



รายงานการวิจัย

ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติเพื่อใช้ในการพัฒนาเวชสำอาง

Artificial skin structure for cosmeceutical development

รศ.ดร. ปริญญา น้อยสา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย
ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติเพื่อใช้ในการพัฒนาเวชสำอาง
Artificial skin structure for cosmeceutical development

รศ.ดร. ปริญญา น้อยสา
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณ 2562

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2564

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้ 1) เพื่อพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและช่วยให้ผิวขาว ซึ่งมีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการพัฒนาเวชสำอาง ด้วยการประยุกต์ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม 2) เพื่อใช้ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติที่พัฒนาขึ้นในการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการต้านการเกิดริ้วรอยและสร้างเม็ดสี โดยใช้สารคอร์ติโคสเตียรอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ต้นแบบ โดยทำการถ่ายโอนพลาสมิด pOBCol3.6-GFPtpz ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น type 1 collagen เข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (human dermal fibroblast cells) ซึ่งโปรโมเตอร์ type 1 collagen มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจน และพลาสมิด pEGFP-TYR ที่มีชิ้นส่วน Insert เป็น Tyrosinase เข้าสู่เซลล์ Keratinocyte ซึ่ง Tyrosinase มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ tyrosine สารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน หลังจากทำการเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ พบว่าต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติมีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescence microscope และหลังจากทดสอบการออกฤทธิ์ของสารคอร์ติโคสเตียรอยด์ พบว่า ชั้น Dermis มีการแสดงออกของ Green fluorescence protein เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ Green fluorescence protein ในชั้น Epidermis อาจกล่าวได้ว่าสารคอร์ติโคสเตียรอยด์มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ต้นแบบผิวหนังเทียมชั้น Dermis แต่ไม่มีผลในการลดการสร้างเม็ดสีผิวเมลานินในชั้น Epidermis ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมไปถึงลดการใช้สัตว์ทดลอง (Cruelty free) และสามารถทดแทนการใช้ผิวหนังเทียมที่มีต้นทุนค่อนข้างสูงได้

คำสำคัญ: ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติ, เวชสำอาง ชะลอวัย, ชะลอการเกิดริ้วรอย, ต่อด้านการสร้างเม็ดสี

Abstract

The objectives of this research are as follows: 1) to develop a 3D artificial skin model for determining the bioactivity of natural extracts against anti-aging and anti-pigmentation which is efficient to be used in the development of cosmeceuticals by using genetic engineering methods 2) to apply a 3D artificial skin structure prototype in the the efficacy and bioactivity assessment of natural extracts against anti-aging and anti-pigmentation by using cordycepin as the prototype active ingredient. Plasmid pOBCol3.6-GFPtpz with type 1 collagen promoter was tranfected to HDF cells (human dermal fibroblast cells). Type 1 collagen promoters plays a role in regulating the expression of genes involved in collagen formation. pEGFP-TYR plasmids with tyrosinase inserted was transfected into keratinocyte cells. Tyrosinase plays a role in regulating the expression of genes involved in the metabolism of tyrosine, an important precursor to melanin production. After cultivating a 3D artificial skin prototype, we found that the 3D artificial skin prototype exhibited green fluorescence under fluorescence microscope. After testing the activity of cordycepin, an increase of green fluorescent intensity was found in the dermis layer but not in the epidermid layer. Such result implied that cordycepin has the ability to stimulate collagen production in dermis layer of 3D artificial skin model, but has no effect on reducing the melanin pigment production in the epidermid layer. Taken together, the 3D artificial skin prototype can be effectively used as a model for the study of cosmetic product development, reducing animals test and could be the alternative to the commercial artificial skin that is quite expensive.

Keywords. Artificial skin, 3D skin, Cosmeceuticals Anti-aging, anti-wrinkle, anti-melanin

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี พ.ศ. 2562 เป็นงานวิจัยเพื่อพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติให้มีความแตกต่างจากผิวหนังเทียมสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาด เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและช่วยให้ผิวขาว ซึ่งมีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำสำหรับใช้ในการพัฒนาเวชสำอาง ด้วยการประยุกต์ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนสถานที่ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่อุทิศกำลังกายและกำลังใจช่วยในการวิจัยครั้งนี้ได้ด้วยดี ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

รศ.ดร.ปริญญา น้อยสา

30 สิงหาคม 2564

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	จ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ...	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย ...	3
ขอบเขตการวิจัย ...	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม.....	33
ประวัติผู้วิจัย	35

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 (A) ภาพแสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ กลุ่มควบคุม, และกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด hTERT, SV40 (CoTF) passages 1, 3 และ 5. (B) ความสัมพันธ์ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนในวันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 (C) การแสดงออกสัมพันธ์ของ Ki67 โดยวิธี qPCR เปรียบเทียบกับยีน β -Actin (D) อัตราส่วนสัมพันธ์ของเทโลเมียร์เทียบกับ ยีน 36B4 (อัตราส่วน T/S) โดย qPCR เทียบกับเซลล์ควบคุม (E) สันฐานวิทยาของการก่อเนื้องอกของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ มาเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (F) เปอร์เซ็นต์ของการก่อเนื้องอกและขนาดเฉลี่ยของเนื้องอก ค่าทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n = 3) *p < 0.05 และ **p < 0.01 เทียบกับเซลล์ SH-SY5Y	17
4.2 แสดงคุณลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอน (A) ผลลัพธ์ PCR ของ SIRT1, p53, p21, KRT18, COL1A1, COL3A1, Vimentin, Elastin และ GAPDH (B) การแสดงออกของ COL1A1, KRT18, Elastin, SIRT1, p53 และ p21 (C) การแสดงออกของโปรตีนของวิ Vimentin และ COL1A1 โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (D) ความเข้มของการเรืองแสงสัมพันธ์ของ COL1A1 และ Vimentin ซึ่งคำนวณจาก พื้นที่ทั้งหมดของอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n = 3) *p < 0.05 เทียบกับเซลล์ควบคุม	19
4.3 A) แสดงเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงแบบสองมิติ B) เซลล์โคราติโนไซต์ที่เพาะเลี้ยงแบบสองมิติ C) เซลล์ HDF ภายใต้กล้อง Fluorescence microscope ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pOBCol3.6-GFPtz ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น type 1 collagen D) เซลล์ Keratinocyte ภายใต้กล้อง Fluorescence microscope ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pEGFP-TYR ที่มี Gene/Insert เป็น Tyrosinase.....	21
4.4 ขั้นตอนการสร้างต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ A) การสร้างผิวหนังเทียมแบบสามมิติ ชั้นคอลลาเจน B) ชั้นคอลลาเจนที่มีการบ่มให้เซตตัวเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู C) การสร้างชั้น Dermis จากคอลลาเจนผสมเซลล์ Human dermal fibroblast บนชั้นคอลลาเจน D) ชั้น Dermis ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 4 วัน E) การสร้างชั้น Epidermis จากเซลล์ Keratinocyte บนชั้น Dermis F) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ได้หลังจาก	

เพาะเลี้ยงในอาหาร และสภาวะเหมาะสมที่ 18 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes.....	23
4.5 A) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติภายใต้การส่อง Fluorescence microscope ที่ 7 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes B) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบภายใต้การส่อง Fluorescence microscope ที่ 12 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes C) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบภายใต้การส่อง Fluorescence microscope ที่ 18 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes.....	23
4.6 ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบหลักจากการย้อมด้วย H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	24
4.7 ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติภายใต้การส่อง Fluorescence microscope A) ต้นแบบ ผิวหนังเทียมแบบสามมิติกลุ่มควบคุม B) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติหลังจากหยุดสาร ละลายคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C) กราฟแสดงผลการ เปรียบเทียบความเข้มแสงในกลุ่มที่ทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....	25



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

เวชสำอาง (cosmeceutical) เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อความงามที่มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อผิวหนัง การออกฤทธิ์ดังกล่าวเกิดจากการกระตุ้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง โดยมุ่งเน้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวหนัง และแก้ไขปัญหาอันไม่พึงประสงค์ เช่น การแก่ของผิวหนังที่เกิดจากแสง (photoaging) ริ้วรอย (wrinkle) หรือ จุดด่างดำ (hyperpigmentation) (Sittampalam et al. 2015) เพื่อให้สุขภาพผิวหนังโดยรวมมีการพัฒนาไปในทางที่ดีขึ้น ดังนั้นในกระบวนการพัฒนาและวิจัยผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ขั้นตอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง คือ การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีต่อเซลล์ผิวหนัง เพื่อเป็นการทดสอบและประเมินในเบื้องต้นว่า สารออกฤทธิ์ดังกล่าวมีการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ผิวหนังในลักษณะใด เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังหรือไม่ และต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเท่าไร จึงจะมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์สูงสุด เมื่อทราบถึงการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ผิวหนังในเบื้องต้นแล้ว จึงจะทำการทดสอบในมนุษย์ (clinical trial) ต่อไป อย่างไรก็ตาม การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ผิวหนังส่วนใหญ่เป็นการทดสอบกับระบบเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชั้นเดียวแบบสองมิติ (2 dimensional mono layer cell culture) ซึ่งเป็นระบบดั้งเดิมที่ง่าย และมีประสิทธิภาพในการใช้เพื่อศึกษาการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ต่อสารออกฤทธิ์ต่างๆ ทว่าการทดสอบในระบบดังกล่าวมีข้อจำกัด คือ ให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีสัณฐาน (morphology) โพลาริตีของเซลล์ (cell polarity) การแสดงออกของตัวรับ (receptor expression) การปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ชนิดอื่น และเมทริกซ์ภายนอก (extracellular matrix) และ สถาปัตยกรรมระดับเซลล์ (cellular architecture) แตกต่างไปจากเซลล์ผิวหนังที่มีอยู่โดยธรรมชาติในร่างกายมนุษย์ จึงทำให้เกิดข้อกังขาถึงความสอดคล้องกันของการออกฤทธิ์ในระบบเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชั้นเดียวแบบสองมิติ กับการออกฤทธิ์กับผิวหนังมนุษย์ (Breslin and O'Driscoll 2013; Brohem et al. 2011)

เพื่อให้การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ให้ผลที่สอดคล้องกับการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ผิวหนังที่มีอยู่โดยธรรมชาติในร่างกายมนุษย์มากที่สุด จึงได้มีการทดสอบกับผิวหนังของสัตว์ทดลอง เช่น หนู หรือ กระต่าย อย่างไรก็ตาม โครงสร้างผิวหนังสัตว์ทดลองมีความแตกต่างกับโครงสร้างผิวหนังมนุษย์ ทั้งในด้านสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยา ผลการศึกษาที่ได้จากการใช้สัตว์ทดลองจึงไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน

มนุษย์ได้ทั้งหมด (Li, Fukunaga-kalabis, and Herlyn 2011) และยังเกิดกระแสการต่อต้านผลิตภัณฑ์ที่มีการทดลองในสัตว์ขึ้น ล่าสุดจึงได้มีการศึกษาและพัฒนาผิวหนังเทียมแบบสามมิติ (3 dimensional artificial skin) ขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ได้แก่ เซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์ (Human dermal fibroblast: HDF) เซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) และเซลล์เมลานोไซต์ (melanocyte) ร่วมกันในลำดับ ตำแหน่ง และอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม (Chau et al. 2013; Li et al. 2011) เพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการศึกษาเซลล์ผิวหนังในรูปแบบสองมิติ และ การศึกษาในสัตว์ทดลอง อีกทั้งยังมีการผลิตแบบสำเร็จรูปเพื่อค้าขายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง เช่นผิวหนังเทียมในชื่อทางการค้า EpiDerm™ โดยบริษัท MatTek Corporation มีราคาสูงถึงกว่า 1000 บาท ต่อผิวหนังเทียมหนึ่งชิ้น ทำให้การที่จะนำผิวหนังเทียมสำเร็จรูปมาใช้ในการทดสอบสารออกฤทธิ์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางต้องใช้งบประมาณมหาศาล

ในปัจจุบัน เวชสำอางจำนวนมากน้อยถูกวิจัยและพัฒนาขึ้นเพื่อมุ่งเน้นในการออกฤทธิ์เพื่อชะลอวัย (antiaging) และเพื่อช่วยให้ผิวขาวขึ้น (whitening) ทั้งนี้การชราของผิว เกิดจากการที่เมตริกซ์ภายนอกของผิวหนังที่ถูกสร้างโดยเดอมอลไฟโบรบลาสต์ในชั้นเดอมิส ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ คอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) ถูกทำลาย โดยอนุมูลอิสระ (oxidant) เมื่อผิวต้องเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่ทำให้ผิวหนังเกิดความเครียด (Ganceviciene et al. 2012; Lee et al. 2009) และการที่ผิวคล้ำ เกิดจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin production) โดยเซลล์เมลานोไซต์ในผิวหนังชั้นเอพิเดอมิส เมื่อผิวหนังได้รับการกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Lin and Fisher 2007) ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์เวชสำอางเพื่อชะลอวัย จึงอาจออกฤทธิ์เพื่อกระตุ้นให้เดอมอลไฟโบรบลาสต์ในชั้นเดอมิสผลิตคอลลาเจนออกมาเพื่อทดแทนคอลลาเจนในส่วนที่ถูกทำลายไป และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์เวชสำอางเพื่อช่วยให้ผิวขาว จึงอาจสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ ตามลำดับ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นการพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติขึ้นในห้องทดลอง และมีต้นทุนต่ำ เพื่อใช้ในการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง นอกจากนี้งานวิจัยยังมุ่งเน้นที่จะพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมสำหรับการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางค์ในกลุ่มชะลอวัยและช่วยให้ผิวขาวโดยเฉพาะ โดยอาศัยวิธีทางพันธุวิศวกรรมในการส่งถ่ายยีนสารเรืองแสง (fluorescence) เข้าไปในเซลล์ผิวหนัง ก่อนนำไปใช้ในการผลิตต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ เมื่อสารสกัดที่ต้องการทดสอบสามารถออกฤทธิ์ต่อการสร้างคอลลาเจน และเมลานิน จะสามารถตรวจวัดได้ทันทีด้วยเครื่องวัดสารเรืองแสงสีเขียว (fluorometer) หรือ เครื่องถ่ายภาพฟลูออเรสเซนซ์

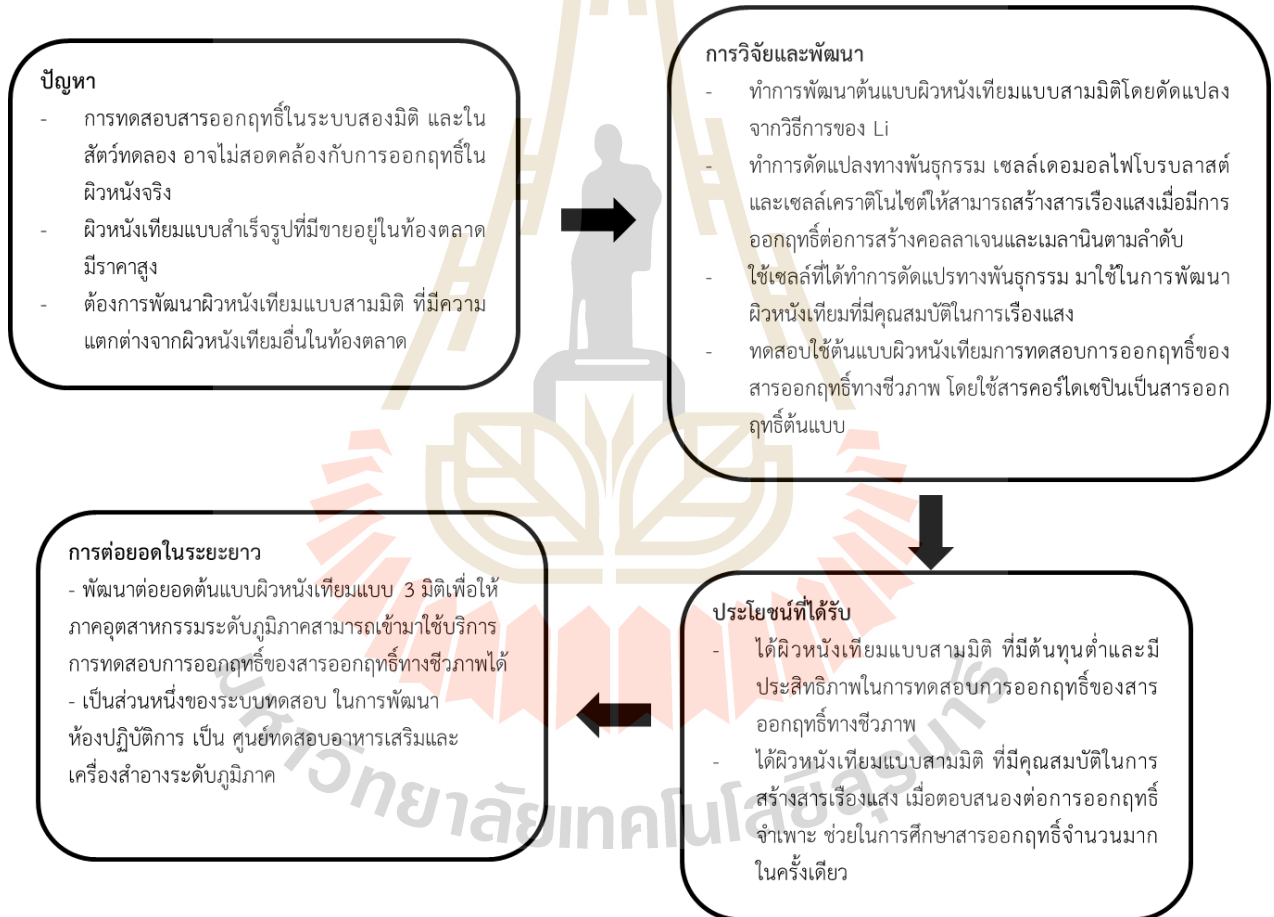
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและช่วยให้ผิวขาว ซึ่งมีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำสำหรับใช้ในการพัฒนาเวชสำอาง ด้วยการประยุกต์ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม

2. เพื่อใช้ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติที่พัฒนาขึ้นในการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและต้านการเกิดริ้วรอย โดยใช้สารคอร์ไดเซปินเป็นสารออกฤทธิ์ต้นแบบ

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีกรอบแนวความคิดของการวิจัย (Conceptual Framework) ดังนี้



ขอบเขตการวิจัย

1. ทำการพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากธรรมชาติอย่างมีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำ โดยมุ่งเน้นในการจำลองผิวหนังชั้นเดอมีสและอีพีเดอมีสที่ดัดแปลงวิธีการจาก Li (Li, Fukunaga-Kalabis, & Herlyn, 2011a)

2. ทำการพัฒนาสายพันธุ์เซลล์ที่ใช้ในการจำลองผิวหนังเทียม คือเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์ (human dermal fibroblast cells: HDF) และเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) ที่ผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม โดยการส่งถ่ายลำดับโปรโมเตอร์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนและเมลานิน และยีนสารเรืองแสง *eGFP* ซึ่งจะแสดงออกเมื่อสารสกัดที่ต้องการทดสอบสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างคอลลาเจนและเมลานิน

3. ทำการผลิตต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ จากเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์และเซลล์เคราติโนไซต์ที่ผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม เพื่อให้ได้ผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารเรืองแสงเมื่อได้รับการกระตุ้นให้เกิดการสร้างคอลลาเจน หรือเมลานินในชั้นผิวหนังโดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4. ทดสอบต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น เพื่อดูการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและต้านการเกิดริ้วรอย โดยใช้สารคอร์ไดเซปินเป็นสารออกฤทธิ์ต้นแบบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสงสำหรับทดสอบการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการชะลอวัยและช่วยให้ผิวขาว ที่มีประสิทธิภาพสูงและต้นทุนต่ำ

2. สามารถใช้ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติในการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและต้านการเกิดริ้วรอยได้



บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. โครงสร้างผิวหนังมนุษย์ (Human skin structure)

ผิวหนังถือเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกายมนุษย์ ทำหน้าที่ในการป้องกันร่างกายจากอันตรายอันเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมภายนอก และป้องกันการสูญเสียน้ำสำคัญภายในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการขับเคลื่อนเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ชั้นผิวหนังแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นเอพิเดอมีส (epidermis) ซึ่งเป็นผิวหนังชั้นนอกสุดและมีความแข็งแรงที่สุด เชื่อมต่อกับชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันข้างใต้ที่เรียกว่า ชั้นเดอมีส (dermis) และชั้นผิวหนังชั้นในสุดที่เรียกว่าไฮโปเดอมีส/สับคิวติส (hypodermis/subcutis) ซึ่งเป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบสำคัญ

2.1.1 ผิวหนังชั้นเอพิเดอมีส (epidermis) (Fuchs 2007)

ผิวหนังชั้นเอพิเดอมีส หรือผิวหนังชั้นกำพวด เป็นผิวหนังชั้นนอกสุด ถือเป็นชั้นที่มีความแข็งแรงที่สุดในผิวหนังทั้งสามชั้น เนื่องจากการสะสมสารเคราติน ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันของร่างกาย ต่อปัจจัยทางกล ทางเคมี และทางรังสีจากสภาวะแวดล้อมภายนอก (McGrath, Eady, and Pope 2004) ผิวหนังชั้นนี้เกิดจากการก่อตัวเป็นโครงสร้างของเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) ไม่มีเส้นเลือดแทรกอยู่ภายในชั้น มีความหนาผันแปรไปตามแต่ละบริเวณของร่างกาย ตั้งแต่ 0.1 มิลลิเมตร (ข้อมือ) ไปจนถึง 1 มิลลิเมตร (ฝ่ามือและฝ่าเท้า) และมีความหนาที่คงที่จากการที่มีการแบ่งตัวของเซลล์แม่ในชั้นลึกสุด และผลัดเซลล์ที่ตายแล้วในชั้นบนสุดตลอดเวลา การที่เซลล์แบ่งตัวจากเซลล์แม่จนถึงการถูกผลัดออกที่ชั้นบนสุดเกิดขึ้นในระยะเวลา 30 – 60 วัน (Lawlor and Kaur 2015) ผิวหนังชั้นเอพิเดอมีสยังถูกแบ่งออกเป็น 4 ชั้นย่อยดังต่อไปนี้

ชั้นฐาน หรือ สตราตัม เจมิเนติวัม (basal layer/ stratum germinativum) เป็นชั้นเอพิเดอมีสที่อยู่ลึกสุด เป็นชั้นที่ประกอบไปด้วย เซลล์รูปแท่ง เรียงตัวเป็นเป็นแนวเดียวบน basement membrane และเชื่อมต่อกับผิวหนังชั้นเดอมีส เซลล์ดังกล่าวกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละช่วงเวลา จะมีการเตรียมพร้อมที่จะแบ่งตัวแบบ mitosis เพื่อกลายเป็นเซลล์เคราติโนไซต์รูปแบบต่างๆเพื่อทำหน้าที่ในแต่ละชั้นย่อยของเอพิเดอมีสต่อไป นอกจากนี้ยังมีเซลล์เมลานินไซต์ (melanocyte) แทรกอยู่ระหว่างเซลล์รูปแท่ง ทำหน้าที่ในการผลิตเม็ดสีเมลานิน และ เซลล์เมอร์เคิล (merkel cell) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการระบบประสาทการรับรู้

ชั้นเซลล์รูปหนาม หรือ สตราตัม สปิโนซั่ม (spinous layer/stratum spinosum) เป็นชั้นที่เอพิเดอมีสที่มีความหนาที่สุด ประกอบด้วยเซลล์เคราติโนไซต์ ที่มีพื้นผิวเป็นรูปหนาม และมีการพัฒนา

membrane coating granule ขึ้นภายในเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ผลิต intercellular lipid และเริ่มสะสมสารเคราตินขึ้นภายในเซลล์

ชั้นเซลล์แกรนูลาร์ หรือ สตราตัม แกรนูโลซั่ม (granular cell layer/ stratum granulosum) เป็นชั้นเคราตินโอไซท์ที่มีการพัฒนา keratohyaline granule ขึ้นภายในเซลล์ เพื่อสร้างโปรตีนสำคัญของชนิด คือ โปรฟีลา กริน (profilagrin) และ โลริคริน (loricrin) โปรตีนโครงสร้างที่ทำหน้าที่สำคัญในเอพิเดอมีสชั้นถัดไป

ชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) เป็นเอพิเดอมีสชั้นนอกสุด และมีความแข็งแรงที่สุด ประกอบไปด้วยเซลล์เคราตินโอไซท์ที่ตายแล้ว เรียกว่าคอร์นีโอไซท์ (corneocyte) เรียงตัวเป็นชั้น จำนวน 20 – 30 ชั้น คอร์นีโอไซท์ เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างแบน ไม่มีนิวเคลียส แต่มีการสะสม เส้นสายเคราติน (keratin filament) จำนวนมากภายในเซลล์ ทำให้มีความแข็งแรง เซลล์ในชั้นนี้จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเซลล์ฮอร์นนี่ (horny cell) ที่มีที่มาจากความแข็งแรงประหนึ่งเขาสัตว์ เส้นสายเคราตินดังกล่าวถูกเชื่อให้ติดกันด้วยโปรตีนฟิลากริน ซึ่งผลิตขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในชั้นสตราตัมแกรนูโลซั่ม นอกจากนี้ภายในคอร์นีโอไซท์ยังสะสม สารกักเก็บความชุ่มชื้น (natural moisturizing factors: NMFs) ซึ่งเป็นสารจำพวกกรดอะมิโนและกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปรับสมดุลระหว่างน้ำและไขมันในชั้นผิวหนัง และมี lipid envelope ที่มีโปรตีนลอริคริน ซึ่งสร้างขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในชั้นสตราตัมแกรนูโลซั่มเป็นองค์ประกอบ ช่วยหล่อลื่นและเก็บรักษาสารกักเก็บความชุ่มชื้นดังกล่าวไว้ในเซลล์ ความแข็งแรงของชั้นสตราตัม คอร์เนียม ยังเป็นผลมาจากการเรียงตัวของเซลล์คอร์นีโอไซท์ ในรูปแบบจำลองอิฐและปูน (brick and mortar model) โดยอิฐ หมายถึงเซลล์คอร์นีโอไซท์ที่มีความแข็งแรง ทนทานต่อปัจจัยกล และรังสี และปูน หมายถึง intercellular lipid ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการเลือกผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนัง และยังทำให้ผิวหนังมีความเป็น hydrophobic ป้องกันผลกระทบจากปัจจัยทางเคมี อีกทั้งยังมีโปรตีนโครงสร้างที่เรียกว่า corneodesmosome ช่วยยึดติดเซลล์คอร์นีโอไซท์เข้าด้วยกัน โปรตีนโครงสร้างนี้จะถูกย่อยเมื่อเซลล์เกิดการผลัดเซลล์ผิวหนังขึ้น

2.1.2 ผิวหนังชั้นเดอมีส (Lawlor and Kaur 2015; McGrath et al. 2004)

ผิวหนังชั้นเดอมีสหรือชั้นหนังแท้ เป็นผิวหนังชั้นที่อยู่ใต้ชั้นเอพิเดอมีส มีความหนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร บริเวณที่ผิวหนังชั้นเดอมีสเชื่อมต่อกับเอพิเดอมีส มีลักษณะรอยหยักคล้ายลูกคลื่น เพื่อเพิ่มการยึดติดกันให้แน่นหนา และเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัส เพื่อให้เส้นเลือดในจากผิวหนังชั้นเดอมีสขึ้นไปหล่อเลี้ยงผิวหนังชั้นเอพิเดอมีสได้มากขึ้น การมีรอยหยักระหว่างชั้นผิวหนังทั้งสองเรียกว่า rete ridges ผิวหนังชั้นเดอมีส ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ระบบเส้นเลือด (vascular network) และเส้นประสาท (nerve) เซลล์เฉพาะที่อยู่ในชั้นเดอมีสคือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ทำหน้าที่ในการ

ผลิตคอลลาเจนและ อีลาสตินซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นอกจากนี้ยังมีเซลล์ชนิดอื่น เช่นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์ของระบบเลือด (blood-borne cells) แทรกอยู่เป็นระยะ ผิวหนังชั้นเดอมีส ช่วยให้ผิวหนังโดยรวมมีความยืดหยุ่น (elasticity) ทนทานต่อแรงยืดผิวหนัง (Tensile strength) และมีส่วนในการป้องกันร่างกายแรงกล (mechanical injury) และช่วยในการซึมซับน้ำไว้โดยกรดไฮยาโลโรนิก เพื่อจุดประสงค์ในการควบคุมสมดุล

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิวหนังชั้นเดอมีสมีองค์ประกอบหลัก คือคอลลาเจนและอีลาสติน อยู่ใน matrix ที่เป็น glycoprotein proteoglycans และ glycoaminoglycans ซึ่งผิวหนังชั้นเดอมีสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชั้น ตามความแตกต่างของการจัดเรียงโครงสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ความหนาแน่นของเซลล์ และรูปแบบการแทรกอยู่ของเส้นเลือดและเส้นประสาท ดังต่อไปนี้

ชั้นพาพิลารี เดอมีส (Papillary dermis) เป็นชั้นที่อยู่ติดกับเอพิเดอมีส ประกอบด้วยคอลลาเจนขนาดเล็ก และเป็นชนิดที่ 3 มากกว่า ชนิดที่ 1 และ เส้นใยอีลาสติก ที่เรียงตัวตั้งฉากกับชั้นเอพิเดอมีส ในชั้นนี้มีเซลล์ ไฟโบรบลาสต์อยู่เป็นจำนวนมาก และมีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เพื่อประโยชน์ในการซ่อมแซมผิวหนัง (wound healing) โดยปกติชั้นนี้จะเกิดโรคน้อยกว่าชั้นเรติคูลาร์ เดอมีส

ชั้นเรติคูลาร์เดอมีส เป็นชั้นที่อยู่ใต้ชั้นพาพิลารีเดอมีส และเชื่อมต่อกับผิวหนังชั้นไฮโปเดอมีส ประกอบด้วยคอลลาเจนที่มีขนาดใหญ่ และเป็นชนิดที่ 1 มากกว่า ชนิดที่ 3 มีเส้นใยอีลาสติกที่เจริญเต็มที่ (mature elastic fiber) และคอลลาเจน และจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ เมื่อลึกลงไปในชั้นเดอมีส ในชั้นนี้จะมีเส้นเลือดแทรกอยู่น้อยกว่าชั้นพาพิลารี เดอมีส

2.1.3 ผิวหนังชั้นไฮโปเดอมีส (hypodermis) (Brohem et al. 2011)

เป็นผิวหนังชั้นในสุด ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดโปร่งบาง (loose connective tissue) ต่อมเหงื่อ คอลลาเจน และอีลาสติน ที่ต่อเนื่องลงมาจากผิวหนังชั้นเดอมีส นอกจากนี้ยังมี เซลล์ไขมัน หรือ อะดิโพไซต์เป็นองค์ประกอบหลักของผิวหนังชั้นนี้ ความหนาของชั้นไฮโปเดอมีสจะแปรผันไปตามแต่ละบริเวณในร่างกาย

ผิวหนังชั้นไฮโปเดอมีส ทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของอุณหภูมิในร่างกาย เป็นแหล่งสะสมไขมันเพื่อจะถูกใช้ป็นแหล่งพลังงานสำรอง เป็นเสมือนหมอนรองกระดูก และทำให้ผิวหนังเคลื่อนไหวได้ ไม่ติดแน่นกับโครงสร้างข้างใต้ผิวหนัง อย่างไรก็ตาม ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมุ่งเน้นที่จะศึกษาชั้นผิวหนังเพียงสองชั้น คือ ผิวหนังชั้นเอพิเดอมีส และ ผิวหนังชั้นเดอมีส

ด้วยคุณสมบัติต่างๆของชั้นผิวที่มีความซับซ้อนทำให้ยากต่อการศึกษาในเชิงลึกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการต่างๆของเซลล์ภายใต้ชั้นผิว อาทิเช่นการแก่ของเซลล์ การเกิดริ้วรอย และ

การสร้างเม็ดสีผิว ซึ่งการทราบถึงกระบวนการทำงานของเซลล์ในชั้นผิวหนังนั้นสำคัญต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์หรือทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ส่งผลต่อการชะลอวัย การเปลี่ยนแปลงการสร้างเม็ดสี และการต้านริ้วรอยของผิว การจะทราบถึงการทำงานในเชิงลึกได้นั้นจำเป็นต้องจำลองชั้นผิวชั้นต่างๆเพื่อศึกษากระบวนการทำงานของเซลล์ขึ้นให้ใกล้เคียงกับสภาพจริงที่สุด โดยได้นำความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติด้วย

2.2 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการนำความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมต่อการพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติ

การชะลอวัยของผิว (skin aging) คือหนึ่งในหลายๆงานวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากผิวของมนุษย์จะมีการเปลี่ยนแปลงรุนแรงเพิ่มมากขึ้นอันมีผลมาจากความชราตามธรรมชาติซึ่งนอกจากความชราตามธรรมชาติแล้ว ผิวของมนุษย์ยังได้รับความเสียหายจากปัจจัยอื่นๆ เช่นการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) จากแสงแดดอย่างต่อเนื่อง รวมถึงสารเคมีและฝุ่นละอองจากสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Duell, Fisher, & Kang, 1997; Fisher et al., 1996; Gilchrest & Yaar, 1992)

CCN1 หรือที่เรียกว่า CYR61 (Cysteine-rich protein 61) ซึ่งมีการแสดงออกในผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) ของมนุษย์ โดย CCN1 จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในผิวที่มีอายุมากตามธรรมชาติ ภาวะแก่แดด (dermatoheliosis) และได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตจากแสงแดด (Quan et al., 2006) CCN1 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสารเคลือบเซลล์ (extracellular matrix) ที่หลั่งออกมาซึ่งเป็นของตระกูลยีน CCN (Lau & Lam, 1999) โปรตีน CCN1 มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโต ความแตกต่างการเกิด angiogenesis การย้ายถิ่น และการควบคุมสารเคลือบเซลล์ (Chen, Mo, & Lau, 2001; Kireeva, Mo, Yang, & Lau, 1996; Bernard Perbal, 2004; B Perbal, Brigstock, & Lau, 2003)

ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์การเพิ่มขึ้นของ CCN1 จะช่วยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน MMP-1 และลดการแสดงออกของโปรตีน procollagen type-1 (Ramnath & Creaven, 2004) การรักษาสมดุลของคอลลาเจนที่ผิดปกติด้วยการนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาผ่านรังสี UV เพื่อขัดขวาง CCN1(Quan et al., 2010) การกระจายตัวของคอลลาเจนและการยับยั้งการผลิตคอลลาเจนทำให้โครงสร้างของผิวหนังเกิดความเสียหายและเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดริ้วรอยก่อนวัยของผิว (Campisi, 2008; Fisher, Varani, & Voorhees, 2008; Varani et al., 2000) มีการนำกรด Retinoic มาใช้ในการป้องกันและซ่อมแซมผิวที่มีอายุมากแล้วและลดการแสดงออกของ CCN1 ในผิว (Orfanos, Zouboulis, Almond-Roesler, & Geilen, 1997; Quan et al., 2011)

สำหรับกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เกิดขึ้นจากการที่ผิวหนังได้รับการกระตุ้นจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต แล้วตอบสนองโดยการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยเซลล์เมลานোসิตในผิวหนังชั้นเอพิเดอมิส เพื่อช่วยในการป้องกันอันตรายจากรังสี และมีส่วนช่วยในการควบคุมอุณหภูมิในผิวหนัง (Lin and Fisher 2007) แต่ผลที่ตามมาคือเม็ดสีที่ผลิตขึ้น ทำให้สีโดยรวมของผิวหนังบริเวณที่ได้รับการกระตุ้นมีสีเข้มขึ้น

กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เกิดจากการแสดงออกพร้อมกันของยีนจำนวนหนึ่ง ได้แก่ *MITF* ยีนสำหรับสังเคราะห์ *microphthalmia transcription factor* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ เอนไซม์และ differentiation factor หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสี (Levy, Khaled, and Fisher 2006) ยีน *TYR* ยีนสำหรับสังเคราะห์เอนไซม์ Tyrosinase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซีนให้กลายเป็น สารตัวกลาง (intermediates) ในวัฏจักรการสังเคราะห์เมลานิน (Hopkin et al. 2016) และยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน เช่น *TYRP1* (Box et al. 1998), และ *DCT* (Hopkin et al. 2016; Lin and Fisher 2007) การแสดงออกของยีนข้างต้นอยู่ในการควบคุมของ promoter ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก รวมถึงรังสีอัลตราไวโอเล็ต เช่น *MITF promoter* และ Tyrosine promoter (Lin and Fisher 2007)

การตรวจคัดกรองข้อมูลที่มีประสิทธิภาพสูง (HTS) โดยใช้เซลล์ที่เสถียรซึ่งมียีนสารเรืองแสงเช่น green fluorescence protein (GFP) ซึ่งมีสีเขียวช่วยในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจ (Fisher et al., 2000) *CCN1 promoter luciferase assay* ใช้สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของ *CCN1 promoter* (Quan et al., 2010) และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของ *MITF promoter* และ Tyrosine promoter ได้เช่นกัน

2.3 ผิวหนังเทียม (artificial skin)

โดยทั่วไป การศึกษาปัจจัยทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีววิทยาของเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ (in vitro study) จะเป็นการศึกษาในเซลล์ผิวหนังในรูปแบบจำเพาะต่อชนิดของเซลล์ เซลล์ผิวหนังที่ใช้ในการศึกษาจะถูกเลี้ยงและเจริญแบบสองมิติ (2 dimensional monoculture) ซึ่งการศึกษาในรูปแบบดังกล่าวอาจไม่เพียงพอ หากต้องการศึกษาปัจจัยต่างๆได้อย่างถ่องแท้ เนื่องด้วยข้อจำกัดหลายประการ คือ เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในรูปแบบจำเพาะต่อชนิดของเซลล์และเจริญแบบสองมิติ อาจมีพฤติกรรมและการแสดงออกผิดเพี้ยนไปจากเซลล์ในสภาวะธรรมชาติ (Sun et al. 2006) ที่เซลล์จะเจริญแบบสามมิติ และมีการปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ชนิดอื่นๆ

เพื่อให้การศึกษาเซลล์ผิวหนังในห้องปฏิบัติการ ให้ผลที่ใกล้เคียงกับเซลล์ในธรรมชาติมากที่สุด จึงมีการใช้ผิวหนังของสัตว์ทดลอง เช่น หนู หรือกระต่าย เข้ามาใช้ในการศึกษา อย่างก็ตาม โครงสร้าง

ผิวหนังสัตว์ทดลองมีความแตกต่างกับโครงสร้างผิวหนังมนุษย์ ทั้งในด้านสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยา ผลการศึกษาที่ได้จากการใช้สัตว์ทดลองจึงไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในมนุษย์ได้ทั้งหมด (Mertsching et al. 2008) ล่าสุดจึงได้มีการศึกษาและพัฒนาผิวหนังเทียมแบบสามมิติ (3 dimensional artificial skin) ขึ้นเพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการศึกษาเซลล์ผิวหนังในรูปแบบสองมิติ และ การศึกษาในสัตว์ทดลองโดยผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ถูกพัฒนาขึ้น มีทั้งผิวหนังเทียมที่จำลองชั้นเอพิเดอมิสเพียงชั้นเดียว และผิวหนังเทียมที่จำลองชั้นเอพิเดอมิสและชั้นเดอมิส ในการพัฒนาผิวหนังเทียมมีความซับซ้อนมากกว่าการที่นำเซลล์ผิวหนังที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในชั้นผิวหนังต่างๆมาเลี้ยงต่อกันเป็นชั้นเท่านั้น (Brohem et al. 2011) หากแต่มีองค์ประกอบที่สำคัญที่ต้องคำนึงถึงดังนี้

2.3.1 เมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix: ECM)

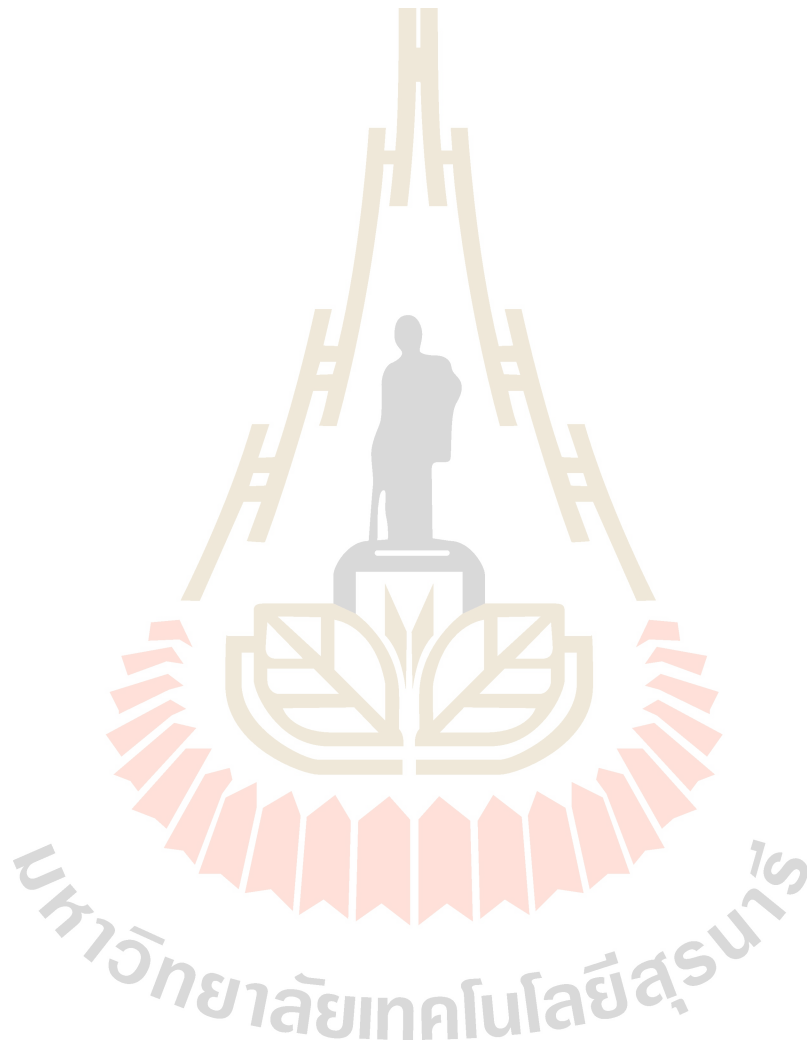
เมทริกซ์ภายนอกเซลล์ เป็นของเหลวคล้ายเจล (gel-like medium) ที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในผิวหนังชั้นเดอมิส ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ผิวมีความยืดหยุ่นและทนต่อแรงยึดเนื่องจากมีคอลลาเจน และอีลาสตินเป็นส่วนประกอบหลัก นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการจับกับโกรทแฟกเตอร์ (growth factor) เอนไซม์ และการแพร่ผ่านต่างๆที่มีบทบาทสำคัญต่อการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ ในการศึกษาเพื่อพัฒนาผิวหนังเทียม การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อให้สังเคราะห์เมทริกซ์ภายนอกเซลล์เพียงทางเดียว อาจไม่เพียงพอต่อการจำลองสภาวะของผิวหนังชั้นเดอมิส เนื่องจากใช้เวลานานและการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เมทริกซ์ภายนอกเซลล์เป็นเวลานานนั้นทำได้ยาก จึงต้องมีการเพิ่มเติมสารจำพวกคอลลาเจน ชนิดต่างๆเข้าไปในสภาวะการเพาะเลี้ยง เพื่อย่นระยะเวลาการจำลองชั้นผิวหนังด้วย

2.3.2 โกรทแฟกเตอร์ (growth factor)

ในการพัฒนาผิวหนังเทียมแบบสามมิติ การเพิ่มเติมโกรทแฟกเตอร์บางชนิดเข้าไปในสภาวะเพาะเลี้ยง สามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์และช่วยให้เซลล์จัดเรียงโครงสร้างไปในทิศทางที่ถูกต้อง รวมถึงช่วยในการสร้างชั้น basement membrane ซึ่งคั่นระหว่างชั้นเอพิเดอมิสและเดอมิส โกรทแฟกเตอร์ดังกล่าวได้แก่ basic fibroblast growth factor (bFGF) ,keratinocyte growth factor (KGF),insulin-like growth factor (IGF) และ stem cell factor (SCF)

การพัฒนาผิวหนังเทียมแบบสามมิติ มีขั้นตอนทำได้โดยสังเขป คือ ทำการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในจำนวนเซลล์ที่เหมาะสม ในอาหารเจลที่มีองค์ประกอบของคอลลาเจน เพื่อทำการจำลองผิวหนังชั้นเดอมิส และเพื่อใช้เป็นฐานของผิวหนังเทียม จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์เคราติโนไซต์ และบางครั้งร่วมกับเมลานินไซต์หากต้องการผิวหนังเทียมที่สามารถสร้างเม็ดสี ในอาหารจำเพาะที่มีการเพิ่มเติมโกรทแฟกเตอร์ต่างๆ เพื่อกระตุ้นให้เคราติโนไซต์มีการเรียงตัวและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อจำลองผิวหนังชั้นเอพิ

เดอมิสชั้นต่างๆ (Li et al. 2011) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงใช้เทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากธรรมชาติอย่างมีประสิทธิภาพและต้นทุนต่ำ และทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและต้านการเกิดริ้วรอยโดยใช้ ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ Humam Dermal Fibroblast cells (HDF) และ Keratinocyte ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco's Modified Eagle's medium high glucose (DMEM)) ที่เติม 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% L-Glutamin Solution, 1%MAM Non-Essential Amino Acids Solution และ 1% Peniciline and streptomycin

3.2 การถ่ายโอนพลาสมิดในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกถ่ายโอนพลาสมิด hTERT (pBABE-neo-hTERT; Addgene) และ SV40 (pBABE-neo largeTcDNA; Addgene) เซลล์เหล่านี้ถูกเพาะบนจาน 6 หลุมที่มีความหนาแน่น 2.0×10^5 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นถึง 70% ทำการเลี้ยงด้วยน้ำยาริเอเจนต์ที่มีพลาสมิดและไลโปเฟคตามีน 2000 และบ่มเพลตที่อุณหภูมิ 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (13) หลังจาก 48 ชั่วโมง ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทรานส์เฟกได้รับการคัดเลือกยาปฏิชีวนะด้วยนีโอมัยซินหรือยีนโดยการเพิ่ม G418 ซัลเฟต (Invitrogen) 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากซีรัม เซลล์ที่มีความต้านทาน G418 ถูกแยกออกและเพาะเลี้ยงย่อยเพื่อการขยายตัว

3.3 . ทดสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี RT-PCR

เลี้ยงเซลล์ PBMC ปริมาณ 100,000 cells/well ลงใน 6 well/plate ที่มีอาหาร DMEM 90 %, FBS 10%, Antibiotic 1% บ่ม 24 ชั่วโมง ในตู้ CO_2 incubator ที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C จากนั้นทำการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsinization) และปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นระยะเวลา 3 นาที ทำการแตกเซลล์และสกัด RNA ด้วยชุด NucleoSpin® RNA Plus kit และทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ต้นแบบ ด้วยชุด ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ทำการตรวจการแสดงออกของยีน (Gene expression) ด้วยไพรเมอร์ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) และทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจาก DNA ต้นแบบ ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction หรือ PCR ตรวจวิเคราะห์ผล PCR product โดยการผสมด้วย 6x loading dye แล้วนำไปแยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส gel electrophoresis ใน 1.5% Agarose gel ที่กระแสไฟฟ้า 100 V เป็นระยะเวลา 30 นาที เมื่อครบระยะเวลาแล้วนำเจลไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV)

และทำการถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel Doc ทาการวัดความเข้มของแบนแถบ DNA ด้วยโปรแกรมประมวลผลภาพ ImageJ หลังจากนั้นทาการสร้างกราฟและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS

3.4 การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค immunofluorescence staining

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายลงบนกระจกปิดสไลด์ (coverslip) ที่เคลือบด้วย Geltrex®, Gibco อยู่ใน 24-well plate ด้วยความหนาแน่น 30,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยสารสกัดจากกัญชา ทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง และตรึงเซลล์โดยเติม 4% paraformaldehyde บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง จะเติมสารละลาย 0.1% Triton X 100 และบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากครบเวลา 1 ชั่วโมง ทำการบ่มเซลล์ primary antibody ที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาท เช่น Tuj และ TH (Tyrosine Hydroxylase) และ primary antibody ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิด เช่น CD105 และ CD 73 ที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการล้าง primary antibody ที่เหลือออกด้วย 1X PBS ประมาณ 3-5 รอบแล้วบ่มกับ secondary antibody เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด สุดท้ายย้อมนิวเคลียสเซลล์ด้วย DAPI แล้วตรวจดูการแสดงออกของโปรตีนบนแผ่นสไลด์ภายใต้กล้อง fluorescent microscope แล้วย้อมด้วยสี DAPI จากนั้นตรวจดูรูปร่างลักษณะของนิวเคลียสบนแผ่นสไลด์ภายใต้กล้องคอนโฟคอล

3.5 ทดสอบ Tumor Formation

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในอาหาร DMEM supplemented 10% FBS, 1% penicillin และ 1% NEA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ จากนั้นเตรียม bottom gel 1% agarose gel ด้วย 2X DMEM ที่มี 20% FBS, 1% l-glutamine, 1% penicillin และ 1% NEA ผสม agarose gel 1% และใส่ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 35 มม. ฐานด้านบน (top gel) ถูกเตรียมด้วย agarose gel 0.3% ผสมกับ 2X DMEM seed cell จำนวน 5000 เซลล์/จาน และผสมในสูตร 2X DMEM เซลล์ถูกย้ายมาบนฐานที่บ่ม 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 10-30 วัน ในช่วง 10-30 วัน จะทาการ seed cell เข้าเฉพาะด้านบนทุกๆ 5 วัน หลังจากผ่านไป 15-30 วัน นำฐานมาย้อมด้วยคริสตัลไวโอเล็ต 0.005% เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และนับการก่อตัวของโคโลนีโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

3.6 การออกแบบโปรโมเตอร์และสร้างเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ยีนสร้างคอลลาเจนและยีนการสร้างเม็ดสีผิวมนุษย์

ทำการพัฒนาสายพันธุ์เซลล์ที่ใช้ในการจำลองผิวหนังเทียม คือเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์ (human dermal fibroblast cells: HDF) และเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) ที่ผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม โดยการส่งถ่ายลำดับโปรโมเตอร์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนและเมลานิน และยีนสารเรืองแสง eGFP ซึ่งจะแสดงออกเมื่อสารสกัดที่ต้องการทดสอบสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างคอลลาเจนและเมลานิน

ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pOBCol3.6-GFPtpz (Addgene #110211) ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น 3.6 kb rat type 1 collagen + first intron เข้าสู่เซลล์ HDF และ pEGFP-TYR (Addgene #32781) ที่มี Gene/Insert เป็น Tyrosinase เข้าสู่เซลล์ Keratinocyte โดยใช้ไลโปแฟคตามีน (lipofectamine) สำหรับการถ่ายโอน ในอัตราส่วนพลาสมิด 500 นาโนกรัม ต่อไลโปแฟคตามีน 7 ไมโครลิตร ในภาชนะอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 9.5 ตารางเซนติเมตร หรือ 1 ช่องของเพลทขนาด 6 หลุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 5% คาร์บอนไดออกไซด์จากนั้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเลี้ยงต่อในสภาวะดังกล่าวจนเซลล์โตเต็มเพลท (100% confluent) จึงทำการคัดเลือกเซลล์ (cell selection) โดยการเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Green Fluorescence Proteins GFP ภายใต้การส่อง fluorescence microscope และทำการคัดเลือกเซลล์ด้วย drug selection sulfate G418 sulfate 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% MEM non-essential amino acid และ 1% L-glutamine ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนเซลล์โตเต็มเพลท และทำการย้ายภาชนะ (sub-culture) ซึ่งจะได้เป็น passage 1 หลังจากการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

3.7 การเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ

- การสร้างชั้นคอลลาเจน

ผสม 10X EMEM 0.59 มิลลิลิตร, 200mM L-glutamine 50 ไมโครลิตร, FBS 0.6 มิลลิลิตร 7.5% Sodium bicarbonate 120 ไมโครลิตร และ bovine collagen I 4.6 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ในน้ำแข็ง จากนั้น ดูด collagen mixture ไปใส่ใน หลุมเมมเบรนด้านใน ของ 6 Transwell plate หลุมละ 1 มิลลิลิตร บ่ม ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C collagen mixture จะแข็งตัว และเปลี่ยนเป็นสีชมพู บน membrane ของ Transwell

- การสร้างชั้น Dermis

ผสม 10X EMEM 1.65 มิลลิลิตร, 200mM L-glutamine 150 ไมโครลิตร, FBS 1.85 มิลลิลิตร 7.5% Sodium bicarbonate 350 ไมโครลิตร, bovine collagen I 14 มิลลิลิตร และ Human dermal fibroblast (HDF) cell suspension (1.5 ml เข้าด้วยกันใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ในน้ำแข็งจากนั้น ดูด HDF mixture ไปใส่ใน ใน หลุมเมมเบรนด้านใน ของ 6 Transwell plate ที่มีชั้น collagen อยู่แล้ว หลุมละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหาร 10% FBS DMEM ลงไปในหลุมเมมเบรน 2 มิลลิลิตร และ หลุมภายนอก 4 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่ 37 °C 5% CO₂ แล้วดูดอาหารเก่าทิ้ง แล้วเติม HBSS + 1% dialyzed FBS ลงไปในหลุมเมมเบรน 2 มิลลิลิตร และ หลุมภายนอก 4 มิลลิลิตร บ่มอีก 1 ชั่วโมง ที่ 37°C 5% CO₂

- การสร้างชั้น Epidermis

ทำการเตรียม Basic medium (490 mL keratinocyte serum-free medium 490 มิลลิลิตร, bovine pituitary extract 1.8 มิลลิลิตร, dialyzed fetal bovine serum 10 มิลลิลิตร, SCF solution 500 ไมโครลิตร, bFGF solution 562.5 ไมโครลิตร และ ET-3 solution 500 ไมโครลิตร) ปริมาตรสุทธิ 500 มิลลิลิตร เพื่อใช้ เตรียม Skin reconstruct medium I (Basic medium 100 มิลลิลิตร และ EGF solution 10 ไมโครลิตร) Skin reconstruct medium II (Basic medium 100 มิลลิลิตร และ EGF solution 2 ไมโครลิตร) และ Skin reconstruct medium III (Basic medium 100 มิลลิลิตร และ 1M CaCl₂ 720 ไมโครลิตร)

จากนั้นทำการ Trypsinization keratinocyte cells และ resuspension ด้วย Skin reconstruct medium I ปรับความเข้มข้นเป็น 4.17×10^6 เซลล์ / 600 ไมโครลิตร จากนั้นการดูดอาหารเก่าออกจาก Transwell plate ที่มีการเพาะเลี้ยงชั้น dermis เติม Skin reconstruct medium I ลงไปในหลุมเมมเบรน 1.5 มิลลิลิตร และ หลุมภายนอก 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำ keratinocyte cell suspension ที่เตรียมไว้เติมลงไป ในหลุมเมมเบรน หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 2 วัน ที่ 37 °C 5% CO₂ จากนั้นดูดอาหารเก่าออกอีกครั้ง แล้วเติม Skin reconstruct medium II ลงไปในหลุมเมมเบรน 2 มิลลิลิตร และ หลุมภายนอก 10 มิลลิลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 2 วัน ที่ 37 °C 5% CO₂ จากนั้นดูดอาหารเก่าออก แล้วเติม Skin reconstruct medium III เฉพาะในหลุมภายนอก 4 มิลลิลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 18 วัน ที่ 37 °C 5% CO₂ ทำการเปลี่ยนอาหาร Skin reconstruct medium III ทุกวัน

3.8 การตรวจสอบต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสงภายใต้การส่อง fluorescence microscope

การเตรียมผิวหนังเทียมแบบสามมิติสำหรับตัดด้วยเครื่อง Cryostat microtome

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมครบระยะเวลาที่กำหนด ดูดอาหารออกจากหลุม ภายในและนอก แล้วใช้คีมคีบส่วน inserts ออกจากหลุมแล้วทำการตัดผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่อยู่บน membrane ของ Transwell ด้วยใบมีดออกมาพร้อมแผ่น polycarbonate filter จากนั้นทำการตัดเป็นชิ้น เล็กๆขนาด กว้าง 5 มม. นำผิวหนังเทียมแบบสามมิติ ที่ได้แช่ใน 50% sucrose ที่ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนไปแช่ในสารละลาย sucrose เข้มข้น 2 โมลาร์ ที่ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำผิวหนัง เทียมแบบสามมิติแช่ในน้ำยา OCT โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิต่ำ -70 °C เพื่อให้ น้ำยา OCT ก่อนนำไปตัดด้วยเครื่อง Cryostat microtome ที่ความหนาของชิ้นผิวหนังเทียมแบบสามมิติ 20 μ M จากนั้นเติม DAPI เพื่อย้อมนิวเคลียสของเซลล์ ก่อนนำไปส่องใต้กล้อง fluorescence microscope

3.9 การตรวจสอบโครงสร้างต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติด้วยการย้อม สีมาทอกซีไฮลีนและ อีโอซิน (H&E)

นำตัวอย่างสไลด์ผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ได้จากการตัดด้วยเครื่อง Cryostat microtome มาแช่ ในน้ำยาคงสภาพบัฟเฟอร์ ฟอรัมาลีน 1 นาที จากนั้นแช่สไลด์ ในน้ำกลั่น 3 นาที แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกซี ไฮลีน 3 นาที ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 3 นาที จากนั้นย้อมด้วยสีอีโอซิน 10 วินาที จากนั้นจุ่มล้างสีส่วนเกิน ในแอลกอฮอล์ 95% และแอลกอฮอล์ 100% แล้วปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วเมทาไนไฮลีนและปิดทับ ด้วยกระจกสไลด์ แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์

3.10 การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารคอร์ติโคสเตียรอยด์ต่อการชะลอวัยและการช่วยให้ผิวขาวด้วย ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสง

ทำการหยดสารละลายคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ลงบนต้นแบบผิวหนังเทียม แบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสง บ่มที่ 37 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ ตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียวที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับผิวหนังเทียมที่ได้รับการหยดอาหารเลี้ยง เซลล์ปกติ (negative control)



บทที่ 4

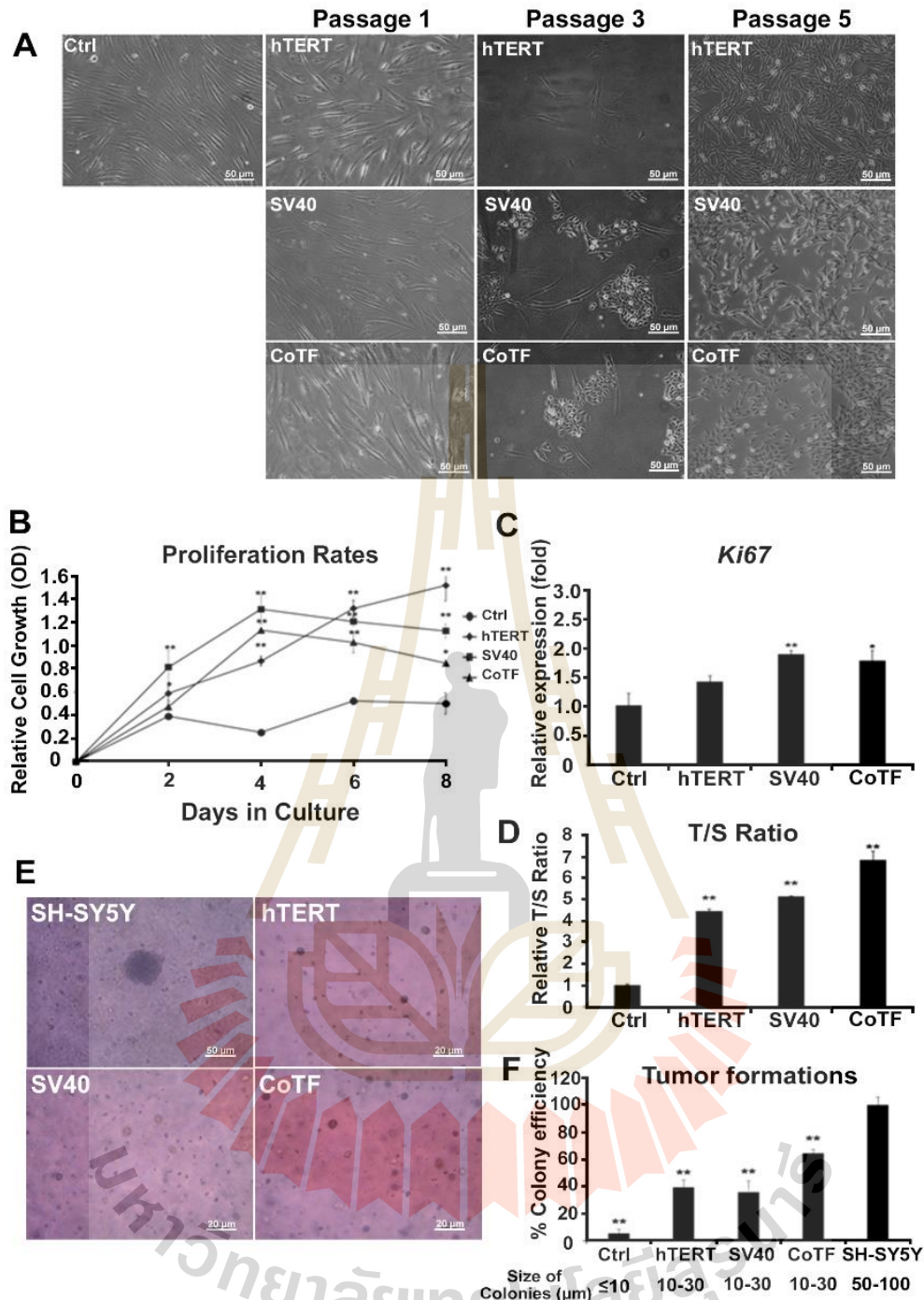
ผลการวิจัย

4.1 ผลการแสดงผลของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกทำให้เป็นอมตะโดยการถ่ายโอนพลาสมิดเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และความยาวของเทโลเมียร์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (HDF cells) ถูกเพิ่มประสิทธิภาพการแบ่งตัวของเซลล์ทำให้เป็นอมตะ (immortal) โดยการถ่ายโอนพลาสมิดของ hTERT และ SV40 (hTERT and SV40 transfections) รวมไปถึงการถ่ายโอนร่วมของพลาสมิดทั้งสอง (CoTF, Co-transfection) เซลล์สามารถเพาะเลี้ยงได้มากกว่า 60 passage หลังจากการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และทำการวัดขนาดเซลล์พบว่า ในกลุ่มที่ไม่ได้มีการถ่ายโอน (control) เซลล์มีขนาดประมาณ 100–150 ไมโครเมตร ในขณะที่เซลล์ที่ถูกถ่ายโอนทั้งหมดมีลักษณะเล็กลงใน passage 5 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1A) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนได้ทำการวิเคราะห์ MTT เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการแสดงออกของยีน Ki67 พบว่ากลุ่มของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนทั้งหมดสามารถเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ ในวันที่ 2 และ 4 ในขณะที่วันที่ 6 และ 8 (รูปที่ 1B) มีการแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกถ่ายโอนด้วย hTERT เพิ่มขึ้นมากที่สุด จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด hTERT และ SV40 สามารถเพิ่มจำนวนการแบ่งตัวของเซลล์ได้ โดยการแสดงออกของยีน Ki67 ถูกใช้เพื่อตรวจสอบความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ การทำงานของโปรตีน Ki67 ที่สะสมบริเวณนิวเคลียสของเซลล์และมีการแสดงออกมากในเซลล์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีการแบ่งตัวทั้งหมด โดยถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในฐานะตัวบ่งชี้การเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอก (17) Ki67 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ถูกถ่ายโอนด้วย SV40 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 1C) การแสดงออกที่สูงของยีน Ki67 ในเซลล์กลุ่มที่ถูกถ่ายโอนด้วย SV40 และ CoTF บ่งชี้ถึงหน้าที่สำคัญของ SV40 ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังของมนุษย์ ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มจำนวนเซลล์และการหดสั้นลงของเทโลเมียร์สามารถวิเคราะห์ถึงอัตราส่วนของ T/S (T/S ratio) ซึ่งวัดเป็นความยาวเทโลเมียร์ที่สัมพันธ์กับ DNA อ้างอิงมาตรฐาน (18) ความยาวสัมพันธ์ของยีนเทโลเมียร์เทียบกับยีนอ้างอิง (T/S ratio) ของ hTERT, SV40 และ CoTF มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1D) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ hTERT และ SV40 สามารถยืดและรักษาความยาวของเทโลเมียร์ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ ความสามารถพิเศษของเซลล์มะเร็งที่ถูกแปลงสภาพให้สามารถเติบโตได้อย่างอิสระ เป็นจุดเด่นของการก่อมะเร็ง ดังนั้นการทดสอบการสร้างโคโลนีของเซลล์ในวันอ่อนจึงถูกนำมาใช้เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูก

ถ่ายโอน (19) โอกาสในการกลายเป็นเซลล์มะเร็งของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่ถูกถ่ายโอน ถูกเปรียบเทียบกับ เซลล์นิวโรบลาสโตมาของมนุษย์ (SH-SY5Y) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของเซลล์มะเร็งประสาทที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม เชิงบวก (รูปที่ 1E, F) จากนั้นได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y เป็นเวลานานกว่า 20 วัน มีการสร้าง โคโลนีขนาดประมาณ 60-100 ไมโครเมตร ในขณะที่เซลล์ไฟโบร بلاสต์ในกลุ่มควบคุมสร้างโคโลนีที่มีเส้น ผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร และพบว่าเซลล์ที่ถูกถ่ายโอนทั้งหมดปรากฏเป็นโคโลนีที่มีเส้นผ่าน ศูนย์กลางประมาณ 10-20 ไมโครเมตร และประสิทธิภาพการสร้างโคโลนีของเซลล์กลุ่มนี้น้อยกว่าเซลล์ SH-SY5Y อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการสร้างโคโลนีของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่ถูกถ่าย โอนนั้นสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่ถูกถ่ายโอนมี ความสามารถในการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเข้าสู่สภาวะอมตะอย่างเห็นได้ชัด



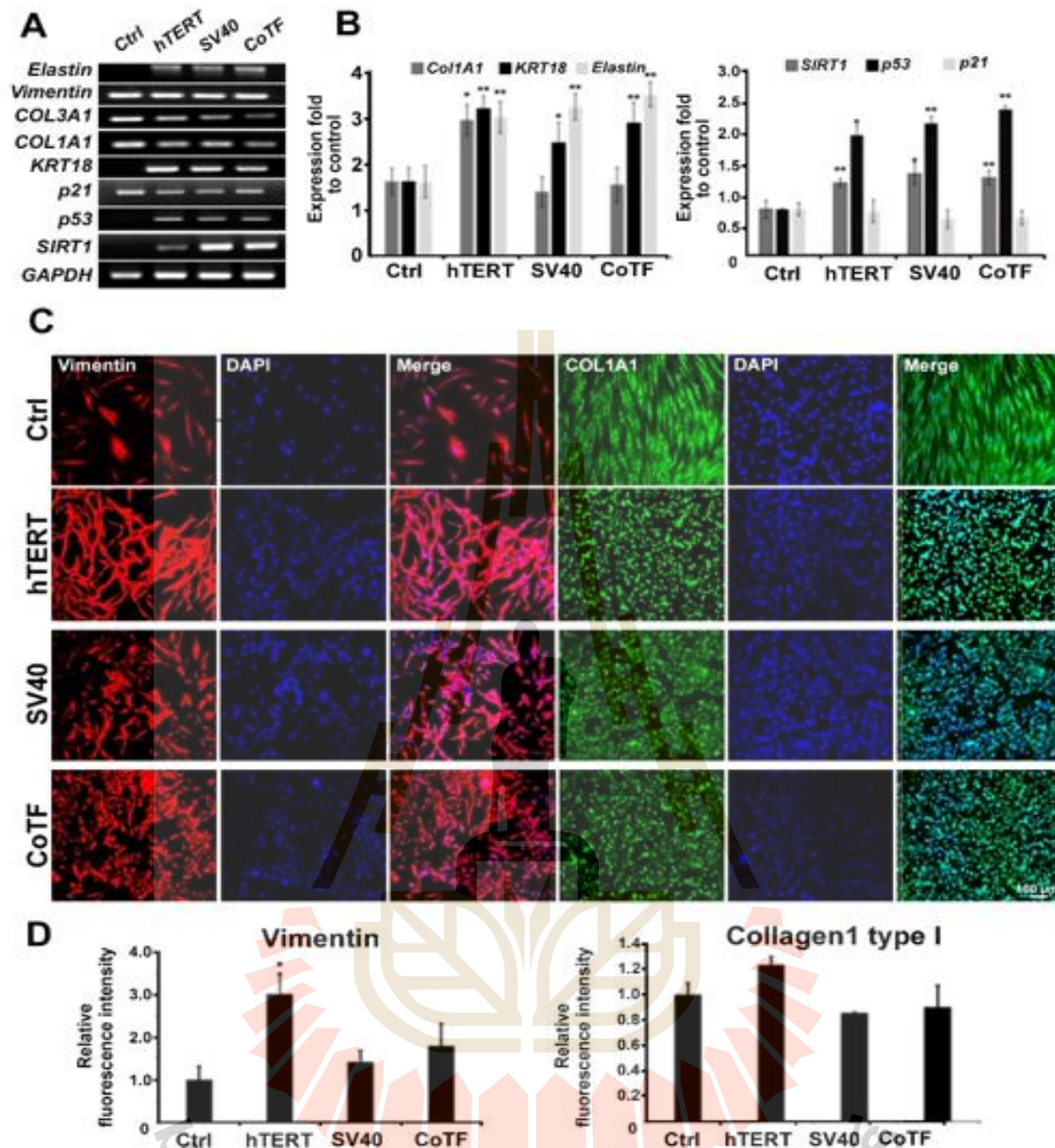


ภาพที่ 4.1 (A) ภาพแสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (กลุ่มควบคุม), และกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด hTERT, SV40 (CoTF) passages 1, 3 และ 5. (B) ความสัมพันธ์ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนในวันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 ถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3) *p < 0.05 และ **p < 0.01 เทียบกับเซลล์ควบคุม (C) การแสดงออกของ Ki67 โดยวิธี qPCR เปรียบเทียบกับยีน β -Actin ค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3) *p < 0.05 และ **p < 0.01 เทียบกับเซลล์

ควบคุม (D) อัตราส่วนสัมพัทธ์ของเทโลเมียร์เทียบกับยีน 36B4 (อัตราส่วน T/S) โดย qPCR แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ($n = 3$) $**p < 0.01$ เทียบกับเซลล์ควบคุม (E) สันฐานวิทยาของการก่อเนื้องอกของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนโดยใช้เซลล์นิวโรบลาสโตมา (SH-SY5Y cells) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (F) เปอร์เซ็นต์ของการก่อเนื้องอกและขนาดเฉลี่ยของเนื้องอก แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ($n = 3$) $*p < 0.05$ และ $**p < 0.01$ เทียบกับเซลล์ SH-SY5Y

4.2 ผลการตรวจสอบลักษณะทั่วไปของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด

การแสดงออกของยีนและโปรตีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์กลุ่มควบคุม และกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด ได้รับการประเมินโดย RT-PCR และ immunofluorescence ตามลำดับ ตัวบ่งชี้ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่สำคัญ ได้แก่ ELASTIN, Vimentin, COL3A1, COL1A1 และ KRT18 (20) การแสดงออกของ Vimentin, COL3A1 และ COL1A1 อยู่ในระดับใกล้เคียงกันในกลุ่มควบคุมและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด อย่างไรก็ตาม KRT18 และ ELASTIN ได้รับการควบคุมอย่างเข้มงวดในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงคุณสมบัติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทำให้เซลล์มีความเป็นอมตะ (รูปที่ 2A, B) ส่วนระดับโปรตีนของ Vimentin และ COL1A1 ยืนยันคุณสมบัติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของที่เป็นอมตะ (รูปที่ 2C, D) นอกจากนี้ยังประเมินการแสดงออกของตัวบ่งชี้เนื้องอกและยีนต่อต้าน (RB, p21, p53 และ SIRT1) เพื่อติดตามสถานะของความชราภาพของเซลล์ (16, 21) เป้าหมายโดยตรงของ SV40 คือตัวบ่งชี้เนื้องอก RB (pRb) อย่างไรก็ตาม ไม่พบการแสดงออกของ RB (ไม่แสดงในผลลัพธ์) แต่ p53 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดทั้งหมด อย่างไรก็ตามการแสดงออกที่สูงของ p53 นั้นไม่สอดคล้องกับระดับของ p21 SIRT1 ซึ่งเป็นยีนต่อต้านวัยได้รับการตรวจสอบในการศึกษานี้เพื่อเชื่อมโยงความสำคัญของยีนดังกล่าวกับกระบวนการทำให้เป็นอมตะ SIRT1 มีความสำคัญสำหรับกระบวนการของเซลล์ต่างๆ รวมถึงการควบคุม p53 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และการเพิ่มอายุขัย (22) พบการแสดงออกที่สูงของ SIRT1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด แต่ไม่พบในเซลล์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 2A, B) แกนกลางของ p53 และ SIRT1 กระตุ้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเกี่ยวข้องของ SIRT1 ในการทำให้เป็นอมตะของเซลล์โดยการถ่ายโอนพลาสมิด hTERT/SV40



ภาพที่ 4.2 แสดงคุณลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกถ่ายโอน

(A) ผลลัพธ์ PCR ของ SIRT1, p53, p21, KRT18, COL1A1, COL3A1, Vimentin, Elastin และ GAPDH

(B) การแสดงออกของ COL1A1, KRT18, Elastin, SIRT1, p53 และ p21 แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n = 3)

*p < 0.05 และ **p < 0.01 เทียบกับเซลล์ควบคุม (C) การแสดงออกของโปรตีนของ Vimentin และ

COL1A1 โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (D) ความเข้มของการเรืองแสงสัมพันธ์ของ COL1A1 และ

Vimentin ซึ่งคำนวณจากพื้นที่ทั้งหมดของอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n = 3) *p <

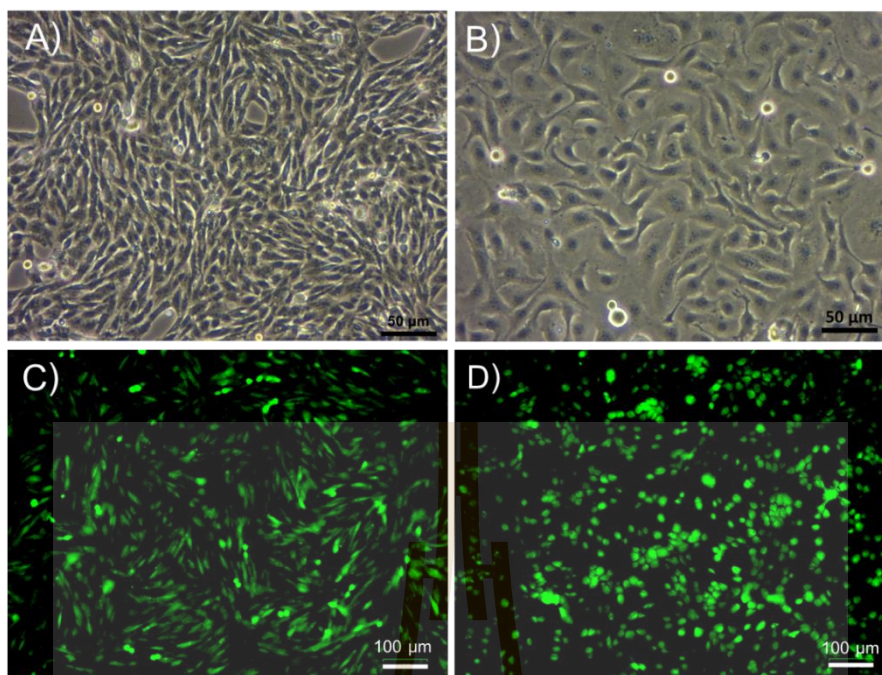
0.05 เทียบกับเซลล์ควบคุม

4.2 ผลการออกแบบโปรโมเตอร์และสร้างเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ยีนสร้างคอลลาเจนและยีนการสร้างเม็ดสีผิวหนัง

จากผลการพัฒนาเซลล์ที่ใช้ในการจำลองผิวหนังเทียมแบบสามมิติ โดยใช้เซลล์คอมมอลไฟโบรบลาสต์ (Human dermal fibroblast cells: HDF) และเซลล์เคราติโนไซต์ (Keratinocyte) ที่มีการเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงแบบสองมิติ แสดงดังภาพที่ 4.1 A และ B มาทำการถ่ายโอน พลาสมิด pOBCol3.6-GFPtpz (Addgene #110211) ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น type 1 collagen ซึ่งโปรโมเตอร์ type 1 collagen มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนของผิว เข้าสู่เซลล์ HDF และ pEGFP-TYR (Addgene #32781) ที่มี Gene/Insert เป็น Tyrosinase เข้าสู่เซลล์ Keratinocyte ซึ่ง Tyrosinase มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ tyrosine สารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยใช้ไลโปเฟคตามีน (lipofectamine) สำหรับการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ หลังจากทำการคัดเลือกเซลล์ (cell selection) โดยการส่อง Green Fluorescence Proteins GFP ภายใต้การส่อง fluorescence microscope พบการแสดงออกของ Fluorescence Proteins GFP ทั้งในเซลล์ HDF และเซลล์ Keratinocyte ในบางเซลล์ จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ด้วย drug selection sulfate G418 sulfate ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบเซลล์ที่รอดชีวิตและเพิ่มจำนวนได้เป็นเซลล์ที่มีพลาสมิดอยู่ในเซลล์และสามารถแสดงเซลล์ที่รอดชีวิตของเซลล์ HDF และเซลล์ Keratinocyte ด้วยการส่อง Green Fluorescence Proteins GFP ภายใต้กล้อง Fluorescence microscope ดังแสดงในภาพที่ 4.3 C และ D

4.3 ผลการเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ

จากการเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติโดยเริ่มจากการสร้างชั้นคอลลาเจนด้วยการใช้ 10X EMEM, 200mM L-glutamine, FBS, 7.5% Sodium bicarbonate และ bovine collagen I เข้าด้วยกันในหลอดที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง จากนั้นการดูด Collagen mixture ไปใส่ในหลุมเมมเบรนด้านในของ 6 Transwell plate หลุมละ 1 มิลลิลิตร ซึ่ง Collagen mixture ที่ได้จะมีสีเหลือง แสดงดังภาพที่ 4.3A จากนั้นบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C Collagen mixture ที่ได้จะแข็งตัวและเปลี่ยนเป็นสีชมพูซึ่งบ่งชี้ถึง pH ที่เหมาะสมกับการเซตตัวของคอลลาเจนและเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์บน Membrane ของ Transwell แสดงดังภาพที่ 4.3B หากเจลที่ได้ยังคงมีสีเหลืองหรือคอลลาเจนไม่เซตตัวสามารถแก้ไขได้โดยการปรับ pH ของ Collagen mixture ด้วยการเติม Sodium bicarbonate เพิ่ม



ภาพที่ 4.3 A) แสดงเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์ (HDF) ที่เพาะเลี้ยงแบบสองมิติ B) เซลล์เคราตินโนไซต์ (keratinocyte) ที่เพาะเลี้ยงแบบสองมิติ C) เซลล์ HDF ภายใต้กล้อง Fluorescence microscope ที่ผ่านการถ่ายอินฟราเรด pOBCol3.6-GFPtpz ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น type 1 collagen D) เซลล์ Keratinocyte ภายใต้กล้อง Fluorescence microscope ที่ผ่านการถ่ายอินฟราเรด pEGFP-TYR ที่มี Gene/Insert เป็น Tyrosinase

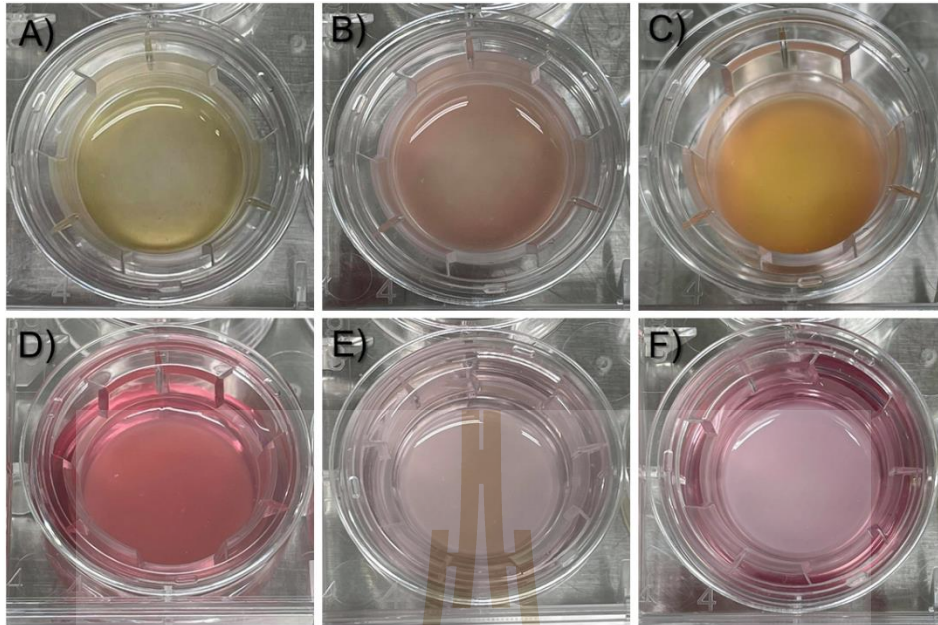
เมื่อได้ส่วนของชั้นคอลลาเจนแล้วทำการสร้างชั้น Dermis ต่อโดยผสม 10X EMEM , 200mM L-glutamine, FBS, 7.5% Sodium bicarbonate, bovine collagen I และเซลล์ Human dermal fibroblast (HDF) เข้าด้วยกันใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ในน้ำแข็งจากนั้น ดูด HDF mixture ไปใส่ในหลุม เมมเบรนด้านใน ของ 6 Transwell plate ที่มีชั้นคอลลาเจนอยู่แล้ว แสดงดังภาพที่ 4.2C แล้วเติมอาหาร 10% FBS DMEM ลงไปในหลุมเมมเบรนและหลุมภายนอก แสดงดังภาพที่ 4.2D บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่ 37 °C 5% CO₂ เพื่อให้เซลล์ HDF แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นชั้นของ Dermis

จากนั้นทำการสร้างชั้น Epidermis โดยทำการเตรียม Basic medium ก่อนซึ่งมีส่วนผสมคือ 490 mL keratinocyte serum-free medium 490 มิลลิลิตร, bovine pituitary extract 1.8 มิลลิลิตร, dialyzed fetal bovine serum 10 มิลลิลิตร, SCF solution 500 ไมโครลิตร, bFGF solution 562.5 ไมโครลิตร และ ET-3 solution 500 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรสุทธิ 500 มิลลิลิตร โดยนำ Basic medium ที่ได้มาเตรียม Skin reconstruct medium I (Basic medium 100 มิลลิลิตร และ EGF solution 10 ไมโครลิตร) Skin reconstruct medium II (Basic medium 100 มิลลิลิตร และ EGF solution 2 ไมโครลิตร) และ Skin

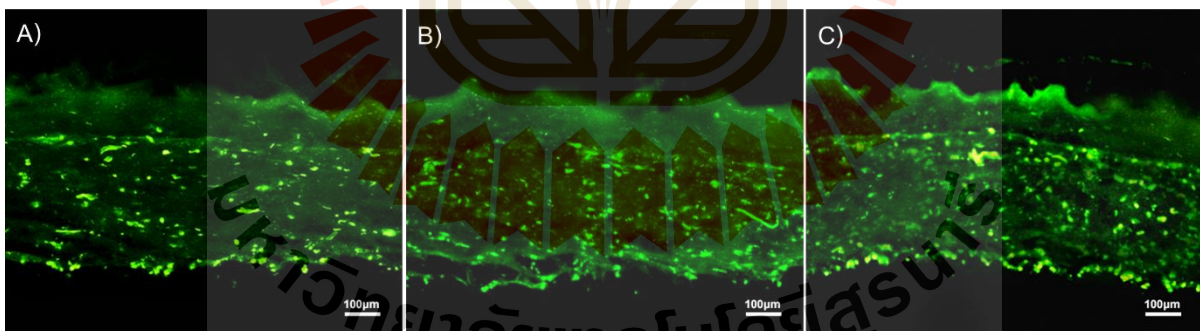
reconstruct medium III (Basic medium 100 มิลลิลิตร และ 1M CaCl₂ 720 ไมโครลิตร) จากนั้นทำการ Trypsinization keratinocyte cells และ resuspension ด้วย Skin reconstruct medium I จากนั้นการดูดอาหารเก่าออกจาก Transwell plate ที่มีการเพาะเลี้ยงชั้น dermis ทำการเติม Skin reconstruct medium I ลงไปในหลุมเมมเบรนและ หลุมภายนอก จากนั้นเติม Keratinocyte cell suspension ที่เตรียมไว้เติมลงไปในหลุมเมมเบรน บ่มเป็นเวลา 2 วัน ที่ 37 °C 5% CO₂ แสดงดังภาพที่ 4.2E จากนั้นดูดอาหารเก่าออกอีกครั้ง แล้วเติม Skin reconstruct medium II ลงไปในหลุมเมมเบรนและหลุมภายนอก บ่มต่อเป็นเวลา 2 วัน ที่ 37 °C 5% CO₂ จากนั้นดูดอาหารเก่าออก แล้วเติม Skin reconstruct medium III เฉพาะในหลุมภายนอก บ่มที่ 37 °C 5% CO₂ โดยทำการเปลี่ยนอาหาร Skin reconstruct medium III ทุกวันต่อเป็นเวลา 18 วัน แสดงดังภาพที่ 4.2F จากนั้นทำการตรวจสอบต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสงภายใต้การส่อง Fluorescence microscope

จากการเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ โดยใช้เซลล์ HDF (human dermal fibroblast cells) ที่มีพลาสมิด pOBCol3.6-GFPtpz ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น type 1 collagen ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจน และเซลล์ Keratinocyte ที่มีพลาสมิด pEGFP-TYR มีชิ้นส่วน Insert เป็น Tyrosinase ซึ่ง Tyrosinase มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ tyrosine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน หลังจากทำการเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติบนบน membrane ของ Transwell ตามระยะเวลาที่กำหนด พบว่าต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติสามารถสร้างสารเรืองแสงภายใต้กล้อง fluorescence microscope ดังภาพที่ 4.3A-C โดยแสดงสีเขียวของ Green Fluorescence ของชั้น Epidermis ด้านบน และชั้น Dermis อยู่ด้านล่างแยกกันด้วย basement membrane ซึ่งจะเห็นได้ว่าผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ระยะเวลา 7, 12 และ 18 วันมีการเจริญของเซลล์ทั้งในชั้นของ Epidermis ด้านบน และชั้น Dermis ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น

จากผลการย้อมชิ้นผิวหนังเทียมแบบสามมิติด้วยฮีมาทอกซีไครีนและอีโอซิน (H&E) แสดงให้เห็นถึงชั้น epidermis ที่อยู่ด้านบน มีส่วนบางๆ ของชั้น basal layer และชั้น dermis ที่มีเซลล์ HDF ฝังอยู่ในเมทริกซ์ของ collagen type I ดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ขั้นตอนการสร้างต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ A) การสร้างผิวหนังเทียมแบบสามมิติชั้นคอลลาเจน B) ชั้นคอลลาเจนที่มีการบ่มให้เซตตัวเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู C) การสร้างชั้น Dermis จากคอลลาเจนผสมเซลล์ Human dermal fibroblast บนชั้นคอลลาเจน D) ชั้น Dermis ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 4 วัน E) การสร้างชั้น Epidermis จากเซลล์ Keratinocyte บนชั้น Dermis F) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ได้หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร และสภาวะเหมาะสมที่ 18 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes



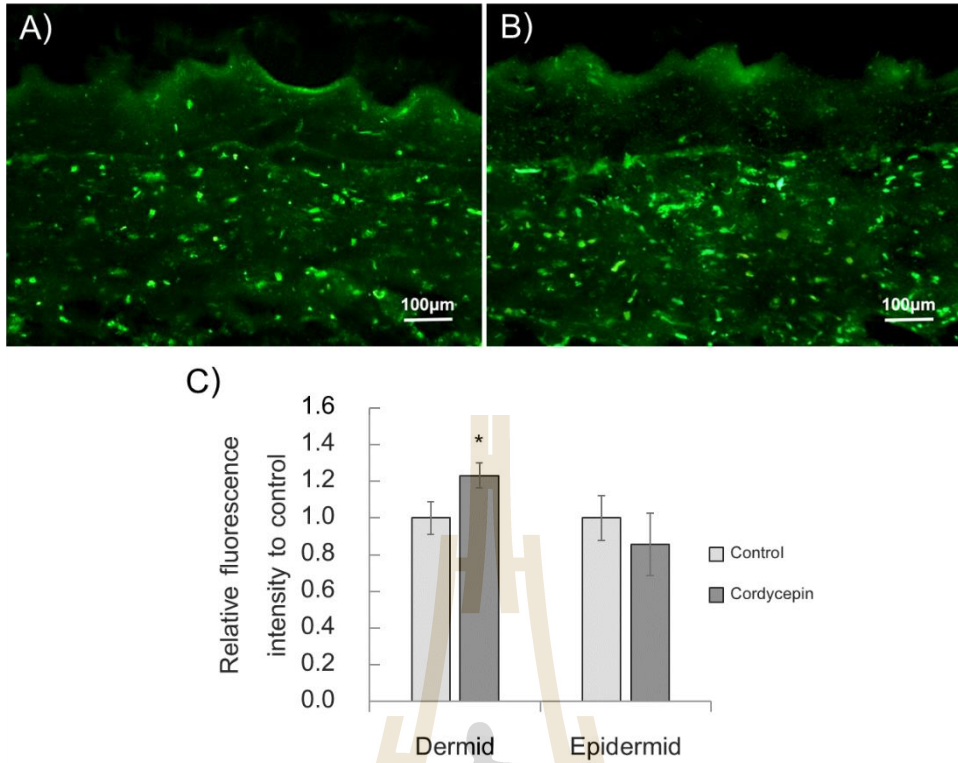
ภาพที่ 4.5 A) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติภายใต้การส่อง Fluorescence microscope ที่ 7 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes B) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบภายใต้การส่อง Fluorescence microscope ที่ 12 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes C) ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบภายใต้การส่อง Fluorescence microscope ที่ 18 วัน หลังจากเติมเซลล์ Keratinocytes โดยแสดงสีเขียวของ Green fluorescence protein ทั้งในชั้น Epidermis (ด้านบน) และ Dermis (ด้านล่าง)



ภาพที่ 4.6 ตั้แบบผิวหนังเทียมแบบหลังจากการย้อมด้วย H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.3 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารคอร์ไดเซป็นต่อการชะลอวัยและการช่วยให้ผิวขาวด้วย ตั้แบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสง

จากการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารคอร์ไดเซป็นต่อการชะลอวัยและการช่วยให้ผิวขาวด้วย ตั้แบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสง โดยทำการทดสอบสารคอร์ไดเซป็นที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารคอร์ไดเซป็นกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในชั้น Dermid เพิ่มขึ้นเนื่องจากพบการเรืองแสงความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียว Green fluorescence protein เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 4.5A-C แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการเรืองแสงในชั้น Epidermid 4.5A-C ซึ่งกล่าวได้ว่าสารคอร์ไดเซป็นมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ตั้แบบผิวหนังเทียมชั้น Dermid เนื่องจากชั้น Dermid ซึ่งเป็นชั้นเซลล์ HDF ที่มีชิ้นส่วนของโปรโมเตอร์เป็น Collagen มีการแสดงออกของ Green fluorescence protein เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีผลในการลดการสร้างเม็ดสีผิวเมลานินเนื่องจากไม่พบความแตกต่างของความเข้มแสงระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มคอร์ไดเซป็นในชั้น Epidermid ที่เป็นเซลล์ เคราติโนไซต์ (Keratinocyte)) ซึ่งมี Gene/Insert เป็น Tyrosinase มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ Tyrosine ซึ่งสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน



ภาพที่ 4.7 ตั้แบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติภายใต้การส่อง Fluorescence microscope A) ตั้แบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติกลุ่มควบคุม B) ตั้แบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติหลังจากหยุดสารละลายคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C) กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มแสงในกลุ่มที่ทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่พัฒนาจากเซลล์ HDF (human dermal fibroblast cells) ที่มีพลาสมิด pOBCol3.6-GFPtpz ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น type 1 collagen และเซลล์ Keratinocyte ที่มีพลาสมิด pEGFP-TYR มีชิ้นส่วน Insert เป็น Tyrosinase สามารถสร้างสารเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้อง Fluorescence microscope และสามารถนำไปใช้ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการต้านการเกิดริ้วรอยและสร้างเม็ดสี โดยเมื่อมีสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดริ้วรอยสารเรืองแสงสีเขียวที่ชั้นผิวหนังเทียม HDF (Dermis) จะมีการเพิ่มการสร้างคอลลาเจน ส่งผลให้สารเรืองแสงสีเขียวเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทางกลับกันหากสารออกฤทธิ์มีคุณสมบัติในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน สารเรืองแสงสีเขียวที่ชั้นผิวหนังเทียม Keratinocyte (epidermis) จะลดการสร้าง tyrosine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานินส่งผลให้สารเรืองแสงสีเขียวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากธรรมชาติต่อการชะลอวัยและต้านการเกิดริ้วรอย โดยใช้สารคอร์ไดเซปินเป็นสารออกฤทธิ์ต้นแบบพบว่าชั้น Dermis มีการแสดงออกของ Green fluorescence protein เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ Green fluorescence protein ในชั้น Epidermid โดยสามารถกล่าวได้ว่าสารคอร์ไดเซปินมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ต้นแบบผิวหนังเทียมชั้น Dermis แต่ไม่มีผลในการลดการสร้างเม็ดสีผิวเมลานินในชั้น Epidermid ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมไปถึงลดการใช้สัตว์ทดลอง และสามารถทดแทนการใช้ผิวหนังเทียมที่มีต้นทุนค่อนข้างสูงได้

อภิปรายผล

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการพัฒนาสายพันธุ์เซลล์ที่ใช้ในการจำลองผิวหนังเทียม คือเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์ (human dermal fibroblast cells: HDF) และเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) นำมาผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม โดยการส่งถ่ายลำดับโปรโมเตอร์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนและ Tyrosinase ซึ่ง Tyrosinase มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน tyrosine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน รวมไปถึงยีนสารเรืองแสงสีเขียว *eGFP* ซึ่งจะแสดงออกมากขึ้นเมื่อสารออกฤทธิ์ที่ต้องการทดสอบสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างคอลลาเจน และจะมีการแสดงออกลดลงเมื่อสารออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยการวิจัยมุ่งเน้นในการจำลองผิวหนังชั้นเดอมิสและเอพิเดอมิส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Li, Fukunaga-Kalabis, and Herlyn (2011b) ที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์และเซลล์เคราติโนไซต์ ในตำแหน่ง ลำดับ และสภาวะอาหารที่เหมาะสม จนทำให้โครงสร้างชั้นผิวหนังของผิวหนังเทียม มีความใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์อย่างมาก เหมาะกับการใช้เป็นระบบการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ผิวหนังชั้นเดอมิส ซึ่งมีความสำคัญในการสร้างเมทริกซ์ภายนอก โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลลาเจน ที่ช่วยให้ผิวโดยรวมมีความยืดหยุ่น ผู้วิจัยจะทำการส่งถ่ายลำดับ collagen type I ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจน และยีน *eGFP* สำหรับสังเคราะห์สารเรืองแสงสีเขียวเข้าไปในสารพันธุกรรมของเซลล์ ซึ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ HDF จะถูกถ่ายโอนพลาสมิด pOBCol3.6-GFPtpz (Addgene #110211) โดยใช้ไลโปแฟคตามีน (lipofectamine) สำหรับการถ่ายโอน ในอัตราส่วนพลาสมิด 500 นาโนกรัม ต่อไลโปแฟคตามีน 7 ไมโครลิตรในภาชนะอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 9.5 ตารางเซนติเมตรหรือ 1 ช่องของเพลทขนาด 6 หลุม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 5% คาร์บอนไดออกไซด์จากนั้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเลี้ยงต่อในสภาวะดังกล่าวจนเซลล์โตเต็มเพลท (100% confluent) จึงทำการคัดเลือกเซลล์ (cell selection) โดยการเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Green Fluorescence Proteins GFP ภายใต้การส่อง fluorescence microscope และ สำหรับเซลล์เคราติโนไซต์ เป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผิวหนังชั้นเอพิเดอมิส ซึ่งเป็นปราการแรกในการป้องกันร่างกายจากปัจจัยทางชีวภาพ เคมี และรังสี ผู้วิจัยผู้วิจัยทำการส่งถ่ายลำดับ Gene/Insert ที่เป็น Tyrosinase ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ tyrosine ซึ่งสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Lin and Fisher 2007) และยีน *GFP* สำหรับสังเคราะห์สารเรืองแสงสีเขียวเข้าไปในสารพันธุกรรมของเซลล์ เพื่อจำลองระบบการสร้างเม็ดสีของเซลล์เคราติโนไซต์ แทนการใช้เซลล์เคราติโนไซต์จริง เพื่อลดความซับซ้อนของโครงสร้างผิวหนังเทียมถูกถ่ายโอนด้วย pEGFP-TYR (Addgene #32781) กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

เกิดจากการแสดงออกพร้อมกันของยีนจำนวนหนึ่ง ได้แก่ *MITF* ยีนสำหรับสังเคราะห์ microphthalmia transcription factor ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ เอนไซม์และ differentiation factor หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสี (Levy, Khaled, and Fisher 2006) ยีน *TYR* ยีนสำหรับสังเคราะห์เอนไซม์ Tyrosinase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซีนให้กลายเป็น สารตัวกลาง (intermediates) ในวัฏจักรการสังเคราะห์เมลานิน (Hopkin et al. 2016) และยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน เช่น *TYRP1* (Box et al. 1998), และ *DCT* (Hopkin et al. 2016; Lin and Fisher 2007) การแสดงออกของยีนข้างต้นอยู่ในการควบคุมของ promoter ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก รวมถึงรังสีอัลตราไวโอเล็ต เช่น *MITF* promoter และ Tyrosine promoter (Lin and Fisher 2007) การถ่ายโอนจะทำในรูปแบบเดียวกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และหลังจากถ่ายโอนพลาสมิดแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ด้วย drug selection G418 sulfate 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acid และ 1% l-glutamine ซึ่งจะทำกรเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน จนเซลล์โตเต็มเพลท และทำการย้ายภาชนะ (sub-culture) ซึ่งจะได้เป็น passage 1 หลังจากการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ผลจากการถ่ายโอนพลาสมิดซึ่งมียีน *eGFP* จึงทำให้สามารถตรวจสอบได้ภายใต้กล้อง Fluorescence microscope และพบการเรืองแสงสีเขียวของ GFP ภายในเซลล์ทั้งสองแสดงดังภาพที่ 4.1 C และ D

จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติโดยดัดแปลงวิธีการจากงานวิจัยของ Li et al. (2011b) ขั้นตอนการสร้างต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติแสดงดังรูปที่ 4.2 1-F โดยการสร้างชั้นคอลลาเจนจาก Bovine collagen I และสร้างชั้น Dermis จาก Bovine collagen I ผสมกับเซลล์ Human dermal fibroblast HDF ที่พลาสมิด pOBCol3.6-GFPtpz (Addgene #110211) ที่มีชิ้นส่วนโปรโมเตอร์เป็น type 1 collagen ซึ่งโปรโมเตอร์ type 1 collagen มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนของผิว และสร้างชั้น Epidermis ด้วย เซลล์ Keratinocyte ที่มีพลาสมิด pEGFP-TYR มีชิ้นส่วน Insert เป็น Tyrosinase ซึ่ง Tyrosinase มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ Tyrosine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน และทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารจำเพาะคือ Skin reconstruct medium I, Skin reconstruct medium II ซึ่งมีส่วนผสมของซึ่ง Epidermal Growth Factor (EGF) เป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตของผิวหนังชั้นนอกและเคราตินไนไซต์ ส่งเสริมการสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ (Bodnar, 2013) และ Skin reconstruct medium III โดยในขั้นตอนการเปลี่ยนเป็นอาหารเป็น Skin reconstruct medium II จะทำการ

เดิมเพียงเฉพาะในหลุมภายนอกเท่านั้น เพื่อให้ส่วนของชั้นของ Epidermid สัมผัสกับอากาศซึ่งเป็นการช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างและองค์ประกอบ (Differentiation) ของเคราติโนไซต์ ซึ่งโดยธรรมชาติของผิวหนัง (Jung, Jung, & Shin, 2016) เมื่อเพาะเลี้ยงจนครบระยะเวลาที่กำหนดจึงทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสงภายใต้การส่อง Fluorescence microscope ของต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติ ซึ่งจากผลการตรวจสอบพบว่า ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติสามารถสร้างสารเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescence microscope ดังภาพที่ 4.3 โดยแสดงสีเขียวของ Green fluorescence protein ของชั้น Epidermis ด้านบน และชั้น Dermid อยู่ด้านล่างแยกกันด้วย Basal layer มีการเจริญของเซลล์ทั้งในชั้นของ Epidermis ด้านบน และชั้น Dermid เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 7, 12 และ 18 วัน และจากผลการย้อมชิ้นผิวหนังเทียมแบบสามมิติด้วยฮีมาทอกซีไลนและอีโอซิน (H&E) แสดงให้เห็นถึงชั้น Epidermis ที่อยู่ด้านบน มีส่วนบางๆ ของชั้น Basal layer และชั้น Dermis ที่มีเซลล์ HDF ฝังอยู่ในเมทริกซ์ของ Collagen type I ดังภาพที่ 4.4 ซึ่งผลการพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติในงานวิจัยครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Li et al. (2011b) ที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์เดอมอลไฟโบรบลาสต์และเซลล์เคราติโนไซต์ ในตำแหน่ง ลำดับ และสภาวะอาหารที่เหมาะสม จนทำให้โครงสร้างชั้นผิวหนังของผิวหนังเทียม มีความใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์อย่างมาก

จากการนำต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่ได้มาใช้เป็นต้นแบบทดสอบการออกฤทธิ์ของสารคอร์ติโคสเตียรอยด์และการช่วยให้ผิวขาวด้วยต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสงโดยทำการหดยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ลงบนต้นแบบผิวหนังเทียมแบบสามมิติที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารเรืองแสง แล้วทำการตรวจวัดความเข้มของสารเรืองแสงสีเขียวที่เปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับผิวหนังเทียมที่ได้รับการหดยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ปกติ (negative control) จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าชั้น Dermid ซึ่งเป็นชั้นเซลล์ HDF ซึ่งมีชั้นส่วนของโปรโมเตอร์เป็น Collagen มีการแสดงออกของ Green fluorescence protein เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4.5 A-C แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ Green fluorescence protein ในชั้น Epidermid ที่เป็นเซลล์ เคราติโนไซต์ (Keratinocyte) ที่มี Gene/Insert เป็น Tyrosinase มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ Tyrosine ซึ่งสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าสารคอร์ติโคสเตียรอยด์มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ต้นแบบผิวหนังเทียมชั้น Dermid แต่ไม่มีผลในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน

ข้อเสนอแนะ

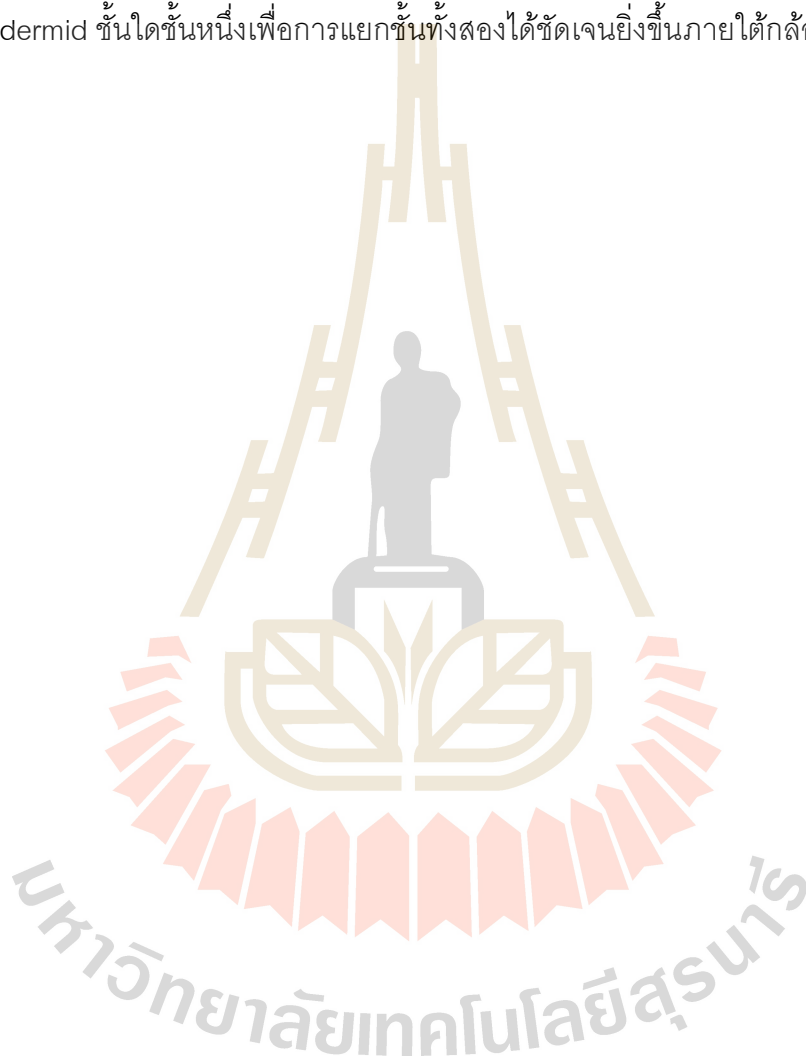
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

สามารถใช้ต้นแบบผิวหนังเทียมแบบ 3 มิติที่พัฒนาขึ้นในการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัด

ตัวอย่างต่อการต้านการเกิดริ้วรอยและสร้างเม็ดสีได้

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ควรคัดเลือกหรือสร้างพลาสมิดสำหรับถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ที่มีการเรืองแสงสีแดง (RFP) ในเซลล์ชั้น dermid หรือ epidermid ชั้นใดชั้นหนึ่งเพื่อการแยกชั้นทั้งสองได้ชัดเจนยิ่งขึ้นภายใต้กล้อง Fluorescence microscope



บรรณานุกรม

- Bodnar, R. J. (2013). Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor: the yin and yang in the treatment of cutaneous wounds and cancer. *Advances in wound care*, 2(1), 24-29.
- Campisi, J. (2008). Aging and cancer cell biology, 2008. *Aging cell*, 7(3), 281-284.
- Chen, C.-C., Mo, F.-E., & Lau, L. F. (2001). The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47329-47337.
- Duell, E., Fisher, G., & Kang, S. (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *J Invest Dermatol*, 337, 411-428.
- Fisher, G. J., Datta, S., Wang, Z., Li, X.-Y., Quan, T., Chung, J. H., . . . Voorhees, J. J. (2000). c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *Journal of Clinical Investigation*, 106(5), 663.
- Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z.-Q., Varani, J., Kang, S., & Voorhees, J. J. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism.
- Fisher, G. J., Varani, J., & Voorhees, J. J. (2008). Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Archives of dermatology*, 144(5), 666-672.
- Gilchrist, B., & Yaar, M. (1992). Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level. *British Journal of Dermatology*, 127(S41), 25-30.
- Jung, M. H., Jung, S.-M., & Shin, H. S. (2016). Co-stimulation of HaCaT keratinization with mechanical stress and air-exposure using a novel 3D culture device. *Scientific reports*, 6(1), 1-7.
- Kireeva, M. L., Mo, F.-E., Yang, G. P., & Lau, L. F. (1996). Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, 16(4), 1326-1334.
- Lau, L. F., & Lam, S. C.-T. (1999). The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Experimental cell research*, 248(1), 44-57.

- Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., & Herlyn, M. (2011a). The three-dimensional human skin reconstruct model: a tool to study normal skin and melanoma progression. *Journal of visualized experiments: JoVE*(54).
- Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., & Herlyn, M. (2011b). The three-dimensional human skin reconstruct model: a tool to study normal skin and melanoma progression. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(54), e2937.
- Orfanos, C. E., Zouboulis, C. C., Almond-Roesler, B., & Geilen, C. C. (1997). Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs*, 53(3), 358-388.
- Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *The Lancet*, 363(9402), 62-64.
- Perbal, B., Brigstock, D., & Lau, L. (2003). Report on the second international workshop on the CCN family of genes. *Molecular Pathology*, 56(2), 80.
- Quan, T., He, T., Shao, Y., Lin, L., Kang, S., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2006). Elevated cysteine-rich 61 mediates aberrant collagen homeostasis in chronologically aged and photoaged human skin. *The American journal of pathology*, 169(2), 482-490.
- Quan, T., Qin, Z., Shao, Y., Xu, Y., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2011). Retinoids suppress cysteine-rich protein 61 (CCN1), a negative regulator of collagen homeostasis, in skin equivalent cultures and aged human skin in vivo. *Experimental dermatology*, 20(7), 572-576.
- Quan, T., Qin, Z., Xu, Y., He, T., Kang, S., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2010). Ultraviolet irradiation induces CYR61/CCN1, a mediator of collagen homeostasis, through activation of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(6), 1697-1706.
- Ramnath, N., & Creaven, P. J. (2004). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Current oncology reports*, 6(2), 96-102.
- Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J., . . . Voorhees, J. J. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 480-486.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) รศ.ดร.ปริญญา น้อยสา

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. Parinya Noisa, Ph.D.

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3489900186665

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่อยู่ ห้องปฏิบัติการ Cell-based assays and Innovations อาคารศูนย์เครื่องมือ 14

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์มือถือ 061-6266390 E-mail p.noisa@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา วิทยาลัยอิมพีเรียล ลอนดอน สาขาวิชา Stem cell technology

ปีที่จบ พศ.2553

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Stem cells, Neurobiology, Cell biology, Toxicology, Natural products

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว :

1. Noisa, P., Ramasamy, S. T., Lamont, R.F., Yu, L. S. J., Sheldon, M., Russell, A., Jin, X., Cui, W., Identification and Characterisation of the Early Differentiating Cells in Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. PLOS One, 2012; doi:10.1371/journal.pone.0037129
2. Tommiska, J., Toppari, J., Vaaralahti, K., Käsäkoski, J., Laitinen, E.M., Noisa, P., Kinnala, A., Niinikoski, H., Raivio, T., PROKR2 mutations in autosomal recessive Kallmann syndrome. Fertil Steril, 2012; doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.003
3. Jongkamonwivat, N., Noisa, P., Biomedical and clinical promises of human pluripotent stem cells for neurological disorders. Biomed Res Int, 2013; doi: 10.1155/2013/656531 (Review).
4. Noisa, P., Lund, C., Kanduri, K., Lund, R., Lähdesmäki, H., Lahesmaa, R., Lundin, K., Chokechuwattanalert, H., Otonkoski, T., Tuuri, T., Raivio, T., Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. J Cell Sci. 2014; doi: 10.1242/jcs.145755.

5. Noisa, P., Raivio, T., Neural crest cells: From developmental biology to clinical interventions. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2014 Sep 16. doi: 10.1002/bdrc.21074. (Review)
6. Suksuphew, S., Noisa, P., Neural stem cells could serve as a therapeutic material for age-related neurodegenerative diseases. *W J of Stem Cells*. 2014, in press (review).
7. Noisa P., Raivio T., Cui W., Neural Progenitor Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells as an Origin of Dopaminergic Neurons. *Stem Cells Int*. 2015;2015:647437. doi: 10.1155/2015/647437. Epub 2015 Apr 30.
8. Trokovic R., Weltner J., Noisa P., Raivio T., Otonkoski T., Combined negative effect of donor age and time in culture on the reprogramming efficiency into induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2015 Jun 11. pii: S1873-5061(15)00074-4. doi: 10.1016/j.scr.2015.06.001.
9. Prajumwongs P., Weeranantanapan O., Jaroonwichawan T., Noisa P., Human Embryonic Stem Cells: A Model for the Study of Neural Development and Neurological Diseases. *Stem Cells Int*. 2016 Volume 2016 (2016), Article ID 2958210, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2958210>.
10. Lund C., Pulli K., Yellapragada V., Giacobini P., Lundin K., Vuoristo S., Tuuri T., Noisa P., Raivio T., Development of Gonadotropin-Releasing Hormone-Secreting Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2016 Jul 13. pii: S2213-6711(16)30099-6. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.06.007.
11. Jaroonwichawan T., Chaicharoenaudomrung N., Namkaew J., Noisa P., Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. *Neurosci Lett*. 2016 Oct 25. pii: S0304-3940(16)30805-9. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.050.
12. Jaroonwichawan T., Muangchan P., Noisa P., Inhibition of FGF signaling accelerates neural crest cell differentiation of human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Nov 2. pii: S0006-291X(16)31842-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.147.
13. Suebsoonthron J., Jaroonwichawan T., Yamabhai M., Noisa P., Inhibition of WNT signaling reduces differentiation and induces sensitivity to doxorubicin in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Anticancer Drugs*. 2017 Feb 24. doi:10.1097/CAD.0000000000000478.