

การประเมินฤทธิ์ชะลอความแก่ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในหลอดทดลอง

นางสาว วรอนงค์ พุกยากิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IN VITRO EVALUATION OF ANTI-AGING ACTIVITY OF
ARTOCARPUS LAKOOCHA HEARTWOOD EXTRACT

Miss Woraanong Prugsakij

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacy

Department of Pharmacy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492142

Thesis Title *IN VITRO* EVALUATION OF ANTI-AGING
ACTIVITY OF *ARTOCARPUS LAKOOCHA*
HEARTWOOD EXTRACT
By Miss Worranong Prugsakij
Field of Study Pharmacy
Thesis Advisor Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University
in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

.....*Pornpen Pramyothin*.....Dean of the Faculty of
Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....*Porntip Nimmannitya*.....Chairman
(Associate Professor Porntip Nimmannitya)

.....*Parkpoom Tengamnuay*.....Thesis Advisor
(Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

.....*Adisak Wongkajornsilp*.....Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Adisak Wongkajornsilp, Ph.D.)

.....*Vimolmas Lipipun*.....Member
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

.....*Vipaporn Panapisal*.....Member
(Vipaporn Panapisal, Ph.D.)

วรอนงค์ พฤตษากิจ: การประเมินฤทธิ์ชะลอความแก่ของสารสกัดจากแก่นมะหาดในหลอดทดลอง. (*IN VITRO EVALUATION OF ANTI-AGING ACTIVITY OF ARTOCARPUS LAKOOCHA HEARTWOOD EXTRACT*)

อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ, 162 หน้า

สารสกัดจากแก่นมะหาด หรือปวกหาด และสารสำคัญ คือสารออกซีเรสเวอราทรอล ซึ่งเป็นที่รู้จักแล้วว่า มีฤทธิ์อย่างแรงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สารทั้งคู่มักจะถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเครื่องสำอางที่ใช้กับผิวหนัง วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ ประเมินฤทธิ์ชะลอความแก่และกลไกต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องของปวกหาด และสารออกซีเรสเวอราทรอลในหลอดทดลอง รวมถึงผลแบ่งตัวและความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยง และความเป็นไปได้ที่จะป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (รังสียูวีเอ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ซึ่งสามารถทำให้ดีเอ็นเอและเซลล์ถูกทำลาย เช่นเดียวกับความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส ซึ่งผลที่ได้จะเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้กันทั่วไป เช่น อีพิกัลโลแคททีชิน (อีจีซีจี), สารสกัดเปลือกสนฝรั่งเศส (เปลือกสน), วิตามินซี และโทรลอกซ์ ผลของปวกหาดและสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีที และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลต่อการแบ่งตัวจะค่อย ๆ ลดลงจนเกิดความเป็นพิษที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในสารที่นำมาทดสอบทุกตัว ยกเว้น เปลือกสน และโทรลอกซ์ สารต้านอนุมูลอิสระทุกตัวมีฤทธิ์คล้ายกันในการป้องกันเซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ยกเว้นวิตามินซี สามารถป้องกันได้ถึงเพียงที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการป้องกันการถูกทำลายจากรังสียูวีเอ วิตามินซีมีฤทธิ์การป้องกันสูงสุด โดยสามารถป้องกันได้ในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่ปวกหาด และสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นมีฤทธิ์คล้ายกัน โดยจะได้อยู่ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การประเมินผลของการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยวิธีแอลดีเอช พบว่าปวกหาด, สารออกซีเรสเวอราทรอล, เปลือกสน และโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าแอลดีเอชเท่ากันภายใต้รังสียูวีเอ ขณะที่วิตามินซีให้ค่าสูงสุด ตามด้วยอีจีซีจี จากการทดลองได้พบอีกว่าปวกหาดและสารออกซีเรสเวอราทรอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ดี โดยมีค่า IC_{50} คือ 58.8 และ 153.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแรงน้อยกว่าอีจีซีจี (8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเปลือกสน (21.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่แรงมากกว่าวิตามินซี (1.331 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และโทรลอกซ์ (2.348 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ ทั้งปวกหาดและสารออกซีเรสเวอราทรอล ช่วยลดการถูกทำลายของดีเอ็นเอจากรังสียูวีเอได้ด้วย โดยใช้วิธีวัดโพลีไซโตเมตรี โดยสรุปแล้ว ด้วยคุณสมบัติมากมายของสารสกัดจาก *A. lakoocha* ทำให้เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อสุขภาพ

ภาควิชา เกษัชกรรม..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา..... เกษัชกรรม..... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา..... 2549..... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4676592433 : MAJOR PHARMACY

KEY WORD: *ARTOCARPUS LOKOOCHA* / PUAG-HAAD / MA-HAAD /

ANTIOXIDANT / ANTI-AGING / ANTI-COLLAGENASE

WORAANONG PRUGSAKIJ: *IN VITRO* EVALUATION OF ANTI-AGING
ACTIVITY OF *ARTOCARPUS LAKOOCHA* HEARTWOOD EXTRACT.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D.,
162 pp.

Artocarpus lakoocha heartwood extract, locally called Puag-Haad, and its main active constituent oxyresveratrol are known to be a potent tyrosinase inhibitor and antioxidant, given them promising potential for use in dermatological and cosmetic products. The primary objectives of this study were to evaluate Puag-Haad and oxyresveratrol for their anti-aging activities and relevant mechanisms based on several *in vitro* assays, including proliferative/cytotoxic effects on cultured fibroblasts and possible protection against oxidative stress (UV-A and hydrogen peroxide) - induced DNA and cell damages, as well as their anti-collagenase activity. The results were compared with commonly used antioxidants, i.e., epigallocatechin gallate (EGCG), French pine bark extract (pine bark), L-ascorbic acid and Trolox[®]. Puag-Haad and all other antioxidants were found to stimulate the fibroblast proliferation in a 25 – 50 µg/mL range based on the MTT assay. As the concentration was increased to 100 µg/mL, the proliferative effect slightly decreased and became cytotoxic at 250 µg/mL for all antioxidants except for pine bark and Trolox[®]. All the test antioxidants were also capable of similarly protecting the fibroblasts against H₂O₂-induced cell damages at all studied concentrations (25, 50 and 100 µg/mL) except for L-ascorbic acid which could provide protection only at 25 µg/mL. Regarding the protection against UV-A radiation, L-ascorbic acid was the most effective, providing significant protection at all concentrations (25, 50 and 100 µg/mL), whereas Puag-Haad and other antioxidants similarly provided partial protection mainly at 100 µg/mL. Evaluation of fibroblast membrane irritation based on the LDH assay revealed that Puag-Haad, oxyresveratrol, pine bark and Trolox[®] at 100 µg/mL, appeared to produce equally low LDH release under UV-A, whereas L-ascorbic acid gave the highest release followed by EGCG. Puag-Haad and oxyresveratrol also showed a good anti-collagenase activity, with the respective mean IC₅₀ of 58.8 and 153.1 µg/mL, which were less potent than EGCG (8.0 µg/mL) and pine bark (21.9 µg/mL) but much more potent than L-ascorbic acid (1.331 mg/mL) and Trolox[®] (2.348 mg/mL). Moreover, both Puag-Haad and oxyresveratrol could reduce the extent of DNA damages caused by UV-A as detected by flow cytometry. In conclusion, the multi-functional beneficial effects of *A. lakoocha* extracts may have a strong potential uses in cosmetics and other health-related products.

Department.....Pharmacy.....Student Signature.....

Field of Study.....Pharmaceutics..... Advisor's Signature.....

Academic Year.....2006.....Co-advisor's Signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The success of my thesis would not be realized without the valuable support and assistance of many people who have made their kind contributions to the study.

The completion of this thesis would have not been possible without the advice, continual support and the devoted concentration of Associate Professor Dr. Parkpoom Tengamnuay, my major adviser. I also appreciate the valuable suggestion and tremendous encouragement by my co-advisor, Assistant Professor Dr. Adisak Wongkajornsilp. I am sincerely grateful to both of them, who have helped me achieve such an outstanding success.

I am also profoundly thankful to Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for her warm support, kindness, and invaluable advice about cell culture techniques.

Special thanks to the thesis committee for their constructive suggestions and valuable comments. I am deeply thankful to Mr. Sukit huabprasert of the Siriraj Hospital for his assistance in cell culture experiments and Mr. Noppadol Sa-ard-iam of the immunology laboratory, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for his flow cytometric analysis.

A special acknowledgement is extended to the Department of Pharmacy, Chulalongkorn University for the support of equipment and location in this study. I also want to express special thanks to my friends for their moral support and warm encouragement during my study. Sincere thanks are also given to all staff members of the Department of Pharmacy and other people whose names have not been mentioned here for their assistance and great helpful support.

Finally, I am particularly indebted to my family for their love and inspiration. I would like to thank them for their continuous care throughout my study.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	5
<i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb.....	5
Aging and the Skin.....	9
Antioxidant Mechanisms.....	28
Cell Culture.....	34
Flow cytometry as a tool to detect DNA damage and death.....	36
III MATERIALS AND METHODS.....	41
Crude Drug and oxyresveratrol.....	41
Cell Culture.....	41
Materials.....	42
Reference antioxidants.....	42
Apparatus.....	42
Methods.....	44
IV RESULTS AND DISSCUSSION.....	63
1. Effects of <i>Artocarpus lakoocha</i> heartwood extract (Puag-Haad) and its active constituent (oxyresveratrol) on fibroblast proliferation and cytotoxicity.....	63
1.1 Proliferation assay.....	63
1.2 Cytotoxic assay.....	71

2. Evaluation of the ability of <i>Artocarpus lakoocha</i> heartwood extract (Puag-Haad) and its active constituent oxyresveratrol to reduce oxidative stress-induced cell damages.....	78
2.1 Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) – induced cell damages.....	78
2.2 MTT assay of ultraviolet –induced cell damages and Effect of antioxidants.....	85
2.3 Effect of antioxidants on UV-A induced LDH leakage.....	92
3. Effect of <i>Artocarpus lakoocha</i> heartwood extract (Puag-Haad) and its active constituent (oxyresveratrol) on the reduction of DNA damage in cells exposed to UV-A.....	96
4. Evaluation of <i>Artocarpus lakoocha</i> heartwood (Puag-Haad) for anti-collagenase enzyme activity and active constituent (oxyresveratrol) from aqueous extract of <i>Artocarpus lakoocha</i> heartwood (Puag-Haad).....	106
V CONCLUSIONS.....	116
REFERENCES.....	120
APPENDICES.....	130
Appendix A.....	131
Appendix B.....	133
Appendix C.....	138
Appendix D.....	143
Appendix E.....	148
Appendix F.....	153
Appendix G.....	157
Appendix H.....	160
VITA.....	162

LIST OF TABLES

Table	Page
1 The matrix metalloproteinase family.....	27
2 Data of standard curve between absorbance (OD) and cell number.....	62
3 Data were interpolated from linear regression.....	63
4 OD values and number of viable cells interpolated from the standard curve following incubation of fibroblast cells in the presence of various antioxidants at 0, 10, 25 and 50 µg/ml.....	65
5 Data of standard curve between absorbance (OD) and cell number.....	70
6 Data were interpolated from linear regression.....	71
7 OD values and number of viable cells interpolated from the standard curve of the MTT assay following incubation of fibroblast cells in the presence of various antioxidants at 0, 25, 100 and 250 µg/ml.....	72
8 Data of standard curve between absorbance (OD) and cell number.....	77
9 Data were interpolated from linear regression.....	78
10 OD values and number of viable fibroblasts remaining after 2-hrs treatment with mixture of 2 mM H ₂ O ₂ and different antioxidants using MTT assay.....	80
11 Data of standard curve between absorbance (OD) and cell number.....	84
12 Data were interpolated from linear regression.....	85
13 OD values and number of viable fibroblasts remaining after UV-A irradiation in the presence of different antioxidants using MTT assay.....	88
14 Percent LDH release from normal human fibroblasts following exposure to UV-A (20 J/cm ²) with and without antioxidant pretreatment (Mean ± SD, n = 3).....	93
15 Percent LDH release from normal human fibroblasts following exposure to Puag-Haad and EGCG without UV-A (Mean ± SD, n = 3).....	93
16 Collagenase inhibition of Puag-Haad compared to other antioxidants at various concentrations (Mean ± SD, n = 3).....	98

Table	Page
17 The IC_{50} values of the collagenase inhibition of each antioxidant, and R^2 (Regression coefficient) of the correlation inhibition percentage and the concentrations calculated from polynomial regression.....	98
18 Inhibitory effect of Puag-Haad on collagenase compared to other antioxidants at various concentrations (Mean \pm SD, n = 3).....	106
19 IC_{50} values of collagenase inhibition of each antioxidant. The regression coefficient (R^2) of the polynomial regression equation between percent inhibition and antioxidant concentration are also provided.....	109

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 <i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. (Ma-Haad).....	6
2 Chemical structure of oxyresveratrol or 2, 4, 3', 5' –tetrahydroxystilbene.....	6
3 Basic structure of the skin.....	18
4 Free radicals formation and its deleterious effects.....	24
5 Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs).....	25
6 Diminishing radical-induced cell damage; a=radical formation prevention; b=radical scavenging; c=repair of radical-induced damage.....	28
7 Structure of vitamin C, Vitamin E, Trolox [®] , EGCG and French pine bark....	30
8 Microplate reader, Model 450.....	46
9 The principle of the cytotoxicity detection kit (LDH).....	53
10 The Victor ³ [®] multilable plate reader.....	53
11 Becton and Dickinson FACSCalibur flow cytometer.....	56
12 Standard curve from the relationship between OD and cell number.....	63
13 Histogram comparing the number of viable cells following incubation of fibroblasts with different antioxidants at 0, 10, 25 and 50 µg/ml (data = mean ± SD, n = 3).....	66
14 Histograms comparing percentage of viable fibroblasts relative to control (100%) among different antioxidants (Data = mean ± SD, n = 3).....	69
15 Standard curve from the relationship between OD and cell number.....	70
16 Histogram comparing the number of viable cells following incubation of fibroblasts with different antioxidants at 0, 25, 100 and 250 µg/ml (data = mean ± SD, n = 3).....	73
17 Histograms comparing percentage of viable fibroblasts relative to control (100%) among different antioxidants (Data = mean ± SD, n = 3).....	76
18 Standard curve from the relationship between OD and cell number.....	78
19 Histograms comparing percentage of viable fibroblasts relative to control (100 %) after exposure to 2 mM H ₂ O ₂ with and without antioxidants (Data = mean ± SD, n = 3).....	81

Figure	Page
20 Histogram comparing the number of viable cells following incubation of fibroblasts with mixture of 2 mM H ₂ O ₂ and different antioxidants at 0 (control), 25, 50 and 100 µg/ml. The number of cells without H ₂ O ₂ and antioxidant co-treatment was also provided for comparison (untreated group) (Data = mean ± SD, n = 3).....	83
21 Standard curve from the relationship between OD and cell number.....	84
22 Histograms comparing percentage of viable fibroblasts relative to control (100%) after UV-A irradiation with and without antioxidants (Data = mean ± SD, n = 3).....	90
23 Histogram comparing the number of viable cells following irradiation of fibroblasts with UV-A (20 J/cm ²) in the presence of different antioxidants at 0 (control), 25, 50 and 100 µg/ml. The number of cells without UV-And antioxidant was also provided for comparison (untreated group) (Data = mean ± SD, n = 3).....	89
24 Plot % LDH release from fibroblasts following exposure to UV-A with and without antioxidant pretreatment. (Data = mean ± SD, n = 3).....	94
25 Representative DNA histograms after flow cytometric analysis showing the effect of UV-A irradiation, with and without antioxidant pretreatment, on the amount of fibroblasts in the non-viable state (subG ₀ /G ₁) and in various phases of cell division cycle (G ₀ /G ₁ , S, G ₂ /M phases). (A) = untreated cells (no UV-A); (B) = control (UV-A only). (C) = UV-A with 25 µg/mL Puag-Haad; (D) = UV-A with 50 µg/mL Puag-Haad. (E) = UV-A with 25 µg/mL oxyresveratrol; (F) = UV-A with 50 µg/mL oxyresveratrol.....	99
26 Histograms comparing percentages of fibroblasts in the subG ₀ /G ₁ phase following UV-A irradiation with and without antioxidant pretreatment. (A) = Puag-Haad 25 and 50 µg/mL; (B) = oxyresveratrol 25 and 50 µg/mL. Untr. = untreated cells (no UV, no antioxidant). Data are mean ± SD of three independent experiments.....	102

Figure	Page
27 Histograms comparing percentages of fibroblasts in the G ₀ /G ₁ phase following UV-A irradiation with and without antioxidant pretreatment. (A) = Puag-Haad 25 and 50 µg/mL; (B) = oxyresveratrol 25 and 50 µg/mL. Untr. = untreated cells (no UV, no antioxidant). Data are mean ± SD of three independent experiments.....	103
28 Percent collagenase inhibition as a function of Puag-Haad concentration compared to other antioxidants (mean ± SD, n = 3).....	107
29 Plots between percent collagenase inhibition and concentration of the individual antioxidants (mean ± SD, n = 3).....	108
30 Actual curve (dotted line) and regression curve (solid line) of the initial portion of % collagenase inhibition - concentration profile of each antioxidant. The polynomial regression equation for determining the IC ₅₀ and the regression coefficient (R ²) values are also provided for the individual antioxidants.....	110
31 Histogram comparing the mean IC ₅₀ values (mg/mL) for collagenase inhibition among the six antioxidants (mean ± SD, n = 3).....	112
32 Histograms comparing percent collagenase inhibition of the six antioxidants at each concentration (mean ± SD, n = 3).....	114

LIST OF ABBREVIATIONS

%	=	percentage
°C	=	degree of Celcius
µg	=	microgram
µL	=	microliter
µM	=	micromolar
abs	=	absorbance
ANOVA	=	analysis of variance
cm	=	centimeter
CO ₂	=	carbon dioxide
conc.	=	concentration
DI	=	de-ionized
diam.	=	diameter
DMEM	=	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DPPH	=	1,1-diphenyl-2-picrylhadraine
e.g.	=	example gratia, for example
<i>et al.</i>	=	et alii, and other
<i>etc.</i>	=	et cetera
FBS	=	fetal bovine serum
g	=	gram
H ₂ O	=	water
H ₂ O ₂	=	hydrogen peroxide
HCl	=	hydrochloric acid
HO [·]	=	hydroxyl radical
hr	=	hour
IC ₅₀	=	median inhibitory concentration
LDH	=	lactate dehydrogenase
m	=	meter

mg	=	milligram
min	=	minute
mL	=	milliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
MMPs	=	matrix metalloproteinases
MTT	=	3- (4, 5-dimethylthiazolyl-2) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide
nm	=	nanometer
no.	=	number
$O_2^{\cdot-}$	=	superoxide anion
OD	=	optical density
PBS	=	phosphate buffer solution
pH	=	The negative logarithm of the hydrogen ion concentration
PI	=	propidium iodide
R^2	=	coefficient of determination
RNase	=	ribonuclease
ROS	=	reactive oxygen species
rpm	=	revolution per minute
SD	=	standard deviation
TIMPs	=	tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
U	=	unit
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume