คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้จากผิวหนังและเกล็ดปลาแรด (Osphronemus guramy) และผลต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสของผิวหนังมนุษย์

นางสาว ธิดารัตน์ มาลีรัตน์มงคล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยาการสัตว์ ภาควิชาสรีรวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COLLAGEN EXTRACTED FROM SKIN AND SCALE OF GIANT GOURAMY (OSPHRONEMUS GURAMY) AND PROLIFERATIVE RESPONSE OF HUMAN DERMAL FIBROBLAST CELL CULTURE TO THE EXTRACTED COLLAGEN

Miss Tidarat Maleeratmongkon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Animal Physiology
Department of Physiology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

492179

Thesis Title	PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COLLAGEN EXTRACTED FROM SKIN AND SCALE OF GIANT GOURAMY (OSPHRONEMUS GURAMY) AND PROLIFERATIVE RESPONSE OF HUMAN DERMAL FIBROBLAST CELL CULTURE TO THE EXTRACTED COLLAGEN.
By	Miss Tidarat Maleeratmongkon
Field of study	Animal Physiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Meena Sarikaputi, D.V.M., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Sumolya Kanchanapangka, D.V.M., Ph.D.
	Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, D.V.M., Ph.D.

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

..... Dean of the Faculty of Veterinary Science

(Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Kris Angkanaporn, D.V.M., Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Meena Sarikaputi, D.V.M., Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Sumolya Kanchanapangka, D.V.M., Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, D.V.M., Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Neeracha Sanchavanakit, D.D.S., Ph.D.)

ธิดารัตน์ มาลีรัตน์มงคล : คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของคอลลาเจนที่สกัดได้จากผิวหนังและเกล็ดปลาแรด (Osphronemus guramy) และผลต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสของผิวหนังมนุษย์ (PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COLLAGEN EXTRACTED FROM SKIN AND SCALE OF GIANT GOURAMY (OSPHRONEMUS GURAMY) AND PROLIFERATIVE RESPONSE OF HUMAN DERMAL FIBROBLAST CELL CULTURE TO THE EXTRACTED COLLAGEN) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. สพ.ญ. ดร. สุมลยา กาญจนะพังคะ, ผศ.สพ.ญ.ดร.สุทธาสินี ปุญญโชติ 74 หน้า

ศึกษาการสกัดโปรตีนคอลลาเจนจากผิวหนังและเกล็ดของปลาแรด (Osphronemus guramy) ด้วย pepsin พบว่าสามารถสกัดคอลลาเจนได้จากผิวหนังและเกล็ดปลา คิดเป็น 82.15% และ 24.78% ของน้ำหนักแห้งเริ่มต้นตามลำดับ รูปแบบการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของคอลลาเจนจากผิวหนังและเกล็ดปลาแรดบนโพลีอะคริลาไมด์เจล พบแถบโปรตีน 3 แถบ ได้แก่ แถบ β, $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ แสดงว่าคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักในผิวหนังและเกล็ดปลาแรดเป็นคอลลาเจนชนิดที่1 และมีน้ำหนักโมเลกุลของสายโปรตีนใกล้เคียงกับสายโปรตีนในคอลลาเจนที่แยกได้จากเอ็นสุกร เมื่อวิเคราะห์ชนิดของสายโพลีเปปไทด์ของคอลลาเจนที่แยกได้จากผิวหนังและเกล็ดปลาแรด พบว่าเป็นชนิด $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ เท่านั้น ไม่พบชนิด $\alpha 3$ เมื่อทำการย่อยคอลลาเจนจากผิวหนังและเกล็ดปลาแรดด้วยเอนไซม์ *Staphylococcus aureus* endopeptidase และ lysyl endopeptidase ได้รูปแบบของโปรตีนสายสั้นๆ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันระหว่างคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังและจากเกล็ดปลาแรด แต่แตกต่างจากคอลลาเจนที่แยกได้จากเอ็นสุกร แสดงให้เห็นว่า คอลลาเจนจากปลาแรดมีลำดับของกรดอะมิโน glutamic acid และ lysine ที่แตกต่างไปจากคอลลาเจนที่ได้จากเอ็นสุกร คอลลาเจนที่สกัดได้จากผิวหนังและเกล็ดปลาแรดมีความคงทนต่อความร้อนที่ 36.4°C และ 36°C ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC) นอกจากนี้แล้ว คอลลาเจนจากผิวหนังและเกล็ดปลาแรดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสของผิวหนังมนุษย์ เมื่อวัดด้วยวิธี MTT คอลลาเจนจากผิวหนังปลาแรดสามารถเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสช่วงเซลล์เพาะเลี้ยงที่ 19 และคอลลาเจนจากผิวหนังและเกล็ดปลาแรดสามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงช่วงที่ 19 เพิ่มจำนวนได้ และในขณะที่คอลลาเจนจากผิวหนังและเกล็ดปลาแรดไม่มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสที่เพาะเลี้ยงช่วงที่ 24 แต่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงในช่วงดังกล่าวเพิ่มจำนวนได้ใน 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาบ่งชี้ได้ว่าคอลลาเจนที่สกัดได้จากผิวหนัง และเกล็ดปลาแรดมีคุณสมบัติที่ดีสามารถนำไปใช้ทดแทนคอลลาเจนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ และยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของปลาชนิดนี้ในอนาคต

ภาควิชา.....สรีรวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....สรีรวิทยาการสัตว์... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4775561931 : ANIMAL PHYSIOLOGY
KEY WORD : COLLAGEN/ PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES/ PROLIFERATIVE RESPONSE/ HUMAN DERMAL FIBROBLAST

TIDARAT MALEERATMONGKON : PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COLLAGEN EXTRACTED FROM SKIN AND SCALE OF GIANT GOURAMY (OSPHRONEMUS GURAMY) AND ITS PROLIFERATIVE RESPONSE OF HUMAN DERMAL FIBROBLAST TO EXTRACTED COLLAGEN. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. MEENA SARIKAPUTI, D.V.M., Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SUMOLYA KANCHANAPANGKA, D.V.M., Ph.D., ASSIST. PROF. SUTTHASINEE POONYACHOTI, D.V.M., Ph.D. 74 pp.

Pepsin-solubilized collagens (PSCs) were isolated from skin and scale of giant gouramy (*Osphronemus guramy*) with the yield of 82.15% and 24.78% respectively, of pulverized dry weight starting materials. Electrophoretic patterns on polyacrylamide gel under denaturation condition revealed 3 different protein bands namely β, α1 and α2, indicating type I collagen of which molecular weight similar to porcine tendon collagen. Subunit composition of giant gouramy's collagen demonstrated the presence of α1 and α2 not α3 polypeptide in the collagen molecule extracted. Peptide maps of skin PSC hydrolysed by *Staphylococcus aureus* endopeptidase and lysyl endopeptidase showed similarity with those of scale PSC. However, the peptide maps of giant gouramy collagen had some differences from that of type I porcine tendon collagen, indicating the existence of differences in amino acid sequences especially glutamic acid and lysine, in collagen polypeptide chains. Differential scanning calorimetry (DSC) determined the thermal stability of skin and scale collagen of giant gouramy as 36.4°C and 36°C, respectively. No cytotoxicity effect of collagen from skin and scale of giant gouramy was found on human dermal fibroblast cell culture as measured by reduction of MTT *[3-(4, 5-dimethy-2-thiazolyl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide]*. While fish skin collagen stimulated cell adhesion, collagen from both fish skin and scale promoted human dermal fibroblast proliferation in 19th passage. Moreover, only proliferation of cell in 24th passage, neither cell adhesion, was observed in the presence of giant gouramy's collagen. The present study demonstrated that giant gouramy's pepsin solubilized collagens are likely to be used as an alternative collagen source for industrial purposes, besides mammalian collagens, resulting in an increase of economic value of the giant gouramy.

Department.....Physiology..... Student's signature Tidarat Maleeratmongkon
Field of study.....Animal Physiology..... Advisor's signature Meena Sarikaputi
Academic year.....2006..... Co-advisor's signature Sumolya K.
Co-advisor's signature

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and appreciation to my kind advisor, Assistant Professor Dr. Meena Sarikaputi and my co-advisors, Associate Professor Dr. Sumolya Kanchanapangka and Assistant Professor Dr. Sutthasinee Poonyachotti, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support during the working process, which enable me to carry out this study. Their kindness will be forever remembered.

I would like to express my sincere thanks to the chairman, Associate Professor Dr. Kris Angkanaporn for valuable comments, suggestions and corrections of this manuscript.

My sincere thanks are also expressed to my thesis committee, Assistant Professor Dr. Neeracha Sanchavanakit for the Human Dermal fibroblast cell culture, excellent comments and all helps. I would like to express my sincere thanks Associate Professor Dr. Chatsri Deachapunya for her kindly permission of working in cell culture laboratory.

I wish to express my sincere thanks to all my teachers in department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and Ms. Jongkon Sangviroon for all their loving helps during my time of studying.

I would like to thank the National Research Council of Thailand for their financial support.

My appreciations are also bestowed to my dear family and all of my friends for their love, kindness and support throughout this study.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

LIST OF ABBREVIATIONS xii

CHAPTER

I. INTRODUCTION 1

II. LITERATURE REVIEW

A. Collagen structure and type 4

B. Physicochemical properties of collagen 11

C. Effect of collagen on dermal wound healing 15

III. MATERIALS AND METHODS

A. Fish skin and scale preparation 20

B. Extraction of collagen from skin and scale 20

C. Determination of collagen concentration 21

D. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 21

E. Analysis of subunit composition 22

F. Peptide mapping 22

G. Analysis of thermal stability 23

H. Amino acid analysis 23

I. Proliferation assay 23

IV. RESULTS

Isolation of collagen extracted from skin and scale of giant gouramy and determination of collagen concentration 26

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 27

Subunit composition of collagen extracted from skin and scale of giant gouramy 28

Peptide mapping of collagen extracted from skin and scale of giant gouramy 33

Page

Thermal stability of collagen extracted from skin and scale of giant gouramy.....34

Amino acid composition of collagen extracted from skin and scale of giant gouramy.....36

Effects of collagen on human dermal fibroblast cell culture.....39

V. DISCUSSION.....46

REFERENCES.....62

APPENDIX.....68

BIOGRAPHY.....74

LIST OF TABLES

Table page

2.1 Chain composition and body distribution of collagen types, modified form 10
2.2 Advantage and disadvantage of collagen as a biomedical product 14
2.3 Domain integrin ligands 19
4.1 Percent extraction of collagen extracted from giant gouramy's skin and scale determined by modified Lowry's method 26
4.2 Total amino acid composition of fish skin collagen 36
4.3 Total amino acid composition of fish scale collagen 37
4.4 Amino acid composition of giant gouramy skin and scale compared with bovine skin collagen 38
4.5 Total imino acid and % hydroxylation of giant gouramy collagen 38
4.6 Summary of average percent growth of 20^{th} passage HDFs cell culture at 6, 24, 48 and 72 hours from serum free medium 39
4.7 Summary of average percent growth of 19^{th} passage HDFs cell culture at 6, 24 and 48 hours from standard culture medium 41
4.8 Summary of average percent growth of 24^{h} passage HDFs cell culture at 6, 24 and 48 hours from standard culture medium 44
5.1 Comparison between reference methods and modified Lowry's method 48
5.2 Imino acid content and % hydroxylation and denaturation temperature comparison between tropical fish collagen and mammalian collagen 56

LIST OF FIGURES

Figure		page
1.1	Giant gouramy (Osphronemus guramy)	2
2.1	Chemical structure of collagen type I	5
2.2	Collagen superfamily categorized by assembly modes and domain structure	7
2.3	Fibril forming collagen structure with C-terminus and N-terminus	8
2.4	Wound healing mechanism	16
2.5	Schematics of integrin structure	18
4.1	Standard curve of protein collagen	27
4.2	Electrophoretic patterns of giant gouramy's collagen on 6% SDS-PAGE	28
4.3	a. Elution patterns of pepsin-solubilized giant gouramy skin collagen using cation exchange column chromatography (Hitrap CM FF)	29
	b. SDS-PAGE electrophorogram of elution fractions of giant gouramy skin collagen	30
4.4	a. Elution patterns of pepsin-solubilized giant gouramy scale collagen using cation exchange column chromatography (Hitrap CM FF)	31
	b. SDS-PAGE electrophorogram of elution fractions of giant gouramy scale collagen	32
4.5	Peptide mapping on 10% gel of giant gouramy skin and scale collagens digested with *Staphylococcus aureus* V8 endopeptidase	33
4.6	Peptide mapping on 10% gel of giant gouramy skin and scale collagens digested with lysyl endopeptidase	34
4.7	Thermal transition curve of giant gouramy skin collagen determined by DSC	35
4.8	Thermal transition curve of giant gouramy scale collagen determined by DSC	35

Figure Page

4.9 a. Effect of serum concentration on the growth of 20th human dermal fibroblast 40

b. Histogram representing the average percent changes of $OD_{570/620}$ ratio of effect of serum concentration on the growth of 20th human dermal fibroblast 40

4.10 a. MTT proliferation assay represented in $OD_{570/620}$ ratio of the sample from the 19th passage of HDFs at 6, 24 and 48 hours after plating into 48-well culture dishes 42

b. Histogram representing the average percent changes of $OD_{570/620}$ ratio of the 19th passage of HDFs sample grew in collagen-coated plate containing serum-free culture medium from the 19th passage of HDFs sample grew in standard culture medium at 6, 24 and 48 hours after plating into 48-well culture dishes 43

4.11 a. MTT proliferation assay represented in $OD_{570/620}$ ratio of the sample from the 24th passage of HDFs at 6, 24 and 48 hours after plating into 48-well culture dishes 44

b. Histogram representing the average percent changes of $OD_{570/620}$ ratio of the 24th passage of HDFs sample grew in collagen-coated plate containing serum-free culture medium from the 24th passage of HDFs sample grew in standard culture medium at 6, 24 and 48 hours after plating into 48-well culture dishes 45

ABBREVIATIONS

Δ-HLNL	non-, mono- or dihydroxylated dehydrolysinorleucine
Ala	alanine
ASC	acid solubilized collagen
Avg	average
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSE	bovine spongiform encephalopathy
C-terminal	carboxy terminal
CDK/cyclin	cyclin dependent kinase/cyclin
DAG	diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EDAC	1-ethyl-(3-3-dimethylaminopropyl) carbodiimine hydrochloride
EDTA	ethylenediaminetetracetic acid
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FK	fish skin
FC	fish scale
Gly	glycine
Glu	glutamic acid
HCl	hydrocholic acid
HDF	human dermal fibroblast
Hyp	hydroxyproline
IP_3	inositol 3, 4, 5 triphosphate
M	molar
MAPK	mitogen activating kinase
MMP	mettaloprotease
MTT	3-(4,5-dimethy-2-thiazolyl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide
MW	molecular weight
N-terminal	amino terminal

NC plate	non-coated plate
NHS	N-hydroxysuccinimide
PDGF	platelet derived growth factor
Pro	proline
PSC	pepsin solubilized collagen
PTC	porcine tendon collagen
RGD	Arginine-Glycine-Asparagine
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
T_m	melting temperature
TGF-ß	transforming growth factor-ß
TNF-α	tumor necrotic factor-α
VEGF	vascular endothelial growth factor