ผลของครีมโปรตีนกาวไหมต่อการสร้างคอลลาเจนและการรักษาแผลทางผิวหนังในหนูทดลอง

The Effect of Silk Sericin Protein on Collagen Production and Skin Wound Healing in Rats

พรอนงค์ อร่ามวิทย์ (Pornanong Aramwit)[1*]
วรรณี อังคศิริสรรพ (Wannee Angkasirisap)[2]
ธีระพล ศรีชนะ (Teerapol Srichana)[3]

บทคัดย่อ

โปรตีนกาวไหมหรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเซริซินสามารถสกัดจากรังไหมได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือการสกัดด้วยความร้อน ซึ่งจากการสกัดเซริซินจากรังไหมสายพันธุ์ไทยจำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลของเซริซินแตกต่างกันโดยมีน้ำหนักอยู่ในระหว่าง 35-150 kDa นอกจากนี้เซริซินในความเข้มข้น 0.2-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่เติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ผิวหนังหนูยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากเซลล์ได้อีกด้วย โดยประสิทธิภาพในการกระตุ้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ไหมที่ใช้สกัดเซริซิน จากการศึกษาพบว่าเซริซินจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 สามารถกระตุ้นได้สูงที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เซริซินจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20 และสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากเซลล์ได้สูงกว่าเซริซินจากไหมสายพันธุ์จุล 3/2 และ 4/2 ประมาณ 2.5 และ 1.5 เท่าตามลำดับ อีกทั้งจำนวนเซลล์และปริมาณคอลลาเจนยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเซริซินที่ถูกเติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำเซริซินที่สกัดได้จากสายพันธุ์จุล 1/1 มาเป็นส่วนผสมในครีมทาแผลพบว่าสามารถทำให้บาดแผลหายได้รวดเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Betadine® (ระยะเวลาในการหายของบาดแผลเป็น 12 และ 14 วันสำหรับครีมเซริซินและ Betadine® ตามลำดับ) หรือครีมเบส (ระยะเวลาในการหายของบาดแผลเป็น 12 และ 17 วันสำหรับครีมเซริซินและครีมเบส ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยไม่ก่อให้เกิดการแพ้หรือระคายเคือง อีกทั้งยังไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไตของสัตว์ทดลองหากมีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายเมื่อใช้ไปนาน 15 วัน

Abstract

Silk sericin protein can be extracted from silkworm cocoon by several methods such as high pressure and high temperature degumming techniques. Sericin extraction from 3 silk strains shows different molecular

[1]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
[2]*นักวิจัย สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล*
[3]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*
[*]*corresponding author, email: aramwit@gmail.com*

weights within the range of 35-150 kDa. Adding sericin at concentrations between 0.2-1.0 mg/mL into fibroblast cell culture medium shows that sericin can promote cell growth and collagen production. However, different silk strains can promote cell growth and collagen production at different levels and in a concentration dependent manner. Sericin from Chul 1/1 strain can promote cell growth and collagen production at the highest level. At a concentration of 1.0 mg/mL, sericin from Chul 1/1 strain can promote fibroblast cell growth at a minimum of 20% and also can activate collagen production 2.5 and 1.5 times higher than the levels activated by sericin from Chul 3/2 and 4/2 strain, respectively. Silk sericin from Chul 1/1 strain can significantly promote better healing in rats' wounds when compared to Betadine® (complete healing times are 12 and 14 days for wounds treated with sericin cream and Betadine®, respectively) or cream base alone (complete healing times are 12 and 17 days for wounds treated with sericin cream and cream base, respectively). Treatment with sericin cream shows no allergic reaction and renal as well as liver functions are normal after using sericin cream for 15 days.

คำสำคัญ: โปรตีนกาวไหมเซริซิน, สายพันธุ์ไหม, การรักษาบาดแผล
Keywords: Silk sericin, silk strain, wound healing

บทนำ

เส้นใยที่ได้จากตัวไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* มีส่วนประกอบหลักเป็นโปรตีน โดยมีโปรตีนอยู่ด้วยกัน 2 กลุ่มได้แก่ โปรตีนประเภทเส้นใย (fibroin protein) ที่ถูกสร้างมาจากต่อมบริเวณส่วนหลังของตัวไหม ซึ่งเป็นส่วนที่นำมาใช้ในการทอผ้า กลุ่มที่ 2 ได้แก่ โปรตีนที่มีคุณสมบัติเหนียวคล้ายกาวที่เคลือบอยู่รอบๆ เส้นไหม ส่วนนี้จะถูกล้างออกก่อนนำรังไหมมาสาวเป็นเส้นใยได้ โปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้ายกาวนี้ถูกสร้างมาจากต่อมบริเวณส่วนกลางของตัวไหมและรู้จักกันในนามของเซริซิน (sericin) โดยโปรตีนประเภทเส้นใยจะไม่สามารถละลายในตัวทำละลายส่วนใหญ่รวมถึงน้ำ กรด หรือด่างต่างๆ ในขณะที่เซริซินเป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ดีเนื่องจากมีหมู่ hydroxyl (-OH) เป็นส่วนประกอบอยู่ในโครงสร้างจำนวนมาก โดยทั่วไปโปรตีนกาวไหมเซริซินจะถูกทิ้งไปในธรรมชาติไปโดยไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ต่อ แต่จากผลการวิจัยทั้งในและต่างประเทศได้แสดงให้เห็นว่าเซริซินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกายอยู่จำนวนมาก ทำให้มีการนำเซริซินมาใช้ในเชิงพาณิชย์เพิ่มมากขึ้นโดยใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในเครื่องสำอางหรือเครื่องดื่มบำรุงร่างกายรวมทั้งอาหารเสริมต่างๆ จากผลของการวิจัยในเบื้องต้นได้มีการรายงานถึงคุณสมบัติของเซริซินในการต้านสารอนุมูลอิสระ (Dash et al., 2008) สามารถปกป้องผิวหนังจากรังสี UV (Zhaorigetu et al., 2003) เป็นตัวกักเก็บน้ำและเพิ่มความชุ่มชื้นของผิวหนัง (Padamwar et al., 2005) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Zhang., 2002) สามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์ผิวหนัง (fibroblast cells) (Minoura et al., 1995) ลดการเจริญเติบโตของเนื้องอกในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองได้ (Zhaorigetu et al., 2001) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับคุณสมบัติของเซริซินในทางการแพทย์มากขึ้น

เซริซินประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างน้อย 15 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20-220 kDa (Sprague, 1975) โดยเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กจะสามารถละลายได้ดีในน้ำเย็นส่วนพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่จะละลายได้ดีในน้ำร้อน

เนื่องจากมีงานวิจัยสนับสนุนว่าเซริซินสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้ดีซึ่งอาจมีผลต่อการหายของบาดแผล งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาประสิทธิผลของเซริซินที่สกัดได้จากไหมพันธุ์ไทยสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง คุณสมบัติของเซริซินในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนภายนอกร่างกาย (in vitro) และศึกษาผลของเซริซินต่อบาดแผลสดในหนู นอกจากนี้ยังติดตามอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้โปรตีนไหมเซริซินในการรักษาแผลอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

รังไหมและการสกัดเซริซิน

รังไหมสายพันธุ์ไทยจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จุล 1/1 สีขาว, สายพันธุ์จุล 3/2 สีเหลืองเขียว และสายพันธุ์จุล 4/2 สีเหลืองเข้มได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท จุลไหมไทย จำกัด ทำการสกัดโปรตีนกาวไหมโดยการใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave, SS-320, Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo, Japan) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที ในกรณีที่รังไหมมีสีจะถูกสกัดสีออกก่อนโดยใช้แอลกอฮอล์ (70% ethanol) หลังจากนั้นสารละลายเซริซินจะถูกทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง (lyophilization, Heto LL 3000 lyophilizer (Allrod, Denmark)) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการศึกษา

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเซริซิน

ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเซริซินโดยวิธีการแยกโปรตีนด้วยเครื่องเจลอิเลคโตรฟอเรซิสที่มีการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE gel electrophoresis) (Takasu et al, 2002) เซริซินจะถูกนำมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปอบที่ 98 องศาเซลเซียสนาน 2-3 นาทีและนำตัวอย่างไปบรรจุลงบนแผ่นเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5-20 (Atto Corporation, Tokyo, Japan) นำแผ่นเจลดังกล่าวไปแช่ใน running buffer ที่ประกอบด้วย tris base ในความเข้มข้น 125 mM, glycine 0.96 M และ SDS ร้อยละ 0.5 โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ เมื่อเสร็จสิ้นแล้วทำการย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย silver ตามลำดับ

การศึกษาค่าการละลายของเซริซิน

เนื่องจากเซริซินต้องถูกนำมาละลายเพื่อใช้ในการเตรียมครีม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาค่าการละลายของผงเซริซินที่อุณหภูมิห้องโดยการนำผงเซริซินปริมาณมากเกินค่าการละลายที่ประมาณไว้ใส่ในภาชนะบรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่าง ๆ กัน ปิดให้สนิทและนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสและเขย่าอย่างสม่ำเสมอนาน 30 นาที หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้มาทำการกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)

การศึกษาผลของเซริซินที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากหนังหนู (mouse fibroblast cell line L929, Chinese Academy of Preventive Medical Sciences, Beijing, China) ถูกเพาะเลี้ยงใน Dulbecco,s Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะ (100 U penicillin และ 100 U/ml streptomycin) ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอกไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2 วัน หลังจากนั้นเซลล์จะถูกถ่ายไปยังถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plate) ในจำนวน 5 x 10^5 เซลล์/หลุม เมื่อครบ 24 ชั่วโมงอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนและมีการเติมเซริซินในความเข้มข้นต่างๆ อันได้แก่ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย โดยกลุ่ม

ควบคุมกลุ่มที่ 1 จะไม่มีการเติมเซริซิน (negative control) เข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งจะได้รับเปปไทด์ที่เป็นพิษจากผึ้ง (melittin, toxic peptide) ในความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (positive control) หลังจากบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงจะประเมินการรอดชีวิตของเซลล์ (Mosmann, 1983) ด้วย 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay) โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร (Biohit 830, Biohit®, Helsinki, Finland) และคำนวณปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมเซริซิน ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งและวิเคราะห์ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติด้วย one-way ANOVA ที่ระดับ $p < 0.05$

การศึกษาคุณสมบัติของเซริซินในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ทำการศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากผิวหนังหนูเช่นเดียวกับการศึกษาผลของเซริซินที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่หลังจากที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมงแล้วมีการนำสารละลายส่วนใส (supernatant) มาทดสอบเพื่อหาปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยใช้ Sircol® collagen assay kit (Biocolor Ltd., Northern Ireland, UK) ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารละลายคอลลาเจนมาตรฐานที่สกัดจากเซรั่มของวัว (collagen type 1 standard จาก bovine serum, produced from USA disease free animals) ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งและวิเคราะห์ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติด้วย one-way ANOVA ที่ระดับ $p < 0.05$

การเตรียมเซริซินครีม

เซริซินครีมเตรียมในครีมเบสที่ประกอบด้วย white petrolatum, mineral oil, lanolin, glycerin, bisabolol, propylparaben และ methylparaben โดยเริ่มต้นจากการละลายเซริซินในน้ำร้อนและผสมในส่วนประกอบที่ละลายน้ำได้ในระหว่างการเตรียมครีม

การศึกษาประสิทธิภาพของเซริซินครีมในการรักษาบาดแผลในหนู

ทำการทดสอบในหนูอายุ 8 สัปดาห์น้ำหนัก 250 ± 5 กรัมจำนวน 18 ตัว โดยหนูแต่ละตัวจะถูกเลี้ยงแยกในกรงเฉพาะที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสและสามารถเข้าถึงน้ำและอาหารได้ตามต้องการ หนูทดลองทั้งหมดจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 9 ตัว แต่ละตัวจะได้รับการผ่าตัดผิวหนังบริเวณหลังตัวละ 2 แผลในขนาด 1.5 x 1.5 เซนติเมตร โดยมีการใช้ปากกากำหนดขนาดของแผลก่อนผ่าทุกครั้งและผ่าบาดแผลลึกถึงชั้นผิวหนังแท้ กลุ่มที่ 1 แผลด้านซ้ายจะได้รับการรักษาด้วย Betadine® (แผลควบคุม) ส่วนแผลด้านขวาจะได้รับการรักษาด้วยครีมเซริซิน (แผลทดลอง) ในกลุ่มที่ 2 แผลด้านซ้ายจะได้รับการรักษาด้วยครีมเบส (ครีมที่มีส่วนประกอบทุกตัวเหมือนครีมเซริซิน แต่ไม่มีเฉพาะเซริซินเป็นองค์ประกอบอยู่, แผลควบคุม) ส่วนแผลด้านขวาจะได้รับการรักษาด้วยครีมเซริซินเช่นเดียวกับในกลุ่มที่ 1 (แผลทดลอง) ในระหว่างการผ่าตัดหนูทุกตัวจะถูกทำให้สลบด้วย Zoletil 100® (Virbac, Carros, France) ในขนาด 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นอกจากนี้ยังได้รับการฉีดยาป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย (Baytril®, enrofloxacin, Bayer) เข้าใต้ผิวหนังในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และเพื่อลดความเจ็บปวดของสัตว์ทดลองหนูทุกตัวจะได้รับ Rimadyle® (carprofen, Pfizer) ในขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมทุก 24 ชั่วโมงติดต่อกัน 5 วัน หนูทุกตัวจะถูกชั่งน้ำหนักและทุกแผลจะได้รับการทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อพร้อมสังเกตุลักษณะของบาดแผลหรืออาการแพ้ที่เกิดขึ้นกับผิวหนังโดยสัตวแพทย์ทุกวัน หลังจากนั้นจะได้รับการรักษาด้วยครีมหรือ Betadine® โดยทาหลังทำความสะอาดบาดแผลวันละ 1 ครั้งติดต่อกันทุกวันจนครบ 15 วัน โดยในวันที่ 0 และ 15

จะทำการเก็บเลือดของสัตว์ทดลองเพื่อนำไปทดสอบการทำงานของตับ (ตรวจวัดค่า aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, และ alkaline phosphatase) และไต (ตรวจวัดค่า blood urea nitrogen และ creatinine) ด้วยวิธีดำเนินการวิจัยในสัตว์ทดลองนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในสัตว์ทดลอง สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

การวัดขนาดแผลในสัตว์ทดลอง

แผลจะถูกวัดขนาดโดยใช้เครื่อง stereomicroscope (Carl Zeiss® (Oberkochen, Germany), Primo Star Model, 0.3x0.65) และถูกถ่ายภาพด้วย Moticcam 2300 หลังจากนั้นภาพจะถูกวิเคราะห์ด้วย Motic Images Plus 2.0 ML

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ภาพที่ 1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของเซริซินสายพันธุ์จุล 1/1, 3/2 และ 4/2 ที่สกัดด้วยความร้อน จะเห็นได้ว่าเซริซินที่สกัดด้วยความร้อนจะมีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาดผสมกันอยู่ ไม่เห็นเป็นแถบชัดเจนเมื่อแยกด้วยเจล นอกจากนี้ยังมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันเมื่อสกัดจากต่างสายพันธุ์ โดยเซริซินที่สกัดได้จากสายพันธุ์ 1/1, 3/2 และ 4/2 มีน้ำหนักโมเลกุล 35-150, 35-100 และ 35-75 kDa ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม น้ำหนักโมเลกุลของเซริซินที่ได้มีความสอดคล้องกับที่รายงานโดยนักวิจัยอื่น (Sprague, 1975) ที่ระบุว่าเซริซินประกอบไปด้วยโปรตีนย่อยๆ หลายตัวที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20-220 kDa

จากการศึกษาผลของเซริซินที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (ภาพที่ 2) พบว่าเซริซินที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมทุกสายพันธุ์ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.2-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเซริซินที่สกัดจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ในทุกความเข้มข้นอีกด้วย โดยเซริซินที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซริซินจากสายพันธุ์เดียวกันทุกความเข้มข้น และจากการศึกษาปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen Type I) ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่พบมากในผิวหนัง ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์หลังจากกระตุ้นด้วยเซริซิน (ภาพที่ 3) พบว่าเซริซินที่ได้จากรังไหมทุกสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการสร้างของคอลลาเจนได้ โดยปริมาณคอลลาเจนที่ถูกผลิตขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของเซริซินที่ถูกเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สกัดได้จากสายพันธุ์จุล 1/1 และ จุล 3/2 ในขณะที่เซริซินจากสายพันธุ์จุล 4/2 ไม่มีความแตกต่างในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นก็ตาม นอกจากนี้เซริซินที่สกัดจากไหมสายพันธุ์ต่างกันยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้ในปริมาณที่แตกต่างกันโดยสายพันธุ์จุล 1/1 สามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น

ตารางที่ 1 แสดงค่าการละลายของผงเซริซินที่สกัดได้จากไหมสายพันธุ์ต่างๆ กันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ณ อุณหภูมิห้องที่ pH ต่างๆ กัน จะเห็นได้ว่าผงเซริซินที่สกัดได้จากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 มีค่าการละลายสูงสุดในทุก pH เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ และเนื่องจากคุณสมบัติในการละลายที่ดีและความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ทำให้เซริซินจากสายพันธุ์ 1/1 ได้ถูกนำมาใช้ในการเตรียมครีมเซริซินเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 4 แสดงบาดแผลหนูในกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ได้รับการรักษาด้วย Betadine® (ภาพ A), รักษาด้วยครีมเซริซิน (ภาพ B) ในหนูตัวเดียวกัน และได้รับการรักษาด้วยครีมเบส (ภาพ C), รักษาด้วยครีมเซริซิน (ภาพ D) จากหนูตัวเดียวกันในวันที่ 5 จะเห็นได้ว่าขนาดของแผลในหนูที่ได้รับการรักษาด้วยครีมเซริซินมีขนาดของแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ขนาดแผลเท่ากับ 56.84 และ 82.96 ตารางมิลลิเมตร ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับขนาดแผลที่ได้รับการรักษาด้วย Betadine® และ

ครีมเบส เป็น 63.6 และ 137.5 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทำการวัดขนาดแผลของสัตว์ทดลองทุกตัวในกลุ่มเดียวกันเพื่อคำนวณหาจำนวนวันที่ขนาดแผลลดลงร้อยละ 50 และ 90 จากขนาดของบาดแผลเริ่มต้นและจำนวนวันที่บาดแผลหายสนิท จะได้ข้อมูลดังแสดงในภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าบาดแผลที่ได้รับการรักษาด้วยครีมเซริซินหายเร็วกว่าบาดแผลที่ได้รับการรักษาด้วยครีมเบสและ Betadine® อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

นอกจากการศึกษาในด้านประสิทธิภาพของเซริซินในการรักษาบาดแผลแล้ว ยังได้มีการติดตามอาการไม่พึงประสงค์อื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ครีมเซริซิน เนื่องจากบาดแผลที่ใช้ทดสอบเป็นบาดแผลเปิดที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับพื้นที่ผิวหนังของสัตว์ทดลอง อีกทั้งบาดแผลยังมีความลึกซึ่งอาจทำให้เกิดการดูดซึมของโปรตีนเซริซินเข้าสู่ร่างกาย ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ตรวจวัดประสิทธิภาพการทำงานของตับ (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, และ alkaline phosphatase) และไต (blood urea nitrogen และ creatinine) จากเลือดในสัตว์ทดลองที่ได้รับการรักษาในวันที่ 0 และ 15 (ตารางที่ 2) ด้วยนอกเหนือจากการสังเกตอาการอักเสบของผิวที่บาดแผล จากการศึกษาผลของการใช้ครีมเซริซินในการรักษาแผลเปิดพบว่า ค่าการทำงานของตับและไตไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนใช้ยา (วันที่ 0) และหลังจากใช้ยาไปแล้ว 15 วัน (p>0.05) อีกทั้งสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่มยังมีค่าการทำงานของตับและไตไม่แตกต่างกันด้วย (p>0.05) จากการสังเกตุบาดแผลภายนอกโดยสัตวแพทย์พบว่าบาดแผลที่ได้รับการรักษาด้วยครีมเซริซินไม่แสดงอาการผิดปกติอันเนื่องมาจากการแพ้หรืออักเสบในสัตว์ทดลองตัวใดเลย สัตว์ทดลองทุกตัวสามารถรับประทานอาหารได้ตามปกติมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าครีมโปรตีนไหมเซริซินไม่ก่อให้เกิดการอักเสบหรือการแพ้ในสัตว์ทดลอง และหากมีการดูดซึมของเซริซินเข้าสู่ร่างกาย เซริซินยังไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไตในสัตว์ทดลองอีกด้วย ดังนั้นโปรตีนกาวไหมเซริซินอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในยารักษาแผลสดที่มีประสิทธิภาพ

สรุปผลการทดลอง

เซริซินที่ถูกเติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์สร้างเส้นใยในหนูสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ โดยประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการสร้างคอลลาเจนมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ไหมที่นำมาใช้สกัด เมื่อนำเซริซินมาทำให้อยู่ในรูปแบบครีมจะสามารถเพิ่มอัตราการหายของบาดแผลได้โดยไม่ก่อให้เกิดการแพ้ ระคายเคือง หรือภาวะผิดปกติอันเนื่องมาจากการทำงานของตับและไต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Dash, R., Acharya, C., Bindu, P.C.and Kundu, S.C. 2008. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. **BMB Rep** 41(3):236-241.

Minoura, N., Aiba, S., Gotoh, Y., Tsukada, M.and Imai, Y. 1995. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. **J Biomed Mater Res** 29(10):1215-1221.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 65(1-2):55-63.

Padamwar, M.N., Pawar, A.P., Daithankar, A.V.and Mahadik, K.R. 2005. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. **J Cosmet Dermatol** 4(4):250-257.

Sprague, K. 1975. The Bombyx mori silk proteins: characterization of large polypeptides. **Biochemistry** 14:925-931.

Takasu, Y., Yamada, H.and Tsubouchi, K. 2002. Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, Bombyx mori. **Biosci Biotechnol Biochem** 66(12):2715-2718.

Zhang, Y.Q. 2002. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnol Adv** 20(2):91-100.

Zhaorigetu, S., Sasaki, M., Watanabe, H.and Kato, N. 2001. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. **Biosci Biotechnol Biochem** 65(10):2181-2186.

Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H.and Kato, N. 2003. Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. **J Photochem Photobiol B** 71(1-3):11-17.

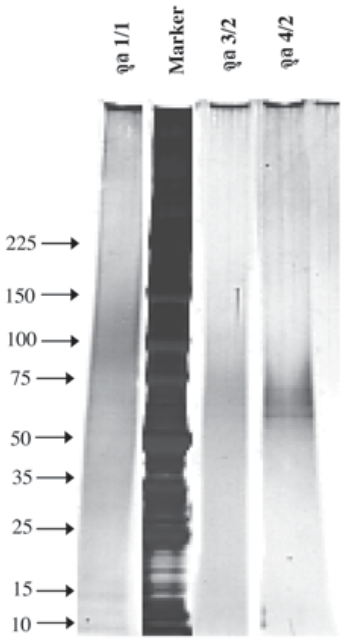
ตารางที่ 1. ค่าการละลายของผงเซริซินที่สกัดได้จากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ณ อุณหภูมิห้องที่ pH ต่าง ๆ กัน (n = 6)

	ค่าการละลาย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
pH	**4.0**	**5.0**	**7.0**	**8.0**
จุล 1/1	33.84	29.20	28.73	26.20
จุล 3/2	4.39	21.74	17.87	24.41
จุล 4/2	30.74	12.48	26.75	27.76

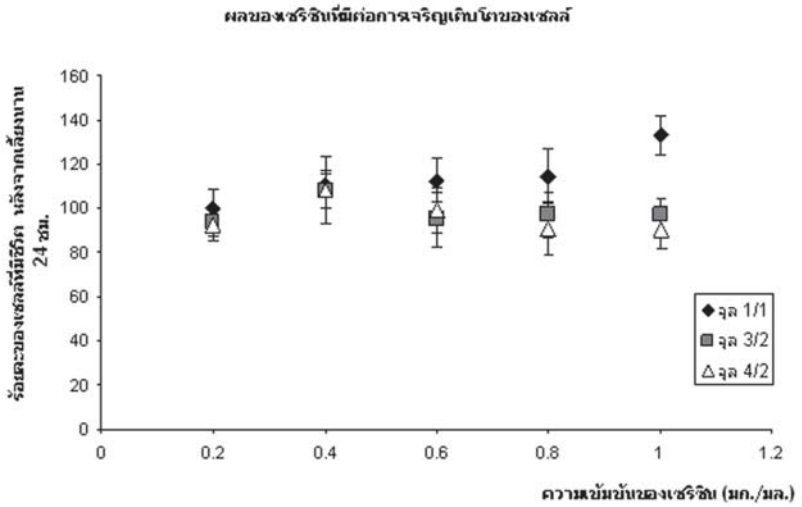
ตารางที่ 2. ค่าการทำงานของตับและไตในสัตว์ทดลองหลังได้รับครีมในวันที่ 0 และ15 (mean ± SD, n = 3)

กลุ่มที่/วันที่	**BUN (mg/dL)**	**Creatinine (mg/dL)**	**AST (U/L)**	**ALT (U/L)**	**ALP (U/L)**
1/0	24.65±2.14	0.32±0.04	116.17±29.12	45.05±5.78	148.50±13.77
1/15	23.93±1.20	0.36±0.04	123.38±6.83	49.12±4.21	152.33±16.00
2/0	24.20±1.14	0.31±0.02	138.62±26.56	51.97±2.93	143.83±8.98
2/15	25.83±2.29	0.34±0.04	141.83±27.62	48.81±14.21	144.71±13.70

BUN = blood urea nitrogen, AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase

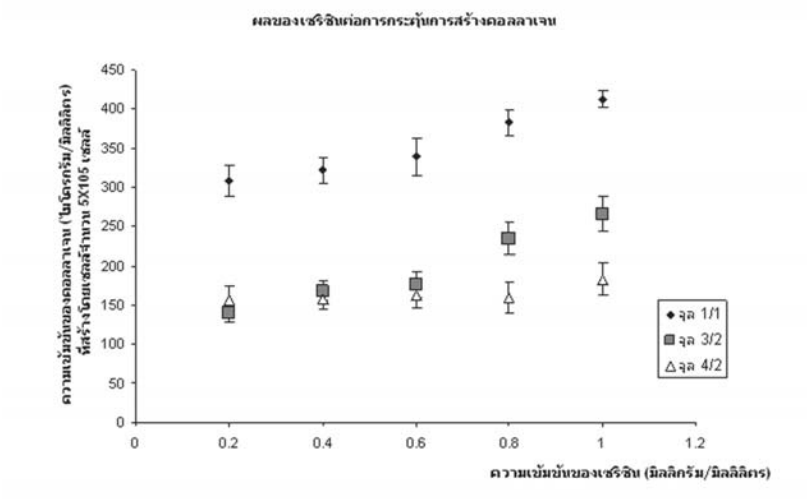


ภาพที่ 1. น้ำหนักโมเลกุลของเซริซินที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมสายพันธุ์ จุล 1/1, จุล 3/2 และ จุล 4/2 บนแผ่นเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5-20

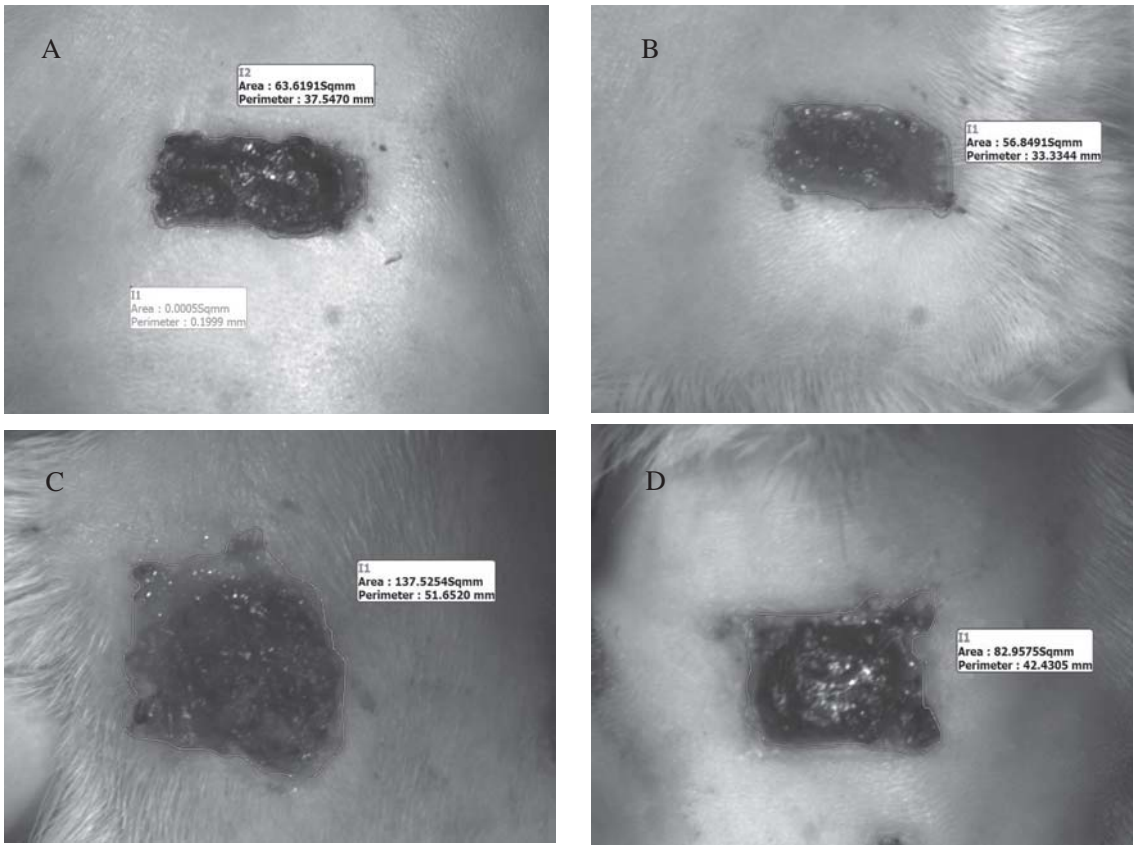


ภาพที่ 2. ผลของเซริซินจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู เมื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

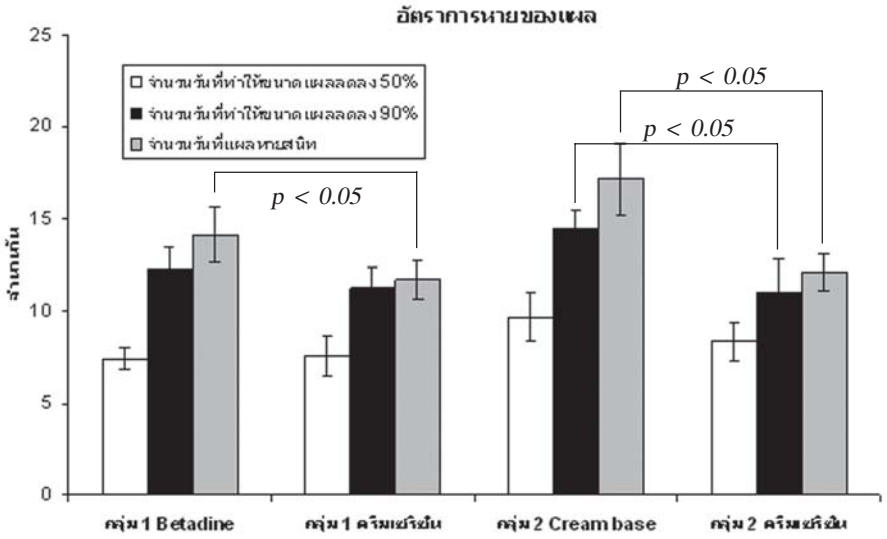
* แสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับผลของเซริซินที่ได้จากไหมสายพันธุ์อื่น ๆ



ภาพที่ 3. การศึกษาปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนูหลังจากกระตุ้นด้วยเซริซินในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เมื่อทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง



ภาพที่ 4. ภาพแสดงบาดแผลจากผิวหนังหนูที่ได้รับการรักษาด้วย Betadine® (A), ครีมเซริซิน (B), ครีมเบส (C) และ ครีมเซริซิน (D) หลังจากได้รับการรักษานาน 5 วัน



ภาพที่ 5. ผลของเซริซินเปรียบเทียบกับครีมเบสและยา Betadine® ต่อการหายของบาดแผลในหนูทดลอง