

**ผลของ *Lactobacillus brevis* ต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผิวหนัง:
ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส
และการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาส**

ปัญชานพัชร ธนสรวิช¹, สุพัตรา ปรศุพัฒนา^{2*}

Received: 7 July 2014

Accepted: 1 October 2014

บทคัดย่อ

บทนำ: เชื้อโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. ถูกนำมาใช้ประโยชน์เพื่อสุขภาพในหลากหลายรูปแบบ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ *Lactobacillus brevis* (L. brevis) ต่อปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผิวในระยะการแบ่งตัว (proliferation) **วิธีดำเนินการวิจัย:** ทำการเตรียมเชื้อและองค์ประกอบของเชื้อ L. brevis มาศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP และ ABTS assay ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี collagenase assay และความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสด้วยวิธี MTT assay **ผลการวิจัย:** การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทำการศึกษาด้วยวิธี FRAP และ ABTS พบว่า intact cell (10^9 cfu/mL) และ intracellular cell free extract (10^9 cfu/mL) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่า extracellular extract มีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ดีที่สุด เท่ากับร้อยละ 57.10 ± 14.60 และการศึกษาการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส พบว่า intracellular cell free extract มีแนวโน้มเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส ส่วน extracellular extract สามารถเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) **สรุปผลการวิจัย:** แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ L. brevis รวมถึงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ ผลโดยรวมอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเชิงลึกต่อไปในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จาก L. brevis ที่ใช้ในการดูแลผิวหนัง

คำสำคัญ: *Lactobacillus brevis* การต้านออกซิเดชัน เอนไซม์คอลลาจีเนส เซลล์ไฟโบรบลาส

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2557; 10(3): 295-306

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ความงามและสุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

² Ph.D., ผู้ช่วยศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำสาขาวิชาเภสัชเวชและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ปรศุพัฒนา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002 Tel. 0-4336-2089, E-mail: psupatra@kku.ac.th

Effect of *Lactobacillus brevis* on Skin Tissue Repair: Antioxidative Effect, Anti-collagenase and Stimulation of Fibroblast Cell Proliferation.

Pinchapat Thanasanwanich¹, Supatra Porasuphatana^{2*}

Abstract

Introduction: *Lactobacillus* sp, a probiotic bacteria, has long been used for health promotion purposes. This study aimed to investigate factors that affect the proliferation phase of skin tissue repair. **Methods:** Cell and cellular components of *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) were prepared to studied antioxidative effect by FRAP and ABTS assays, Anti-collagenase activity by collagenase assay and fibroblast cell proliferation by MTT assay. **Results:** Results showed significance differences antioxidant activity by FRAP and ABTS technique for intact cell and intracellular cell free extract 10^9 cfu/mL ($p<0.05$). Anti-collagenase activity result showed extracellular extract exhibited the highest anti-collagenase activity at $57.10\pm14.60\%$. For stimulation of fibroblast proliferation, intracellular cell free extract demonstrated the tendency to increase the fibroblast proliferation and extracellular extract showed a significant increase in fibroblast proliferation ($p<0.05$). **Conclusion:** This study, therefore, showed antioxidant activity of *L. brevis* as well as anti-collagenase activity and cell proliferative effect which could be beneficial for the advanced knowledge in the development of skin products from *L. brevis* to be used for skin care.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, antioxidant activity, anti-collagenase activity, fibroblast

IJPS 2014; 10(3): 295-306

บทนำ

Lactobacillus brevis เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งในอดีตมีการนำแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกมาใช้ประโยชน์โดยการช่วยปรับสมดุลของระบบลำไส้ และ

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Ouweland *et al.*, 2002) นอกจากคุณสมบัติประโยชน์ดังกล่าว ยังมีการศึกษาถึงประโยชน์เกี่ยวกับผิวหนัง ได้แก่ การลดอุบัติการณ์การเกิดโรคผิวหนังอักเสบ (West *et al.*, 2009) และการลดการอักเสบของผิว (Kang *et al.*, 2009) และ

¹ Graduate student in Aesthetic Science and Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

² Ph.D., Assistant Professor, Division of Pharmacognosy and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

* **Corresponding author:** Assist. Prof. Supatra Porasuphatana, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002, Tel. 0-4336-2089, E-mail: psupatra@kku.ac.th

การเพิ่มระดับเซราไมด์ในผิวหนัง (Marzio *et al.*, 2003)

ผิวหนังทำหน้าที่ในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Holbrook, 1991) ซึ่งเมื่อเกิดการบาดเจ็บบริเวณผิวหนัง ร่างกายจะมีกลไกในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาทดแทน โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในชั้นหนังแท้จะมีบทบาทสำคัญในการสร้างเส้นใยและองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ผิวใหม่ (Li *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามในระหว่างที่มีการสร้างเซลล์ผิวใหม่ หากร่างกายได้รับผลกระทบจากอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจนเกิดภาวะ oxidative stress ภาวะดังกล่าวจะกระตุ้นให้เอนไซม์คอลลาจีเนสทำงานมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการทำลายเส้นใยคอลลาเจนมากขึ้นด้วย (Fisher *et al.*, 2008) และอาจทำให้ผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บไม่สามารถซ่อมแซมตนเองได้ตามระยะเวลา

ดังนั้นในระหว่างที่มีการซ่อมแซมเซลล์ผิวใหม่ ร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากภายนอกช่วยป้องกันการทำลายโครงสร้างปกติของผิวหนัง โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ วิตามินซี (ascorbic acid), วิตามินอี (tocopherols) (Cadenas, 1995) ซึ่งในปัจจุบันสารสกัดจากพืชและสมุนไพรหลายชนิดถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เช่น สารสกัดจากงา (Srisayam *et al.*, 2014) สารสกัดจากใบบัวบก (Satsue *et al.*, 2014) เป็นต้น นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืชสมุนไพร และผลไม้ ปัจจุบันพบรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลกติก โดยการศึกษาองค์ประกอบของเชื้อที่มีชีวิต (intact cell) และองค์ประกอบภายในเซลล์แบคทีเรียที่ทำให้ออก (intracellular cell free extract) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า องค์ประกอบทั้งสองของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ (Lin and Yen, 1999; Lin and

Change, 2000; Li *et al.*, 2012) นอกจากนี้การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการหายของบาดแผล พบว่า *L. brevis* สามารถกระตุ้นการซ่อมแซมบาดแผลและทำให้แผลหายเร็วขึ้นโดยลดระยะเวลาในช่วงที่มีการอักเสบของบาดแผล (Zahedi *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของ *L. brevis* ต่อปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมผิวหนังยังมีรายงานการศึกษาค่อนข้างจำกัด

จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการซ่อมแซมผิว อาจเกิดได้จากการที่ผิวหนังได้รับผลกระทบจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการทำลายโครงสร้างและหน้าที่ของผิว อีกทั้งยังส่งผลให้กระบวนการซ่อมแซมเซลล์ผิวใหม่ผิดปกติ และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความชราของผิวหนังได้ อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผิวยังขึ้นอยู่กับความสามารถของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในการแบ่งตัวและสร้างเส้นใยคอลลาเจน ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของ *L. brevis* ต่อปัจจัยที่อาจมีผลต่อการซ่อมแซมเซลล์ผิวหนังในระหว่างที่มีการสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังใหม่ (proliferation phase) โดยทำการศึกษาถึงความสามารถของ *L. brevis* ในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (anti-collagenase activity) และความสามารถในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนหรือการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast proliferation)

วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus brevis* subsp. *brevis* TISTR 868 (ส่งชื่อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) บ่มใน MRS Broth (Difco, U.S.A) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การหาปริมาณเชื้อตั้งต้นใช้วิธี spread plate โดยปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการทดลองคือ $1-2 \times 10^9$ colony forming unit/mL (cfu/mL)

1. การเตรียมสารทดสอบ (ดัดแปลงจาก

Lin and Chang, 2000)

หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Harmonic Model PLC-012: Germany) ที่ 4,400×g เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสสำหรับเตรียมเป็น extracellular extract (ดัดแปลงตามวิธีการเตรียม cell-free culture supernatants (CFCSS) ของ Messaoudi *et al.*, 2005) นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และกรองด้วย 0.2 syringe membrane filter ส่วนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกส่วนใสออก (cell pellet) นำมาปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (NaCl 0.85%, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM ปรับ pH เป็น 5.8) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้สำหรับเตรียม intact cell และ intracellular cell free extract

การเตรียม intact cell จะนำ cell pellet ของเชื้อ 10⁹ cfu/mL มาล้างเซลล์อีก 2 ครั้งและแขวนลอยด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเป็น 10⁸ และ 10⁷ cfu/mL ตามลำดับ โดยในการทดสอบด้วย intact cell จะใช้ส่วนของ cell pellet ของเชื้อ 10⁷, 10⁸ และ 10⁹ cfu/mL เพื่อใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา

การเตรียม intracellular cell free extract จะนำ cell pellet ของเชื้อ 10⁹ cfu/mL ที่ได้จากการปั่นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มาล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง และแขวนลอยด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเป็น 10⁸ และ 10⁷ cfu/mL ตามลำดับ และนำเชื้อแบคทีเรีย 10⁷, 10⁸ และ 10⁹ cfu/mL ไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic Homogenizer (Vibra cell, SONICS: U.S.A.) (pulse 50 sec, pause 10 sec, amplitude 60%) เป็นเวลา 8 นาที และหมุนปั่นเหวี่ยงที่ 7,800×g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนใสสำหรับเตรียมเป็น intracellular cell free extract

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย

วิธี **Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP assay)** (ดัดแปลงจาก Benzie and Strain, 1996)

เตรียม FRAP reagent โดย acetate buffer ความเข้มข้น 300 mM ผสมกับสารละลาย TPTZ (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 10 mM (ละลายใน HCl 40 mM) และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl₃) 20 mM ในอัตราส่วน 10:1:1 และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยการทดสอบด้วย intact cell จะทำการเติม FRAP reagent ปริมาตร 1 mL ลงใน cell pellet ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำไปหมุนปั่นเหวี่ยงที่ 4,400×g เป็นเวลา 5 นาที สำหรับการทดสอบด้วย intracellular cell free extract และ extracellular extract จะเติมสารทดสอบปริมาตร 20 µL ลงใน FRAP reagent สังเกตปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Sunrise, Tecan: Austria) ที่ความยาวคลื่น 593 nm

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วย

วิธี **ABTS decolorization** (ดัดแปลงจาก Re *et al.*, 1999)

เตรียม ABTS Reagent โดยเตรียม 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 7 mM ละลายในน้ำกลั่น และสารละลาย potassium persulfate (K₂S₂O₈) (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 2.45 mM ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นทำการผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด ในอัตราส่วน 2:1 เก็บไว้ในที่ปราศจากแสง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนเริ่มทดสอบ จะได้สารละลาย ABTS⁺ ที่มีสีเขียวเข้ม ก่อนเริ่มการทดสอบ นำสารละลาย ABTS⁺ มาเจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.9-1.2 เมื่อวัดด้วยเครื่อง microplate reader (Sunrise, Tecan, Austria) ที่ความยาวคลื่น 415 nm

โดยการทดสอบด้วย intact cell ทำการเติมสารละลาย ABTS⁺ ที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 mL ลงใน cell pellet ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำไปหมุนปั่นเหวี่ยงที่ 4,400×g เป็นเวลา 5 นาที สำหรับการทดสอบด้วย intracellular cell free extract และ extracellular extract จะเติมสารทดสอบปริมาตร 20 µL ลงในสารละลาย ABTS⁺ ที่เจือจาง สังเกตปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 nm

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะใช้สารมาตรฐาน Trolox (Sigma Aldrich, USA) เป็นกลุ่ม positive control กลุ่ม control 1 ใช้ น้ำกลั่นเพื่อเปรียบเทียบผลของสารทดสอบ intact cell และ intracellular cell free extract และกลุ่ม control 2 ใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth เพื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบ extracellular extract สำหรับการแสดงผลของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จะแสดงผลในรูปของ Trolox equivalence

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี Collagenase assay (ดัดแปลงจาก Thring *et al.*, 2009)

เตรียมสารตั้งต้น *N*-[3-(2-Furyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 1 mM ใน Tricine buffer (Tricine 50 mM เติมน้ำ NaCl 400 mM และ 10 mM CaCl₂ ปรับ pH เท่ากับ 7.5) และสารละลาย Collagenase (Collagenase from *Clostridium histolyticum* EC 3.4.24.3) (Sigma Aldrich, USA) 2 units/mL ในน้ำเย็น

เริ่มทดสอบปฏิกิริยาโดยการเติมสารทดสอบ ปริมาตร 5 µL และเอนไซม์คอลลาจีเนส ปริมาตร 5 µL ลงใน FALGPA ปริมาตร 95 µL และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Accu Reader, Metertech, Taiwan) ที่ความยาวคลื่น 340 nm โดยการวัดการเปลี่ยนแปลง

ค่าการดูดกลืนแสงตามเวลา (kinetic measurement) การแสดงผลฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส แสดงผลในรูปของร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ (% Enzyme inhibition)

5. การทดสอบการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ด้วยวิธี MTT (ดัดแปลงจาก Niyomploy *et al.*, 2009)

เซลล์ไฟโบรบลาสที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังบริเวณหน้าผาก (Human forehead fibroblast: HFF) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วิไลรัตน์ ลื่อนันต์ศักดิ์ศิริ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเซลล์ไฟโบรบลาส (passage 5) ถูกเพาะเลี้ยงใน T-75 flask ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO, U.S.A) ซึ่งเติม 10% fetal bovine serum (FBS) 1% antibiotic Penicillin and Strepto-mycin (BIOCHOM, Berlin Germany) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ตู้เลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตร้อยละ 80 นำเซลล์ไฟโบรบลาสไปใส่ใน 96 well plate ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 2×10⁴ เซลล์ต่อหลุม โดยเซลล์ที่ใช้ในการวิจัยเป็นเซลล์ passage ที่ 7-8 บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ปราศจากการเติมซีรัมและยาปฏิชีวนะ นำไปบ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารชนิดที่ไม่มีซีรัมและยาปฏิชีวนะอีก 1 ครั้งแล้วบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมน้ำทดสอบได้แก่ intracellular cell free extract และ extracellular extract และบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มทำการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) (GIBCO, USA) และเติมน้ำละลาย MTT (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ใน PBS ปริมาตร 150 µL ลงในเซลล์แต่ละหลุมและบ่มต่อเป็นเวลา 4

ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออก และเติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) 150 μ L ทำการเขย่าเบาๆเพื่อละลายผลึก formazan และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (Sunrise, Tecan, Austria) การแสดงผลของการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ แสดงผลในรูปร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การอธิบายผลการทดลองจะใช้สถิติพรรณนา (Descriptive statistic) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Means $\pm$ SD) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ intact cell และ intracellular cell free extract และการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของ intracellular cell free extract ใช้สถิติ One way ANOVA และใช้สถิติ Independent *t*-test สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง extracellular extract และกลุ่มควบคุมในการทดสอบการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การศึกษาค้นคว้านี้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเชื้อ *L. brevis* ด้วยวิธีที่มีกลไกการต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน 2 วิธีได้แก่ FRAP assay และ ABTS assay โดยใช้สารทดสอบคือ intact cell, intra-cellular cell free extract และ extracellular extract

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ extracellular extract พบว่าเมื่อเติมสารทดสอบ extracellular extract ลงใน FRAP reagent พบการเปลี่ยนแปลงจากสีชาอ่อนของ FRAP reagent เป็นสีน้ำเงินได้ เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี ABTS ซึ่ง extracellular extract สามารถเปลี่ยนสีเขียวของ ABTS reagent ให้จางลงได้ อย่างไรก็ตามการทดสอบทั้ง 2 วิธี เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ extracellular extract กับกลุ่มควบคุม (control 2) ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (MRS Broth pH 5.8) พบว่ากลุ่มควบคุมสามารถเปลี่ยนสี FRAP reagent และ ABTS reagent ได้เช่นเดียวกัน และค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบ extracellular extract (ไม่ได้แสดงผล) สำหรับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ intact cell และ intracellular cell free extract แสดงผลการทดลองในรูปของค่า Trolox equivalence (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ intact cell, intracellular cell free extract ในรูปของค่า Trolox equivalence

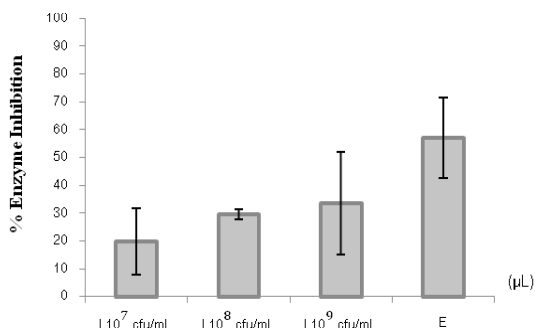
Test sample	FRAP ($\mu\text{g Trolox}$) (n=4)	ABTS ($\mu\text{g Trolox}$) (n=4)
Control 1 (DI water)	5.00 $\pm$ 1.00	0
Intact cell		
10 ⁷ cfu/mL	8.75 $\pm$ 2.47	0
10 ⁸ cfu/mL	13.13 $\pm$ 1.70	82.00 $\pm$ 19.53*
10 ⁹ cfu/mL	87.88 $\pm$ 10.80*	442.25 $\pm$ 31.90*
Intracellular cell free extract		
10 ⁷ cfu/mL	9.13 $\pm$ 2.10	29.25 $\pm$ 13.38
10 ⁸ cfu/mL	10.67 $\pm$ 0.77	112.25 $\pm$ 21.11*
10 ⁹ cfu/mL	36.88 $\pm$ 3.09*	365.25 $\pm$ 15.09*

หมายเหตุ: * $p < 0.05$

จากตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ intact cell, intracellular cell free extract ของเชื้อ *L. brevis* ซึ่งเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP และ ABTS ผลการศึกษาพบว่าทั้ง intact cell และ intracellular cell free extract จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่า intact cell 10⁹ cfu/mL และ intra-cellular cell free extract ที่ได้จากเชื้อ 10⁹ cfu/mL มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) สำหรับการทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่าสารทดสอบ intact cell และ intracellular cell free extract ที่ความเข้มข้น 10⁸ และ 10⁹ cfu/mL มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

2. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารทดสอบในกลุ่ม intracellular cell free extract และ extracellular extract ซึ่งเตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *L. brevis* (รูปที่ 1) ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารทดสอบทั้ง 2 กลุ่มสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ โดย extracellular extract มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสดีที่สุดคือร้อยละ 57.10 $\pm$ 14.60 รองลงมาคือสารทดสอบในกลุ่ม intracellular cell free extract (10⁷-10⁹ cfu/mL) โดยมีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของปริมาณเชื้อที่ใช้ในการเตรียมสารทดสอบ ได้แก่ ร้อยละ 19.97 $\pm$ 11.94, 29.62 $\pm$ 1.70 และ 33.51 $\pm$ 18.50 ตามลำดับ

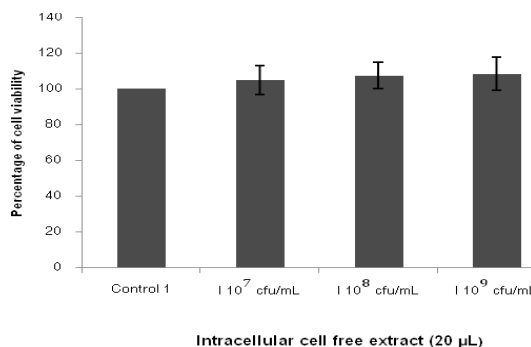


รูปที่ 1ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารทดสอบ intracellular cell free extract (10^7 - 10^9 cfu/mL) และ extracellular extract เมื่อทดสอบด้วย collagenase assay (Means $\pm$ SD) (n= 3) (I = intracellular cell free extract, E = extracellular extract)

สำหรับสารทดสอบในกลุ่ม intact cell พบว่าเชื่อมีความชุ่มและรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงทำให้ผลการทดสอบมีความคลาดเคลื่อนมากในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่ได้แสดงผลการทดสอบของ intact cell

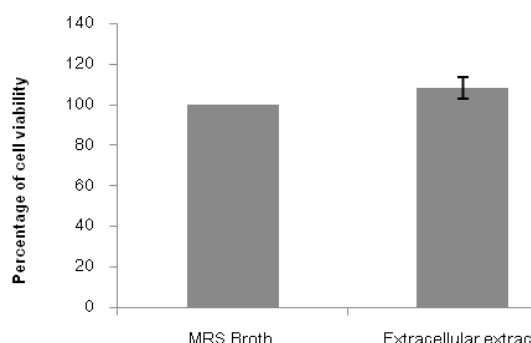
3. ทดสอบการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส

ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสหลังจากการบ่มสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารทดสอบกลุ่ม intracellular cell free extract มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ intracellular cell free extract (10^7 - 10^9 cfu/mL) อย่างไรก็ตาม พบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสของกลุ่ม intracellular cell free extract กับกลุ่มควบคุมที่เติมด้วย PBS ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 2)



รูปที่ 2ค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาส เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี MTT assay กับ intracellular cell free extract (10^7 - 10^9 cfu/mL) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (PBS) (n=6)

สำหรับ extracellular extract ซึ่งเป็นสารทดสอบที่ใช้ในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส พบว่า สามารถเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เติมด้วย MRS Broth ($p < 0.05$) โดยมีร้อยละของปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสเพิ่มเท่ากับร้อยละ 108.23 ± 5.43 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3ค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาส เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี MTT assay กับ extracellular extract เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (MRS Broth) (n=6)

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงเชื้อและองค์ประกอบของเชื้อ *L. brevis* ต่อปัจจัยที่อาจมีผลกระทบต่อการทำงานของเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนัง ซึ่งในกรณีที่ผิวหนังมีการสร้างเนื้อเยื่อและเส้นใยใหม่ บริเวณดังกล่าวอาจได้รับผลจากอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจนก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งภาวะดังกล่าวจะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสให้สลายเส้นใยคอลลาเจนมากขึ้น จึงอาจส่งผลให้เนื้อเยื่อซ่อมแซมได้ช้า นอกจากนี้การเพิ่มการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยหรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์นั้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ในครั้งนี้ได้ศึกษาโดยกลไกที่ต่างกันสองกลไก ได้แก่ วิธี FRAP ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และวิธี ABTS ซึ่งเป็นกลไกในการกำจัดหรือเคลื่อนย้ายอนุมูลอิสระ (Shalaby and Shanab, 2013) ผลการศึกษาพบว่า intact cell มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้ง 2 กลไก ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่พบอาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบต่างๆ ภายในผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดแลกติก เช่น พอลิแซคาไรด์และโปรตีนชนิดต่างๆ (Li *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันขององค์ประกอบต่างๆ ภายในผนังเซลล์ของเชื้อ *L. brevis* ดังนั้นอาจเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

สำหรับองค์ประกอบภายในของเชื้อ *L. brevis* ซึ่งได้แก่ intracellular cell free extract พบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP และ ABTS โดยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ intracellular cell free extract น่าจะเป็นผลมาจากสารหรือเอนไซม์ในระบบต้านออกซิเดชันที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย เช่น Glutathione peroxidase (GPx)

(Kim *et al.*, 2006) นอกจากนี้ ผลการศึกษาของ extracellular extract พบว่าเมื่อทำการบ่มเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth (pH 5.8) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างของ extracellular extract ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในขณะที่เชื้อมีชีวิตจะมีการหลั่งสารที่มีคุณสมบัติเป็นการออกมา อย่างไรก็ตามในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ไม่สามารถบ่งชี้ถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ extracellular extract ได้เนื่องจากไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการเติม MRS Broth

ปัจจัยที่เป็นผลของการที่บริเวณผิวหนังได้รับอนุมูลอิสระมากเกินไป คือ การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลายเส้นใยคอลลาเจน โดยในระยะที่มีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผิวหนังจะมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนขึ้นใหม่ ผลของการทำงานที่มากเกินไปของเอนไซม์คอลลาจีเนส อาจส่งผลให้การซ่อมแซมเซลล์ผิวช้า ซึ่งในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่า intracellular cell free extract และ extracellular extract สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ ซึ่งสารทดสอบดังกล่าว อาจมีผลต่อสารบางอย่างที่ทำให้เอนไซม์คอลลาจีเนสอยู่ในสภาวะที่ไม่พร้อมทำงาน หรือการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Armstrong and Jude, 2002; Biljana *et al.*, 2011; Sekhon, 2010) ในการศึกษารังต่อไปควรศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของ intracellular cell free extract และ extracellular extract

เซลล์สร้างเส้นใยหรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์นั้น มีบทบาทสำคัญในการสร้างองค์ประกอบต่างๆ ภายในผิวหนังใหม่ ผลการศึกษาความสามารถของ *L. brevis* ในการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ พบว่า intracellular cell free extract มีแนวโน้มในการเพิ่มการแบ่งตัวของ

เซลล์เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในการเตรียมสารทดสอบ นอกจากนี้สารทดสอบในกลุ่ม extracellular extract ยังสามารถเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม extracellular extract เป็นสารทดสอบที่มีความเป็นกรด ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาส ดังนั้นการนำ extracellular extract มาใช้ในการทดสอบจึงควรคำนึงถึงปริมาตรที่จะนำมาใช้ทดสอบด้วย

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของ intact cell และ intracellular cell free extract รวมไปถึงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส จากองค์ประกอบของเชื้อซึ่งได้แก่ intracellular cell free extract และ extracellular extract นอกจากนี้พบว่า extracellular extract ของเชื้อ *L. brevis* สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาส ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเส้นใยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผิว

ผลการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการนำ *L. brevis* ซึ่งเป็น lactic acid bacteria ไปใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผิวหนัง อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จาก *L. brevis* ด้านการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อผิวหนัง อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความปลอดภัยและประโยชน์ของเชื้อ *L. brevis* ทั้ง intact cell, intracellular cell free extract และ extracellular extract เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนังและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา ปรศุพัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาการศึกษาอิสระ รศ.ดร.วัชรียุณกิตติ และ รศ.ดร. อรุณศรี ปรีเปรม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำการศึกษาอิสระในครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณเจตนา

วีระกุล คุณศุภจิรา ศรีจางวาง และคุณพนิดา วิไลปรมาศ ที่ได้ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัย และงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาอิสระระดับบัณฑิตศึกษาจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

References

- Armstrong DG, Jude EB. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Pediatr Med Assoc* 2002; 92(1): 12-18.
- Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996; 239(0292): 70-76.
- Biljana E, Boris V, Cena D, Stefkovska DV. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenase). *J Cell Anim Biol* 2011; 5(7): 113-120.
- Cadenas E. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: Ahmad S, editor. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. USA: Chapman & Hall: 1995. 1-2.
- Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: Fibroblast collapse and Therapeutic Implications. *Arch Dermatol* 2008; 144(5): 666-672.
- Holbrook KA. Structure and Development of the Skin. In: Soter NA, Baden HP, editors. *Pathophysiology of dermatologic disease*. 2nd ed. USA: McGraw-Hill; 1991. 1-9.
- Kang BS, Seo JG, Lee GS, Kim JH, Kim SY, Han YW, et al. Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5

- against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne Vulgaris, and its therapeutic effect. *J. Microbiol* 2009; 47(1):101-109.
- Kim HS, Chae HS, Jeong SG, Ham JS, Im SK, Ahn CN et al. In vitro antioxidative properties of Lactobacilli. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 2006; 19(2): 262-5.
- Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 9-18.
- Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D et al. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chem* 2012; 135: 1914-1919.
- Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig Dis Sci* 2000; 45(1): 1617-22.
- Lin MY, Yen CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J Agric. Food Chem.* 1999; 47: 1460-1466.
- Marzio LD, Centi C, Cinque B, Masci S, Giuliani M, Arcieri A, et al. Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on stratum corneum ceramide levels and signs and symptoms of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* 2003; 12: 615-620.
- Messaoudi DF, Berger CN, Polter MHC, Moal VLL, Servin AL. pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of Probiotic Lactobacilli against *Salmonella enteric* Seroovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol* 2005; 71(10): 6008-13.
- Niyomploy P, Thunyakitpisal P, Karnchanatat A, Sangvanich P. Antioxidant activity and cell proliferation of crude polysaccharide from rhizome of *Curcuma aromatic* Salisb. Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Science, 2009 Mar 17-20; Bangkok, Thailand.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 82: 279-289.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Evans C R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231-1237.
- Satsue S, Thapphasaraphong S, Damrongrung-ruang T. Antioxidant and collagen stimulating activities in human gingival fibroblast cell culture of plant extracts, *IJPS* 2014 Jan; 9 (Suppl) : 38-43.
- Sekhon BS. Matrix metalloproteinases an overview. *Research and reports in biology* 2010; 1: 1-20.
- Shalaby EA, Shanab SMM. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 2013; 7(10): 528-539.
- Srisayam M, Weerapreeyakul N, Sribuarin P. In vitro antioxidant activity of white, black and red sesame seeds. *IJPS* 2014; 10(2): 136-146.
- Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant

activities of extracts from 21 plants. *BMC COMPLEM ALTERN M* 2009; 9(27): 1-11.

West CE, Hammarstrom ML, Hernell O. Probiotics during weaning reduce the incidence of eczema. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 430-7.

Zahedi F, Nasrabadi MH, Ebrahimi MT, Shabani M, Aboutalebi H. The effect of *lactobacillus brevis* isolated from Iranian traditional cheese on cutaneous wound healing in rats. *J Cell Anim Biol* 2011; 5(12): 265-70.