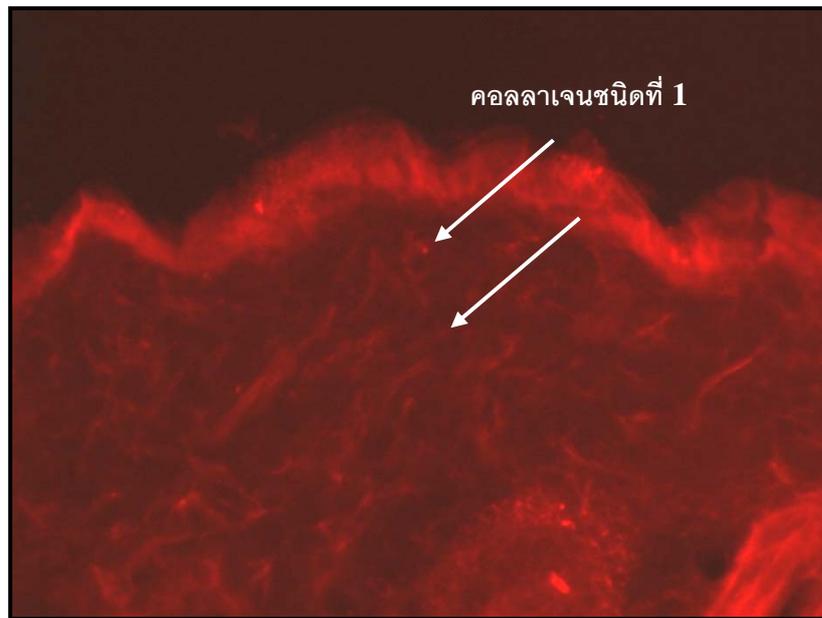


รูปที่ 75 กราฟแท่งแสดงปริมาณคอลลาเจนในเนื้อเยื่อตัวอย่าง เมื่อ control group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, negative control คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์, isolated artocarpin คือได้รับแสงยูวีบี และสารสกัดเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (N=4) (*, $p < 0.05$, Student's *t*-test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

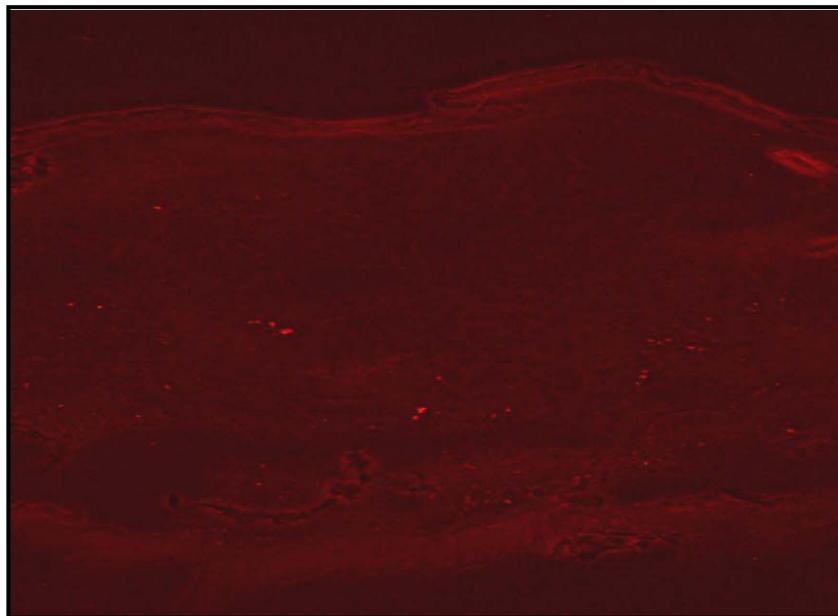
2.8.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative) โดยวิธี immunofluorescence

เพื่อเป็นการยืนยันผลปริมาณไฮดรอกซีโปรลีน การวิเคราะห์โดยวิธี immunofluorescence จึงถูกนำมาตรวจสอบหาตำแหน่งคอลลาเจนในผิวหนังของหนูทดลอง โดยการวิเคราะห์นี้ปฏิบัติที่อุณหภูมิห้องเริ่มแรก นำชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ถูกตัดเพื่อศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์วางลงบนสไลด์ จากนั้น fix สไลด์โดยแช่ใน acetone (ที่ทำให้เย็นใน -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) นาน 5-10 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วย PBS และ cover wash buffer (Tris buffer saline (TBS) with 0.025% Triton X-100) 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วป้องกันการย้อมที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific staining) โดยใช้ blocking buffer (TBS with 10% bovine serum albumine (BSA)) บ่มเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการกำจัด blocking buffer โดยการใช้น้ำ unconjugated primary type-1 collagen antibody ในอัตราส่วน 1:200 dilution buffer (TBS with 1% BSA) และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงในที่มืด แล้วล้างด้วย wash buffer 2 ครั้ง ทำการย้อม secondary antibody ด้วย Cyanine Dyes (Cy5) ในอัตราส่วน 1:250 dilution buffer และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด แล้วสังเกตสไลด์ที่เตรียมภายใต้กล้อง fluorescence microscope โดย Cy5 จะถูกกระตุ้นภายใต้แสงสีแดง (650 นาโนเมตร) ดังนั้นจึงเห็นเป็นสีแดง (670 นาโนเมตร)

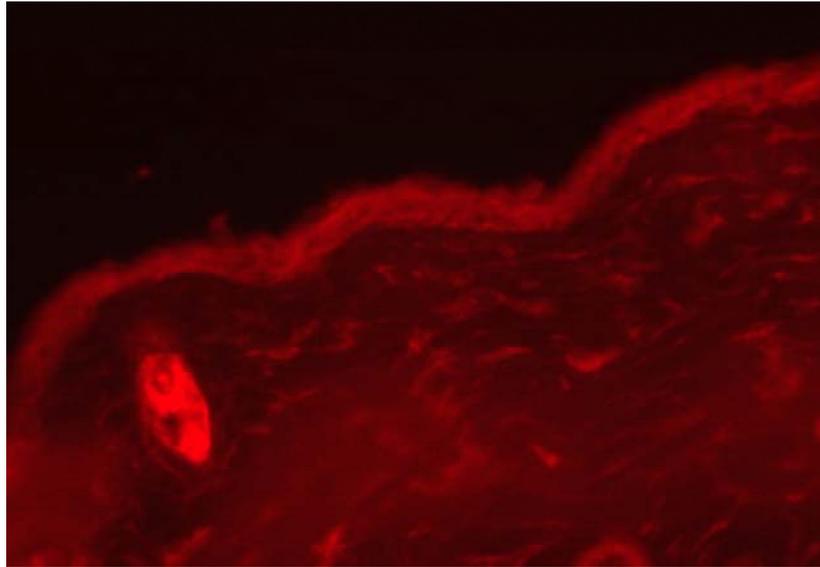
การกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่งเนื้อเยื่อผิวหนังหนูแสดงดังรูป 76-79 จากรูปที่ได้พบว่าในกลุ่มควบคุมมีการกระจายตัวของคอลลาเจนที่ชัดเจน สังเกตได้จากจุดที่เรืองแสงสีแดงที่กระจายอยู่ทั่วตัวอย่างชิ้นเนื้อ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีมีจุดเรืองแสงสีแดงซึ่งแสดงถึงปริมาณคอลลาเจนที่ใกล้เคียงกัน และกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียว มีจุดเรืองแสงสีแดงที่น้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองหาปริมาณคอลลาเจนก่อนหน้า



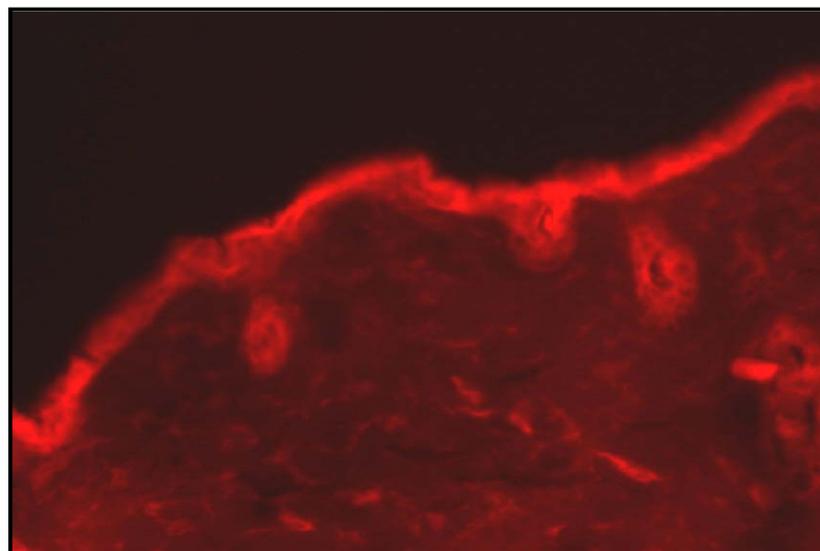
รูปที่ 76 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อไม่ได้รับแสงยูวีบี (control group) ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 77 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาน้ำเปล่า (positive control) ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 78 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาวิตามินซี 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 79 แสดงการกระจายตัวของคอลลาเจนในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการทาสารสกัด isolated artocarpin 0.02 เปอร์เซ็นต์ (positive control) ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

บทที่ 3

สรูปและอภิปรายผลการทดลอง

สารสกัดจากธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด ที่สามารถช่วยลดการเกิดอุบัติการณ์ของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมถอยของอวัยวะภายในร่างกาย รวมทั้งการแก่ก่อนวัยอันควรเนื่องมาจากสิ่งกระตุ้นภายนอกในร่างกายโดยเฉพาะแสงแดด เมื่อไม่นานมานี้มีการวิจัยพบว่าสารสกัดจากแก่นต้นสาเก (*Artocarpus incisus*) เป็นพืชที่น่าสนใจในแง่ที่ว่าสามารถฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่แยกจากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย โดยสารสกัดกระตุ้นการสร้างโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 และยับยั้งการสร้างเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน เช่น MMP ชนิดที่ 1 (MMP-1) รวมทั้งสามารถฟื้นฟูศักยภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) คอลลาเจน และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย [37] ด้วยเหตุนี้คณะผู้ดำเนินการวิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำแก่นต้นสาเกซึ่งเป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศ รวมทั้งที่จังหวัดพิษณุโลก มาสกัดเพื่อให้ได้สารอาร์โทคาร์ปิน (artocarpin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่อยู่ในแก่นต้นสาเก มาศึกษาควบคุมกับสารสกัดหยาบในการศึกษาเชิงลึกถึงประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนัง อันเนื่องมาจากได้รับแสงยูวีบี ทั้งจากในเซลล์ไฟโบรบลาสต์และในสัตว์ทดลอง โดยออกแบบการศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในแง่ของการทดสอบความเป็นพิษการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ปริมาณโปรคอลลาเจนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ รวมถึงปริมาณ MMP-1 และ 13 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อได้รับแสงยูวีบี และออกแบบการศึกษาในเซลล์เคราติโนไซต์ในแง่ของการทดสอบการยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ (IL-6 และ TNF- α) รวมทั้งมีการออกแบบศึกษาในสัตว์ทดลองในแง่ของการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนัง ที่ได้รับแสงยูวีบี ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ซึ่งประเมินจากลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ รวมทั้งระดับของไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจนที่มีในผิวหนังหนูกุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงและสารสกัดจากแก่นต้นสาเก

การศึกษาเริ่มจากการสกัดและแยกสารสำคัญซึ่งก็คืออาร์โทคาร์ปิน พบว่าสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin มีปริมาณอาร์โทคาร์ปิน 43.85 ± 0.03 และ 88.18 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิตามินซีและวิตามินอีที่ใช้เป็นสารอ้างอิง (positive control) สารสกัดหยาบและ isolated artocarpin จากแก่นต้นสาเกโดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงในรูปของ EC_{50} (ค่าความเข้มข้นสมมูลที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50 ของประสิทธิภาพสูงสุด) พบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ (EC_{50} มีค่า 207.5 ± 9.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ isolated artocarpin (EC_{50} มีค่า 132.7 ± 2.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีความสามารถน้อยกว่าวิตามินซีและวิตามินอี ซึ่งจากค่าที่ได้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดและ isolated artocarpin จากผลการทดลองนี้เป็นเพียงการหาข้อมูลเพื่อ

ยืนยันถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และนำไปสู่การหากลไกการออกฤทธิ์อื่นที่คาดว่าจะมีผลต่อการฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งนำไปสู่การป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังก่อนวัยอันควรเนื่องมาจากแสงยูวีบี

ต่อมาได้มีการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบและ isolated artocarpin ทั้งในด้านความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ใช้วิธี XTT assay ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะปลดปล่อยเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลง tetrazolium salt XTT (สีเหลือง) ไปเป็น formazan dye (สีส้ม) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นสารที่ใช้ทดสอบไม่มีผลต่อลักษณะกายภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นสูงสุด 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาในการบ่มสารที่ใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้นใดๆ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มก็ไม่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของการศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ใช้วิธี BrdU assay ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่า BrdU จะเข้าไปจับกับ DNA ของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว จากนั้นจึงตรวจโดยการใช้อнти-BrdU antibody เข้าทำปฏิกิริยา พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ หรือ isolated artocarpin มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนของเซลล์หลังจากที่ถูกบ่มกับสารนั้น จะเพิ่มขึ้นหลังจากมีการเพิ่มเวลาในการบ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งลักษณะของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับผลที่ได้จากการศึกษา cell viability ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น อย่างไรก็ตามถึงแม้จำนวนของเซลล์นั้นจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด และระยะเวลาในการบ่ม แต่ก็ยังต้องมีการทดสอบการทำงานของเซลล์ในแง่ของการผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น การผลิตโปรคอลลาเจน เพื่อยืนยันว่าเซลล์ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีประสิทธิภาพเหมือนเซลล์ปกติทั่วไป

จากผลการศึกษา cell viability และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ทำให้ตัดสินใจเลือกใช้ isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อการผลิตโปรตีนและเอนไซม์ที่มีผลต่อการสังเคราะห์และทำลายคอลลาเจน ในส่วนของการทดสอบผลของสารสกัดต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี ก่อนอื่นต้องทำการหาความเข้มแสงอันเหมาะสมที่เซลล์สามารถทนต่อแสงยูวีบีได้นานที่สุดโดยไม่ทำให้เซลล์ตายหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป โดยอาศัยหลักการ BrdU assay พิจารณาร่วมกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์ภายหลังที่ได้รับแสงยูวีบีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ พบว่าที่ความเข้มแสง 64 และ 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อพิจารณาที่ความเข้มแสง 192 จูลต่อตารางเซนติเมตร พบว่ารูปร่างของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจึงเลือกความเข้มแสง 128 จูลต่อตารางเซนติเมตรเป็นความเข้มแสงที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาในขั้นต่อมาเป็นการศึกษาผลของสารสกัดต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ผลิตโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี ซึ่งการศึกษาดังกล่าว เริ่มแรกจะทำการทดสอบหาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยการฉายแสงยูวีบีก่อนแล้วจึงบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับสารสกัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในแง่ของการฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี ซึ่งทดสอบโดยเทคนิค western blot ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแสงยูวีบีมีผลทำให้ปริมาณโปรคอลลาเจนที่คงอยู่ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการได้รับแสงยูวีบีแบบครั้งเดียว (acute dose) กระตุ้นให้เซลล์เกิดการผลิตและสะสมโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 มากขึ้นเพื่อทดแทนคอลลาเจนที่ถูกทำลายโดยแสงยูวีบี และเมื่อสังเกตดูปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดและวิตามินซีภายหลังที่ได้รับแสงพบว่าสารทั้งสองส่งผลให้เกิดการสะสมปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสาเหตุอาจเป็นไปได้ว่าสารทั้งสองชนิดกระตุ้นให้โปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ถูกผลิตขึ้นมาเพิ่มขึ้นจากการได้รับแสงยูวีบีหลังออกนอกเซลล์ (extracellular procollagen) ซึ่งโปรคอลลาเจนที่อยู่นอกเซลล์นี้มีความสำคัญในแง่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นคอลลาเจนที่มีผลต่อโครงร่างและความยืดหยุ่นของผิวหนังชั้น dermis [44] สมมติฐานนี้มาจากพื้นฐานที่ว่านอกจากวิตามินซีจะมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างโปรคอลลาเจนแล้ว ยังมีผลต่อ hydroxylation, glycosylation และ triple-helix formation ของโปรคอลลาเจนที่สร้างใหม่ภายในเซลล์ [45-47] ซึ่งขั้นตอนนี้มีผลทำให้โปรคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่พร้อมออกนอกเซลล์ นำไปสู่การตัดสายเปปไทด์การเกิดเป็นไฟบริลและครอสลิงค์ของคอลลาเจน (mature collagen) นอกเซลล์ [48]

เพื่อทดสอบว่า ปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกบ่มกับสารสกัดก่อนได้รับแสงยูวีบีจะแตกต่างกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้หรือไม่ จึงทำการศึกษาโดยการให้สารสกัดแก่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ก่อนให้แสงยูวีบีแก่เซลล์ ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้กล่าวคือเซลล์เมื่อได้รับแสงยูวีบีจะมีการผลิตและสะสมคอลลาเจนภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณคอลลาเจนในเซลล์ซึ่งบ่มกับสารสกัดและวิตามินซี พบว่าปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 สะสมอยู่ในเซลล์มาก ซึ่งผลที่ได้นี้แตกต่างกับผลที่ได้จากการศึกษาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารสกัดภายหลังจากที่ได้รับแสงยูวีบี ผลการศึกษาที่ได้นี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจมากหากพบต่อไปว่าสารสกัดและวิตามินซีมีผลไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือมีผลต่อทั้งกระตุ้นการสร้างโปรคอลลาเจนภายในเซลล์และหลังโปรคอลลาเจนออกนอกเซลล์ นำไปสู่การเกิดเป็น mature collagen ใน extracellular matrix ด้วยเหตุนี้จึงทำการหาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ภายนอกเซลล์ในการทดลองต่อไปโดยเน้นไปที่การศึกษาปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 นอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารสกัดภายหลังจากที่ได้รับแสงยูวีบี

เป็นที่น่าสนใจที่พบว่า การได้รับแสงยูวีบีในความเข้มที่ใช้มีผลต่อปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่อยู่ในเซลล์และนอกเซลล์แตกต่างกัน กล่าวคือในการศึกษาข้างต้นพบว่าโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สะสม

อยู่ภายในเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีมีมากกว่ากลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี) อย่างชัดเจนขณะที่ในการศึกษานี้พบว่าปริมาณโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่อยู่นอกเซลล์ของกลุ่มควบคุม (223.45 ± 84.64 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่แตกต่างกับกับ negative control (145.15 ± 42.71 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว) แต่เมื่อเซลล์ถูกบ่มกับวิตามินซีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะได้รับแสงยูวีบี นอกจากวิตามินซีจะช่วยเพิ่มการสร้างและสะสมโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์แล้วยังส่งผลให้เซลล์ปลดปล่อยโปรตีนชนิดนี้ออกมานอกเซลล์ด้วย (683.30 ± 32.95 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อพิจารณาผลของสารสกัด ถึงแม้ว่าสารสกัดจะส่งผลให้เกิดการผลิตและสะสมโปรคอลลาเจนภายในเซลล์เช่นเดียวกับวิตามินซี แต่โปรคอลลาเจนที่ผลิตขึ้นถูกปลดปล่อยออกมาน้อยกว่ามาก (137.2 ± 174.33 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าของสารสกัดไม่มีผลในการกระตุ้นการปลดปล่อยโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณ mature collagen ที่อยู่ภายนอกเซลล์ที่ทำหน้าที่พยุงโครงสร้างและให้ความยืดหยุ่นแก่ผิวหนังชั้น dermis ด้วยเหตุนี้จึงได้ออกแบบการศึกษาเพิ่มเติมโดยศึกษาผลของสารสกัดต่อการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายคอลลาเจนที่อยู่ภายนอกเซลล์ ได้แก่ MMP-1 และ 13 เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้จะมีผลต่อการคงอยู่ของ mature collagen ในผิวหนังชั้น dermis [49]

การศึกษาค้นคว้าของสารสกัดต่อการหลั่ง MMP-1 และ 13 โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับแสงยูวีบี มีขั้นตอนโดยเริ่มจากนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาบ่มกับสารสกัดก่อนที่จะได้รับแสงยูวีบี จากนั้นจึงตรวจสอบด้วย ELISA kit ซึ่งผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า แสงยูวีบีมีผลเพิ่มการหลั่ง MMP-1 อย่างมีนัยสำคัญ (16.82 ± 1.61 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุม และ 107.22 ± 5.16 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว, negative control) และเป็นที่น่าสนใจที่พบว่า isolated artocarpin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการหลั่งของ MMP-1 (89.62 ± 12.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) จากเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบี ในขณะที่วิตามินซีไม่มีผลในการลดการหลั่ง MMP-1 (103.39 ± 16.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในกรณีของ MMP-13 พบว่าปริมาณเอนไซม์ชนิดที่หลั่งภายนอกเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นในเซลล์กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว (negative control, 87.70 ± 16.69 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (78 ± 6.36 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การที่เซลล์ได้รับวิตามินซีก่อนที่จะได้รับแสงยูวีบี มีผลทำให้ปริมาณ MMP-13 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (38.65 ± 11.24 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดียว ซึ่งการลดลงของ MMP-13 พบในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ isolated artocarpin เช่นกัน (54.40 ± 48.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่การลดลงนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เป็นที่ทราบกันดีว่าการสัมผัสกับแสงแดดมีผลทำให้ชั้นหนังกำพร้าหนาขึ้น ร่วมกับการจัดเรียงตัวและปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันคอลลาเจนและอีลาสตินในชั้นหนังแท้มีการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 รวมทั้งอีลาสตินจะลดลง [50] นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำให้ผิวหนังแก่ขึ้น ได้แก่ 1) การสังเคราะห์โปรตีน

คอลลาเจนโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดลง โดยเฉพาะการแสดงออกของยีนโปรคอลลาเจนชนิดที่ 1 [4-7] และ 2) เส้นทางการส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) ซึ่งส่งผลทำให้การแสดงออกของยีนต่างๆ ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังเพิ่มขึ้น [8-10] ยีนเหล่านี้ ได้แก่ เมทริกซ์เมทาลอโปรตีนเนสชนิดที่ 1 (MMP-1) หรือที่รู้จักกันในนาม collagenase I และ MMP-13 หรือที่รู้จักกันในนาม collagenase III [11, 51] เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสายโปรตีนคอลลาเจน เช่น คอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 ซึ่งพบในผิวหนัง [12-13] และนอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังสูญเสียศักยภาพในการเคลื่อนตัว (migration) ไปยังเส้นใยคอลลาเจน และยึดเกาะ (adhesion) กับเส้นใยดังกล่าวส่งผลให้การจัดระเบียบหรือจัดเรียงตัว (reorganization) ของเส้นใยคอลลาเจนโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ รวมทั้งการสูญเสียศักยภาพในการเกาะติดกับเส้นใยคอลลาเจนของไฟโบรบลาสต์ยังทำให้คุณสมบัติเชิงกล เช่น ศักยภาพในการหดตัว (contractile capacity) ของเซลล์ลดลงด้วย [14-16] อาจกล่าวได้ว่าปริมาณคอลลาเจนที่ลดลง การทำลายคอลลาเจนที่มากขึ้น การจัดระเบียบเส้นใยคอลลาเจนที่ผิวหนังชั้น dermis ที่ไม่สมบูรณ์ และการสูญเสียความสามารถในการหดตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อันเนื่องมาจากอายุมากขึ้น ทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการเปลี่ยนแปลง และนำไปสู่การเกิดริ้วรอยที่ผิวหนังและสูญเสียความยืดหยุ่น

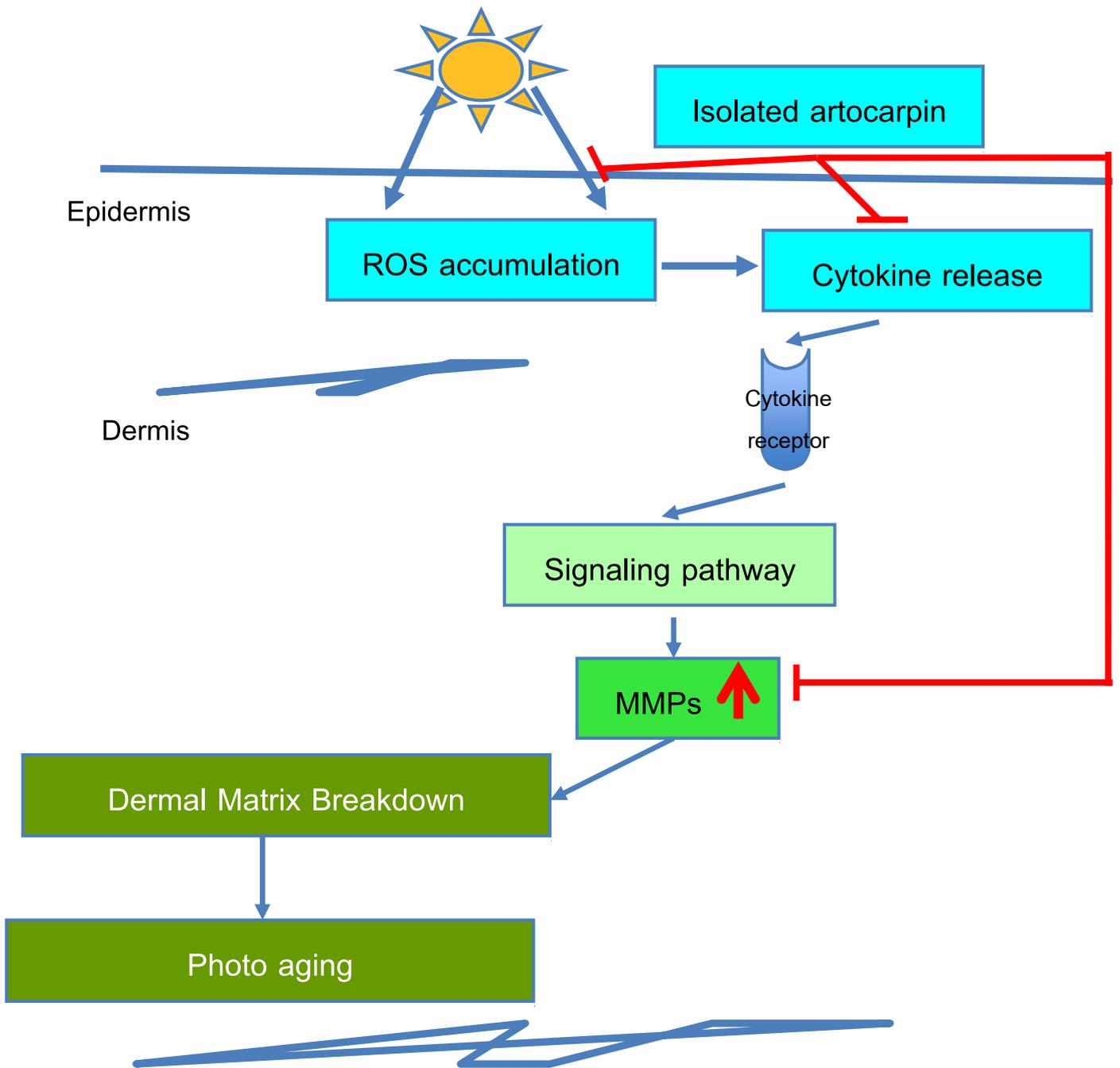
จากผลการศึกษาข้างต้นทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า สารสกัดมีประสิทธิภาพในเชิงยับยั้งการทำลายคอลลาเจนมากกว่าการกระตุ้นหรือฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนดังสมมติฐานที่ตั้งไว้ในตอนแรก ซึ่งจะเห็นได้จากการที่สารสกัดมีฤทธิ์ในการป้องกันการปลดปล่อย MMP-1 ร่วมกับมีแนวโน้มในการลดการปลดปล่อย MMP-13 ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง MMP-1 มีฤทธิ์โดยตรงในการทำลาย mature collagen ด้วยเหตุนี้แผนการศึกษาจึงเบนเข็มไปในทางทิศทางที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและปลดปล่อย MMPs เช่น ศึกษาผลของสารสกัดต่อการหลั่งสารสื่ออักเสบ ได้แก่ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6) เนื่องจากสารสื่ออักเสบทั้ง 2 ชนิด มีความสัมพันธ์กับ MMPs ในแง่กระตุ้นการสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน

การทดลองต่อไปจะใช้ ELISA kit ในการหาปริมาณการ TNF- α และ IL-6 ที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยเซลล์เคราติโนไซต์ที่ได้รับสารทดลองก่อนการได้รับแสงยูวีบี การศึกษาที่ได้พบว่าที่สภาพปกติเซลล์มีการหลั่งสารสื่ออักเสบที่น้อยมากจนไม่สามารถวัดค่าได้ ในขณะที่แสงยูวีบีมีผลต่อการเพิ่มปริมาณการหลั่ง TNF- α (283.83 ± 70.06 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IL-6 (141.67 ± 20.28 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเซลล์เคราติโนไซต์เมื่อเซลล์ได้รับ isolated artocarpin พบว่าเซลล์มีการหลั่งสารสื่ออักเสบน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (23.17 ± 23.30 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ TNF- α และ 88.33 ± 17.56 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ IL-6) เทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียว เป็นที่น่าสนใจที่พบว่าสารสกัดยับยาสารสกัดยับยั้งการปลดปล่อยสารสื่ออักเสบทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ (257.17 ± 34.03 พิ

โคกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับ TNF- α และ 136.11 ± 17.67 พิโคกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับ IL-6) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าฤทธิ์ในการต้านการปลดปล่อยสารสื่ออักเสบนั้นน่าจะมีผลมาจากปริมาณสาร artocarpin ซึ่งเป็นสารหลักที่พบใน isolated artocarpin

จากข้างต้นที่กล่าวไว้ว่า สารสกัด isolated artocarpin มีประสิทธิภาพในเชิงยับยั้งการทำลายคอลลาเจนมากกว่าการกระตุ้นหรือฟื้นฟูการสร้างคอลลาเจนดังสมมติฐานที่ตั้งไว้ในตอนแรก ซึ่งจะเห็นได้จากการศึกษาที่สารสกัดมีฤทธิ์ในการป้องกันการปลดปล่อย MMP-1 ร่วมกับมีแนวโน้มในการลดการปลดปล่อย MMP-13 ผลที่ได้ชี้ให้เห็นประโยชน์ของการนำสารสกัดไปใช้ในการป้องกันการทำลายคอลลาเจนเนื่องจากแสงยูวีบี อย่างไรก็ตามการนำไปใช้จะเป็นไปได้มากขึ้นหากสามารถพิสูจน์ประสิทธิภาพใน *in vivo* ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจะยืนยันผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยมีสมมติฐานที่ว่า การได้รับสารสกัดโดยการทาที่ผิวหนังอาจส่งผลป้องกันการทำลายคอลลาเจนเนื่องมาจากแสงยูวีบี เนื่องจากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน

สำหรับการศึกษาผลของสารสกัดต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องจากแสงยูวีบีเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยใช้หนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ ภายหลังจากที่บริเวณส่วนหลังของหนูได้รับแสงยูวีบีเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตามลำดับความแรงที่กำหนด พร้อมกับทาน้ำเปล่า วิตามินซีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หรือสารสกัด isolated artocarpin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 4 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาในเซลล์) พบว่ายูวีบีมีผลทำให้ผิวหนังของหนูหนาขึ้นเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี (23.49 ± 0.69 ไมโครเมตร) และกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดี่ยว (negative control, 29.92 ± 0.74 ไมโครเมตร) อย่างมีนัยสำคัญ และการได้รับสารสกัด (21.74 ± 1.02 ไมโครเมตร) มีผลในการลดความหนาของผิวหนังหนูที่ใกล้เคียงกับวิตามินซี (23.83 ± 2.48 ไมโครเมตร) และลดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีอย่างเดี่ยวนอกจากนี้ยังพบว่าแสงยูวีบีมีผลในการลดปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างชิ้นเนื้ออย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (6.74 ± 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) และกลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียว (0.99 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) เมื่อพิจารณาปริมาณคอลลาเจนจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (5.42 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) พบว่ามีปริมาณคอลลาเจนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี (5.60 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อเยื่อ) โดยทั้งสองกลุ่มมีปริมาณคอลลาเจนที่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ อาจกล่าวได้ว่าการได้รับวิตามินซีหรือสารสกัดขณะที่ได้รับแสงยูวีบี ช่วยลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยกลไกหลักคือสารสกัดสามารถยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระและลดการปลดปล่อยสารสื่ออักเสบ ได้แก่ TNF- α และ IL-6 ที่มีผลต่อการสร้าง รวมทั้งลดการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน ได้แก่ MMP-1 และ MMP-13 โดยกลไกการยับยั้งการทำลายคอลลาเจนของสารสกัดดังแสดงในรูปที่ 80



รูปที่ 80 แผนภาพแสดงฤทธิ์ของสารสกัด isolated artocarpin ในการยับยั้งการทำลายคอลลาเจน โดยสารสกัดมีฤทธิ์ free radical scavenging และยับยั้งการปลดปล่อยสารสื่ออักเสบ เช่น TNF- α และ IL-6 จากเซลล์เคราติโนไซต์ที่อยู่ในชั้น epidermis รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-13 ฤทธิ์ต่างๆ เหล่านี้ จะส่งผลให้การทำลายคอลลาเจนในผิวหนังชั้น dermis ลดลง

เอกสารอ้างอิง

1. Guyton, K.Z., Gorospe, M., Holbrook, N.J., 1997. Oxidative stress, gene expression, and the aging process. In: Scandalios, J. (Ed.), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY, USA, pp. 247–272.
2. Muscari, C., Giaccari, A., Giordano, E., Clo, C., Guarnieri, C., Caldarera, C.M., 1996. Role of reactive oxygen species in cardiovascular aging. *Mol. Cell. Biochem.* 160, 159–166.
3. Sohal, R.S., Allan, R.G., 1990. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and ageing: a unifying hypothesis. *Exp. Gerontol.* 25, 499–522.
4. Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J.J., Fisher, G.J., 2002. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 119, 499-506.
5. Fisher, G.J., Datta, S., Wang, Z., Li, X.Y., Quan, T., Chung, J.H., Kang, S., Voorhees, J.J., 2000. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J. Clin. Invest.* 106, 663-670.
6. Penttinen, R.P., Kobayashi, S., Bornstein, P., 1988. Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 1105-1108.
7. Chung, K.Y., Agarwal, A., Uitto, J., Mauviel, A., 1996. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 271, 3272-3278.
8. Polte, T., Tyrrell, R.M., 2004. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1566-1574.
9. Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K.C., Bhagavathula, N., Kang, S., Fisher, G.J., Varani, J., Voorhees, J.J., 2003. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem. Photobiol.* 78, 43-48.
10. Fisher, G.J., Wang, Z., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J., 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* 337, 1419-1429.

11. Vincenti, M.P. and Brinckerhoff, C.E., 2002. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Research*. 3(4).
12. Varani, J., Perone, P., Fligiel, S.E., Fisher, G.J., Voorhees, J.J., 2002. Inhibition of type 1 procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J. Invest. Dermatol.* 119, 122-129.
13. Huang, C., Ma, W.Y., Dawson, M.I., Rincon, M., Flavell, R.A., Dong, Z., 1997. Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5826-5830.
14. Püschel, H.U., Chang, J., Müller, P.K., Brinckmann, J., 1995. Attachment of intrinsically and extrinsically aged fibroblasts on collagen and fibronectin. *J. Photochem. Photobiol. B.* 27, 39-46.
15. Tamariz, E., Grinnell, F., 2002. Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. *Mol. Biol. Cell* 13, 3915-3929.
16. Jouandeaud, M., Viennet, C., Bordes, S., Closs, B., Humbert, P., 2004. Comparison of the biomechanical and biosynthetic behavior of normal human fibroblasts and fibroblasts from a forehead wrinkle. *IFSCC Magazine* 7, 109-113.
17. Bornstein, P., Sage, H., 1989. Regulation of collagen gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. & Mol. Biol.* 37, 66-106.
18. Massagué, J., 1998. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
19. Piek, E., Heldin, C.H., Ten Dijke, P., 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *EMBO J.* 13, 2105-2124.
20. Massagué, J., Wotton, D., 2000. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745-1754.
21. Verrecchia, F., Mauviel, A., 2002. Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of Smad proteins in fibrosis, *Curr. Rheumatol. Rep.* 4, 143-149.
22. Topper, J. N., Cai, J., Qiu, Y., Anderson, K. R., Xu, Y-Y., Deeds, J. D., Feeley, R., Gimeno, C. J., Woolf, E. A., Tayber, O., Mays, G. G., Sampson, B. A., Schoen, F. J., Gimbrone, Jr. M. A., Falb, D., 1997. Two novel-MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9314-9319.

23. Ulloa, L., Doody, J., Massagué, J., 1999. Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397, 710–713.
24. Bitzer, M., von Gersdorff, G., Liang, D., Dominguez-Rosales, A., Beg, A.A., Rojkind, M., Böttinger, E.P., 2000. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 14, 187-197.
25. Nagarajan, R. P., Chen, F., Li, W., Vig, E., Harrington, M. A., Nakshatri, H., Chen, Y., 2000. Repression of transforming-growth-factor-beta-mediated transcription by nuclear factor kappaB. *Biochem. J.* 48(Pt 3), 591–596.
26. Yamane, K., Ihn, H., Asano, Y., Jinnin, M., Tamaki, K., 2003. Antagonistic Effects of TNF- α on TGF- β Signaling Through Down-Regulation of TGF- β Receptor Type II in Human Dermal Fibroblasts. *J. Immunol.* 171, 3855-3862.
27. Lu, L., Ying, K., Wei, S., Liu, Y., Lin, H., Mao, Y., 2004. Dermal fibroblast associated gene induction by asiaticoside shown in vitro by DNA microarray analysis. *Brit. J. Dermatol.* 151, 571–578.
28. Lee, J., Jung, E., Lee, J., Huha, S., Kima, J., Park, M., Soa, J., Hama, Y., Jung, K., Hyuna, C.-G., Kimb, Y.S., Park, D., 2007. *Panax ginseng* induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. *J. Ethnopharmacol.* 109, 29-34.
29. Cho, S., Won, C.-H., Lee, D.H., Lee, M.-J., Lee, S., So, S.-H., Lee, S.-K., Koo, B.-S., Kim, N.-M., Chung, J.H., 2009. Red ginseng root extract mixed with torilus fructus and corni fructus improves facial wrinkles and increases Type I procollagen synthesis in human skin: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Med. Food* 12, 1252-1259.
30. Choi, M.S., Yoo, M.S., Son, D.J., Jung, H.Y., Lee, S.H., Jung, J.K., Lee, B.C., Yun, Y.P., Pyo, H.B., Hong, J.T., 2007. Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation of the TGF- β signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB-irradiated human fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* 46, 127-137.
31. Neena, P., Jennifer, C., Yu-Jun, C., Prashanti, N., May, T., Thomas, K., Joshua, G., Marvin, T., Luiji, D., Donna, L., Salvador, G., 2009. Beneficial regulation of matrixmetalloproteinases and their inhibitors, fibrillar collagens and transforming growth factor- β by *Polypodium leucotomos*, directly or in dermal fibroblasts, ultraviolet radiated fibroblasts, and melanoma cells. *Arch. Dermatol. Res.* 301, 487-495.

32. Kim, J., Hwang, J.S., Cho, Y.K., Han, Y., Jeon, Y.J., Yang, K.H., 2001. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB- induced skin damages. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, 11-19.
33. Ho, J.-N., Lee, Y.-H., Lee, Y.-D., Jun, W.-J., Kim, H.-K., Hong, B.-S., Shin, D.-H., Cho, H.-Y., 2005. Inhibitory effect of Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced matrix metalloproteinase-1 production in human skin fibroblast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2227-2231.
34. Donsing, P., Limpeanchob, N., Viyoch, J., 2008. Effect of the effect of Thai breadfruit's heartwood extract on melanogenesis-inhibitory and antioxidation activities. *J. Cosmet. Sci.* 59, 41-85.
35. Buranajaree, S., Donsing, P., Jeenapongsa, R., Viyoch, J., 2010. Depigmenting action of nanoemulsion containing *Artocarpus incisus*'s heartwood extract on UVB-induced hyperpigmentation in C57BL/6 mice. *J. Cosmet. Sci.* (submitted).
36. Shimizu, K., Kondo, R., Sakai, K., 2002. The skin-lightening effects of artocarpin on UVB-induced pigmentation. *Planta Med.* 68, 79-81.
37. Viyoch, J., Buranajaree, S., Grandmottet, F., Robin, S., Binda, D., Viennet, C., Waranuch, N., Humbert, P., 2010. Evaluation of the effect of Thai breadfruit's heartwood extract on biological functions of fibroblasts from wrinkles. *J. Cosmet. Sci.* 61, 311-324.
38. World Agroforestry Centre. June, 2011. A Tree Species Reference and Selection Guide. Retrieved June, 2011, from <http://www.worldagroforestry.org/SEA/Products/AFDbases/AF/asp/SpeciesInfo.asp?SpID=1734>.
39. Parkinson, K. and Yeudall, A., 2002. The epidermis. *Culture of Epithelial Cells*, Second Edition. 3, 65-94
40. Fujii, T., Wakaizumi, M., Ikami, T., Saito, M., 2008. Amla (*Embllica officinalis* Gaertn.) extract promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 119, 53-57.
41. Aslam, M.N., Lansky, E.P., Varani, J., 2006. Promeganate as a cosmeceutical source: promeganate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *J. Ethnopharmacol.* 103, 311-318.

42. Park, S.G., Shin, H., Shin, Y.K., Lee, Y., Choi, E.-C., Park, B.-J., Kim, S., 2005. The novel cytokine p43 stimulates dermal fibroblast proliferation and wound repair. *Am. J. Pathol.* 166, 387-398.
43. Kim, Y.G., Sumiyoshi, M., Sakanaka, M., Kimura, Y., 2009. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *EUR. J. Pharmacol.* 602, 148-156.
44. Wolfe, S.L., 1995. The extracellular matrix. An introduction to cell and molecular biology. 7, 178-205.
45. Silva, G.M., Maia, P.M., Campos, B.G., 2000. Histopathological, morphometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skin care formulation. *Int. J. Cosmetic Sci.* 22(3), 169-179
46. Oikarinen, A., Anttinen, H., Kivirikko, K.I., 1976. Hydroxylation of lysine and glycosylation of hydroxylysine during collagen biosynthesis in isolated chick-embryo cartilage cells. *Biochem J.* 156(3), 545-551.
47. Murad, S., Grove, D., Lindbreg, K.A., Reynolds, G., Sivarajah, A., Pinnell, S.R., 1989. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. 78, 2879-2882.
48. Sharma, S.R., Poddar, R., Sen, P., Andrews, J.T., 2008. Effect of vitamin C on collagen biosynthesis and degree of birefringence in polarization sensitive optical coherence tomography (PS-OCT). *AJB.* 7(12), 2049-2054.
49. Nagase, H., Woessner, J.F.Jr., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491-21494.
50. Wlaschek, M., Tantcheva-Poor, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L.A., Razi-Wolf, Z., Schuller, J., Scharffetter-Kochanek, K., 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B.* 63, 41-51.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลสำเร็จของการวิจัยที่ได้รับ

1. วิธีการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ ได้แก่ keratinocyte และ fibroblast ที่พัฒนาขึ้น จะสามารถนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดอื่นๆ ที่คาดว่าอาจมีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้งการสร้าง inflammatory mediators ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการทำลายคอลลาเจน, procollagen และ MMPs

2. นางสาวนริษรา ธีระวีสิทธิ์ นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3. ส่งผลงานวิจัย เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับนานาชาติ Journal of Natural Medicines (impact factor ปี 2011 เท่ากับ 1.389