ผลของสารแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน

นายสมศักดิ์ ชยาวิวัฒนาวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเวชศาสตร์ช่องปาก ภาควิชาเวชศาสตร์ช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-097-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

27 ส.ค. 2546
I19515236

EFFECT OF CAPSAICIN ON HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS IN CULTURE

Mr. Somsak Chayavivattanavonk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Oral Medicine

Department of Oral Medicine

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic year 2000

ISBN 974-346-097-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน
โดย	นายสมศักดิ์ ชยาวิวัฒนาวงศ์
ภาควิชา	เวชศาสตร์ช่องปาก
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง กฤษณา อิฐรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. สมพร สวัสดิสรรพ์

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดี คณะทันตแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ สุรสิทธิ์ เกียรติพงษ์สาร)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ. วิไลวรรณ อเนกสุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ทพญ. กฤษณา อิฐรัตน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทพญ. ดร. สมพร สวัสดิสรรพ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทพญ. ดร. วันดี อภิณหสมิต)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ทพ. ดร. สุกิจ ภัทรมาลัย)

สมศักดิ์ ชยาวิวัฒนาวงศ์ : ผลของสารแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน
(EFFECT OF CAPSAICIN ON HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS IN CULTURE)
อ. ที่ปรึกษา : รศ. ทพญ. กฤษณา อิฐรัตน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ทพญ. ดร. สมพร สวัสดิสรรพ์;
92 หน้า. ISBN 974-346-097-7.

แคปไซซินเป็นสารให้ความเผ็ดที่พบได้ทั่วไปในพืชตระกูลพริก ซึ่งในปัจจุบันมีการนำมาใช้เป็นสารระงับปวดในทางการแพทย์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแคปไซซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และระยะเวลาต่าง ๆ กันต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์และลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน ในการศึกษานี้ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมไปกับการทำ MTT assay การใช้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เป็นวิธีการหลักในการศึกษา โดยความเข้มข้นของแคปไซซินที่ใช้ทดสอบได้แก่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002, 0.003, 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 และศึกษาผลของแคปไซซินที่ระยะเวลา 6, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาโดยใช้ MTT assay พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ใน 48 ชั่วโมงแรก จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อคิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับแคปไซซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไปจนถึง 120 ชั่วโมง พบว่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับความเข้มข้นอื่นพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรก เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของแต่ละความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบแต่ละช่วงเวลา พบว่าแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ใน 48 ชั่วโมงแรก มีอัตราการเพิ่มของเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ถึง 120 ชั่วโมง ยังคงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์แต่อัตราการเพิ่มน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ พบว่าความเข้มข้นของแคปไซซินมากขึ้นและระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับแคปไซซินนานขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในทางเสื่อมลงคือเซลล์มีลักษณะกลม ไม่ยึดเกาะกับพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงเซลล์ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดโดยใช้แคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.020 ศึกษาที่ระยะเวลา 2, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินมีจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะน้อยลงและลักษณะการยึดเกาะไม่ดี มีการเปลี่ยนแปลงของ plasma membrane คือมี blebs ขนาดต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมาย มีการแตกออกของ blebs บางครั้งพบการลอกของ plasma membrane และการเกิดรูที่ plasma membrane มากมาย ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้รุนแรงมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาสรุปได้ว่าแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 เป็นความเข้มข้นที่มีพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคนน้อยที่สุด สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์อาจเกิดจากการทำลาย plasma membrane ซึ่งมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์

ภาควิชา เวชศาสตร์ช่องปาก ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา เวชศาสตร์ช่องปาก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

SOMSAK CHAYAVIVATTANAVONK : EFFECT OF CAPSAICIN ON HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS IN CULTURE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KRISANA ITHARATANA. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SOMPORN SWASDISON; 92 pp. ISBN 974-346-097-7.

Capsaicin, a major pungent ingredient of Capsicum fruits, is recently utilized for therapeutic purposes of pain relief. The objective of this study is to investigate the cytotoxic effect of capsaicin on proliferation and morphology of human gingival fibroblasts. Cell culture technique, MTT assay, inverted phase contrast microscopy and scanning electron microscopy were methods of choice in this study. The cytotoxicity of capsaicin was assessed at the concentrations of 0.002%, 0.003%, 0.004%, 0.006%, 0.010%, 0.020% and 0.030% (weight / volume). The cell viability was studied after the cells being exposed to capsaicin for 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The results from MTT assay showed that during the first 48 hours there was no significant difference in cell viability and cell proliferation between the cells exposed to 0.002% capsaicin and the cells in control group which were not exposed to capsaicin ($p>0.05$). After 48 hours, the cells in 0.002% capsaicin–treated group showed less proliferation and significant difference in cell viability from the control group ($p<0.05$). At the higher concentrations of capsaicin tested, there was significant difference in cell viability between the capsaicin-treated groups and the control group at all exposure time ($p<0.05$). By using the inverted phase contrast microscopy, we found that at the higher concentration of capsaicin or longer exposure time, the cells showed deterioration characterized by cell rounding up and less attachment to the culture dishes. Ultrastructurally, the fibroblasts exposed to capsaicin at the concentration of 0.020% which was the lethal dose for the cells, showed progessive damage of the plasma membrane. At 2 to 6 hours of incubation with 0.020% capsaicin, the cells were more rounded up and their plasma membrane was sometimes peeled off with a lot of various-sized blebs and holes at the cell surface. Abnormal blebs of varying sizes were also found. These results suggest that capsaicin at the concentration of 0.002% has the least toxic effect to human gingival fibroblasts. In addition, the lethal effect of capsaicin to the cells is probably on the plasma membrane.

ภาควิชา เวชศาสตร์ช่องปาก ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา เวชศาสตร์ช่องปาก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ทันตแพทย์หญิงกฤษณา อิฐรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. สมพร สวัสดิสรรพ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. วันดี อภิณหสมิต ที่ได้ให้ความรู้ แนวความคิด ตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัย และให้การดูแลการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยตลอด รวมทั้งยังให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์จนเป็นที่เรียบร้อย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้กล่าวถึงในที่นี้ ที่ได้เอื้อเฟื้อการจัดเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อและเครื่องมือวิจัยที่ใช้ในการศึกษา

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ยุพา อ่อนท้วม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำด้านสถิติที่ใช้สำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินกองทุนเพื่อการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ และทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณกลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนการลาศึกษาต่อในครั้งนี้ ประโยชน์และความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ทุก ๆ ท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1 ส่วนประกอบของพริก..... 4

2.2 สูตรและโครงสร้างทางเคมีของแคปไซซิน..... 5

2.3 ปริมาณแคปไซซินในพริกและหน่วยวัดความเผ็ดของพริก..... 5

2.4 ผลการทดสอบพิษของแคปไซซินในหนู..... 6

2.5 ผลของพริกต่ออัตราการหายใจ ความดันเลือด และอุณหภูมิในช่องปาก..... 6

2.6 ผลของแคปไซซินต่อหัวใจ..... 7

2.7 ผลของพริกต่อกระเพาะอาหารและลำไส้..... 8

2.8 ผลของแคปไซซินต่อระบบประสาท..... 8

2.9 ผลของแคปไซซินต่อการลดอาการปวด..... 9

2.10 ผลการใช้แคปไซซินเฉพาะที่ในปาก..... 10

2.11 แคปไซซินกับการเกิด oral submucous fibrosis..... 10

2.12 ผลของแคปไซซินต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ..... 11

3 ระเบียบวิธีวิจัย..... 12

3.1 ประชากรและตัวอย่าง..... 12

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 12

3.3 วิธีการทดลอง..... 14
3.3.1 การเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์..... 14
3.3.2 การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์..... 14
3.3.3 การเตรียมแคปไซซิน..... 15
3.3.4 การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนเซลล์..... 15
3.3.5 การทดสอบผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์..... 16
3.3.6 การทดสอบผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยวิธีจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด..... 17
3.3.7 สถิติที่ใช้วิเคราะห์..... 18
4 ผลการทดลอง..... 19
4.1 การศึกษากราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับค่าการดูดกลืนแสง..... 19
4.2 การศึกษาผลของแคปไซซินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์..... 19
4.2.1 ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เมื่อศึกษาด้วย MTT assay..... 19
4.2.2 ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ..... 21
4.2.3 ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด..... 23
5 อภิปรายผลการทดลอง สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 25
5.1 อภิปรายผลการทดลอง..... 25
5.2 สรุปผลการทดลอง..... 32
5.3 ข้อเสนอแนะ..... 33
รายการอ้างอิง..... 34
ภาคผนวก..... 71
ประวัติผู้วิจัย..... 92

สารบัญภาพ

		หน้าที่
ภาพที่ 1	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกปกติในจานเพาะเลี้ยงเซลล์.....	40
ภาพที่ 2	แผนภาพแสดงความเข้มข้นต่าง ๆ ของแคปไซซินที่ใช้ในการทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน 24 well plate.....	42
ภาพที่ 3	กราฟเปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละความเข้มข้น และช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ทดสอบ.....	44
ภาพที่ 4	กราฟเปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันของแต่ละความเข้มข้นของแคปไซซิน.....	46
ภาพที่ 5	กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดซับแสงที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละความเข้มข้นของแคปไซซินที่ช่วงเวลาต่างกัน.....	48
ภาพที่ 6	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง ภายหลังทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	50
ภาพที่ 7	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ภายหลังทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	52
ภาพที่ 8	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ภายหลังทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	54
ภาพที่ 9	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง ภายหลังทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	56
ภาพที่ 10	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 96 ชั่วโมง ภายหลังทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	58
ภาพที่ 11	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง ภายหลังทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นต่าง ๆ กัน...	60

ภาพที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงการยึดเกาะของเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ที่ยึดเกาะ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีแคปไซซินกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.020 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน..... 62

ภาพที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มควบคุมซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีแคปไซซินเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง..... 64

ภาพที่ 14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.020 เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง.. 66

ภาพที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.020 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง.. 68

ภาพที่ 16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.020 เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง.. 70