ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248949

IUG5080027 ผศ.ดร.มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์

สกว
TRF

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ

การศึกษาฤทธิ์ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและโรคหลอดเลือดหัวใจของซิริซินเมื่อเป็นอาหารเสริม

(Study of sericin as dietary supplement for colorectal cancer and coronary artery disease (CAD) prevention)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
ผศ. ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมโครงการ
ผศ. ดร. นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ผศ. ดร. ภญ. วรี ติยะบุญชัย
ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

b00253934

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248949

สัญญาเลขที่ IUG50080027

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ

การศึกษาฤทธิ์ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและโรคหลอดเลือดหัวใจของซิริซิน เมื่อเป็นอาหารเสริม

(Study of sericin as dietary supplement for colorectal cancer and coronary artery disease (CAD) prevention)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ. ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์ (หัวหน้าโครงการ)	สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. ผศ. ดร. นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ	ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ผศ. ดร. ภญ. วรี ติยะบุญชัย	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

บทคัดย่อ

248949

รังไหมประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ ไฟโบรอินและซิริซิน ในขั้นตอนการลอกกาวไหม ซิริซินจะถูกทำลายและปล่อยทิ้งไปกับน้ำเสียจากกระบวนการผลิตเส้นไหม เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีเฉพาะหลายด้านของซิริซินจึงทำให้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างต่อเนื่องในหลายทศตวรรษที่ผ่านมา ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการหาคุณสมบัติการต่อต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ของซิริซินในหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นให้เป็นมะเร็งโดยใช้สาร 1,2-dimethylhydrazine (DMH) และคุณสมบัติการลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในหนูทดลอง รวมทั้งกลไกที่ใช้ในการลดปริมาณคลอเรสเตอรอลของซิริซินในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) อาหารหนูที่ผลิตขึ้นใช้อาหารหนูทดลองทางการค้านำมาผสมกับซิริซินหรือเคซีนที่ความเข้มข้น 4% แล้วผลิตเป็นรูปลูกเต๋า มีเนื้อแน่น องค์ประกอบหลักในอาหารหนูของแต่ละกลุ่มจะถูกปรับให้เท่ากัน อาหารที่ผลิตได้จะทำการอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ทำให้เย็น บรรจุ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้ หนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมที่มีซิริซิน 4% หรือเคซีนในระดับเดียวกันเป็นเวลานาน 5 เดือน จะได้รับการฉีดสาร DMH ปริมาณ 20 mg/kg เข้าใต้ผิวหนังทุก ๆ สัปดาห์ติดต่อกันเป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ หนูในกลุ่มที่ได้รับซิริซินและเคซีนมีอัตราการก่อตัวของ aberrant crypt foci (ACF) ใกล้เคียงกัน แต่ในกลุ่มที่ได้รับซิริซิน ACF ที่พบไม่พัฒนาต่อไปเป็นก้อนเนื้อมะเร็งเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเคซีน ดังนั้นการได้รับอาหารที่เสริมซิริซินก่อนได้รับสารก่อมะเร็งจะช่วยลดจำนวนและการเพิ่มจำนวนของ ACF แสดงให้เห็นว่าซิริซินสามารถยับยั้งสภาวะการเกิดมะเร็งในระยะแรกและระยะการแบ่งตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับในหนูทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็ง DMH ก่อนได้รับอาหารเสริมซิริซิน พบว่าลดการพัฒนาการของ ACF ต่อไปเป็นมะเร็งได้ แต่ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของ crypt และระดับของ lipid peroxidation ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่ได้รับอาหารเสริมซิริซินอยู่ในระดับต่ำกว่าของกลุ่มหนูที่ได้รับอาหารเสริมเคซีน สำหรับผลของ Ki67 immunohistochemistry และการตรวจสอบลักษณะของลำไส้ใหญ่พบว่า ซิริซินยืดระยะเวลากระบวนการก่อมะเร็ง โดยดูจาก crypts ของหนูที่ได้รับซิริซินส่วนใหญ่อยู่ระยะ hyperplastic แต่หนูที่ได้รับเคซีนมีลักษณะผิดปกติและเป็น dysplastic ซึ่งเป็นสภาวะที่อยู่ในระดับการก่อตัวเป็นมะเร็งที่สูงกว่า ดังนั้นการได้รับอาหารเสริมที่มีซิริซินมีผลชะลอความรุนแรงของมะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้งก่อนและหลังการได้รับสารก่อมะเร็ง โดยซิริซินจะไปยับยั้งการก่อตัวและการพัฒนาการไปเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่

สำหรับผลการลดโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองนั้น พบว่าหนูที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงนานติดต่อกัน 14 วัน เมื่อได้รับซิริซินมีระดับโคเลสเตอรอลรวมและโคเลสเตอรอลที่ไม่ใช่ HDL (non-HDL) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มของหนูทดลอง ระดับความเข้มข้นของซิริซินที่หนูได้รับอยู่ที่ 10,

248949

100, และ 1,000 mg/kg/day ทั้งนี้ไม่มีผลต่อระดับของ HDL และ triglyceride ในการศึกษาฤทธิ์ของซิริซินต่อการดูดซึมโคเลสเตอรอลผ่านเซลล์ Caco-2 โดยการวัดการนำเข้าของโคเลสเตอรอล (Cholesterol uptake) พบว่าซิริซินที่ความเข้มข้นต่ำระดับ 25 และ 50 µg/ml ยับยั้งการนำเข้าโคเลสเตอรอล 30% ในขณะที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นไม่มีผลต่อการยับยั้งการนำเข้าโคเลสเตอรอล ความสามารถในการละลายของ cholesterol micellar ลดลงเมื่อมีซิริซินในสารละลายเลี้ยงเซลล์ การค้นพบนี้เป็น หลักฐานแรกที่แสดงถึงฤทธิ์การลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของซิริซินว่าสวนหนึ่งมาจากการที่ซิริซินยับยั้งกิจกรรมการดูดซึมโคเลสเตอรอลของเซลล์ผนังลำไส้เล็ก

การประเมินความปลอดภัยของซิริซินเมื่อนำไปใช้เป็นอาหารเสริม ใช้ผลของการทดสอบในหนูทดลองทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยในแบบเฉียบพลันจะป้อนซิริซิน 5,000 mg/kg ให้หนูทดลองเพียงครั้งเดียวแล้วดูการตายของหนูภายใน 14 วัน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดสอบจะนำอวัยวะหนูและเลือดไปตรวจหาพยาธิวิทยา พบว่า ซิริซินมีความปลอดภัยสูง หนูที่ได้รับซิริซินไม่มีการตายและไม่พบความผิดปกติใด ๆ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม สำหรับการทดสอบแบบเรื้อรังจะป้อนซิริซิน 4% หรือเท่ากับ 1,000-1,200 mg/day เป็นเวลานาน 20 สัปดาห์ ผลการทดสอบไม่พบความผิดปกติของหนูในกลุ่มทดลองเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าซิริซินมีความปลอดภัยสำหรับการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร รูปแบบที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารซิริซินที่ได้รับการพัฒนาจากโครงการนี้จะเป็นแบบเม็ดแข็งที่มีซิริซิน 350 mg ผสมกับสารผสม 2 ชนิดคือ avicel PH101 และแป้งข้าวโพด และสารยึดเกาะที่ใช้คือ isopropanol และน้ำ โดยมีน้ำหนักรวมของเม็ดซิริซินอยู่ที่ 700 mg เทคนิคที่ใช้ในการตอกเม็ดซิริซินเป็นแบบ wet granulation คือต้องทำให้ซิริซินรวมตัวเป็นเม็ดเล็ก ๆ ก่อนแล้ว จึงนำมาตอกเป็นเม็ดยาปกติ เพื่อเพิ่มอัตราการแตกตัวของเม็ดซิริซิน เนื่องจากซิริซินจับกับน้ำได้ดีจึงอัดกันแน่นเมื่อตอกเม็ดแบบปกติ และมีความสามารถในการไหลต่ำ จึงมีปัญหาในการขนส่งระหว่างการขึ้นรูปเป็นเม็ด

Abstract

248949

Silk cocoons comprise of two types of protein: fibroin and sericin. Upon degumming, sericin is degraded and removed with wastewater. With its unique properties, sericin has been a subject of interest for the past few decades. In this study, we examined the chemopreventive effect of sericin against 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon tumorigenesis in rats and the hypocholesterolemic effect of sericin in rats and its potential mechanism of actions *in vitro* models. Experimental diets for rats were based on a commercial diet mixed with 4% sericin or 4% casein and processed into dense cubes. Macronutrients in all formula were adjusted equally. The diets were dried at 60°C, cooled, packed, and kept at -20°C until use. Rats fed 4% sericin or 4% casein supplemented diets for 5 months were given 20 mg/kg DMH subcutaneously injection once a week for the initial ten weeks. Supplementation of sericin did not affect the incidence rate of aberrant crypt foci (ACF) formation, but effectively suppressed tumor development compared to casein supplement. Consumption of sericin prior to carcinogen exposure appeared to reduce the number and multiplicity of ACF indicating its ability to suppress the initiation and promotion stages of tumorigenesis. Sericin supplement after being exposed to DMH could also reduce the development of ACF, while crypt multiplicity was not affected. The level of colonic lipid peroxidation in rats fed sericin diet showed a tendency to be lower than that of casein diet. From Ki67 immunohistochemistry and colonic morphological analysis, sericin could prolong tumorigenesis process because colonic crypts from rats fed sericin diet were mostly in the hyperplastic stage whereas those fed casein showed abnormal and dysplastic morphology indicating more advanced stage of tumorigenesis. The results suggest that consumption of sericin reduce the risk of developing colon tumor by suppressing the initiation and progression of tumorigenesis.

The hypocholesterolemic effect was investigated in rats fed a high cholesterol diet for 14 days. Total cholesterol and non-high density lipoprotein (non-HDL) cholesterol were significantly reduced in rats fed high-cholesterol diet together with all three tested doses of sericin (10, 100, and 1000 mg/kg/day). HDL cholesterol and triglyceride level were not affected by sericin supplement. The effect of sericin on cholesterol absorption was determined by measuring the uptake of radioactive-labeled cholesterol into differentiated Caco-2 cells. Low concentrations of sericin (25 and 50 μg/ml) inhibited 30% cholesterol uptake, whereas higher concentrations showed no effect. Cholesterol micellar solubility was also reduced in the presence of sericin. This is the first evidence suggesting that the hypocholesterolemic effect of sericin is partially the result of its inhibitory activity on cholesterol absorption in intestinal cells.

248949

In order to evaluate the safety of sericin for consumption, acute and chronic toxicity tests were conducted. For acute toxicity test, rats fed 5,000 mg/kg sericin once were alive and normal under 14-day observation. Results from rats fed 4% sericin or 1,000 - 1,200 mg/day for 20 weeks showed no significant difference compared to the control. It indicates that sericin is safe for consumption as food supplement. Appropriate form of sericin was made into tablets through wet granulation. This technique increased the disintegration rate of sericin in water. Each sericin tablet contains 350 mg sericin, avicel PH101 and corn starch as diluents, and isopropanol and water as binders. The total weight of sericin tablet is 700 mg. A typical tabletting technique is not applicable to sericin due to its high hydrophilic property, which prolongs disintegration time in water and limits flowability during tabletting process.

สารบัญเรื่อง

		หน้า
	บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
	บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
	สารบัญเรื่อง	จ
	สารบัญตาราง	ฉ
	สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1	บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2	การผลิตอาหารสัตว์ทดลองเสริมซิริซิน	4
บทที่ 3	การทดสอบฤทธิ์ของซิริซินในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	44
บทที่ 4	การทดสอบฤทธิ์ของซิริซินในการลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง	81
บทที่ 5	การพัฒนาตำรับอาหารเสริมซิริซิน	111
บทที่ 6	สรุปผลการวิจัย	127
บทที่ 7	บรรณานุกรม	133
บทที่ 8	ต้นฉบับงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ	141
บทที่ 9	ภาคผนวก	184

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารหนูทางการค้า CP 082 5

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของตัวอย่างสูตรอาหารหนูที่ทำการศึกษา 5

ตารางที่ 3 สัญลักษณ์และรายละเอียดตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน 6

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของตัวอย่างสูตรอาหารหนูที่ใช้ศึกษาในสัตว์ทดลอง 8

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมี (wet basis) ของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 14

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมี (dry basis) ของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 15

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระและความชื้นของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินเมื่อทำแห้งที่อุณหภมิต่างๆ 18

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของอัตราการทำแห้งของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินที่อุณหภูมิต่างๆ 25

ตารางที่ 9 สภาวะของเครื่อง Tray dryer ขณะทำการศึกษา sorption isotherm ของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรควบคุมที่ระยะเวลาต่างๆ 27

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระและความชื้นขณะทำการศึกษา Sorption isotherm ของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรควบคุมที่อุณหภูมิ 70 °C 28

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมี (dry basis) ของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลสูง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 30

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีโดยน้ำหนักเปียก (wet basis) ของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลสูง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ 31

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารหนูเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 35

ตารางที่ 14 ปริมาณราและยีสต์ที่พบในตัวอย่างสูตรอาหารหนู เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 36

หน้า

ตารางที่ 15	การทำนายอายุการเก็บจากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารหนูที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ	42
ตารางที่ 16	แสดงค่าเอนไซม์เฉลี่ยในเลือดของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม	51
ตารางที่ 17	การเกิด ACF และ tumor ที่ผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง (n = 6)	55
ตารางที่ 18	จำนวน ACF ต่อพื้นที่ (ตารางเซนติเมตร) ในส่วนต่างๆ ของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง	56
ตารางที่ 19	การแบ่งประเภทของ ACF ตามจำนวนของ crypt ที่พบในแต่ละ ACF	58
ตารางที่ 20	พื้นที่เฉลี่ยของ ACF ขนาดใหญ่ (มีจำนวน $\geq$ 5 crypts/ACF)	59
ตารางที่ 21	แสดงการเกิด lipid peroxidation ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal) ของหนูทดลอง	60
ตารางที่ 22	แสดงการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในลำไส้ใหญ่ ของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม	68
ตารางที่ 23	การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูทดลอง	95
ตารางที่ 24	ปริมาณอาหารที่หนูทดลองกิน	95
ตารางที่ 25	การเปลี่ยนแปลงของระดับ Total cholesterol ของหนูทดลอง	100
ตารางที่ 26	การเปลี่ยนแปลงของระดับ Triglyceride ของหนูทดลอง	100
ตารางที่ 27	การเปลี่ยนแปลงระดับของไขมันชนิดต่างๆในพลาสมาและปริมาณอาหารที่หนูกิน	103
ตารางที่ 28	ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการหนูทดลองที่ได้รับซิริซิน (ขนาด 5000 mg/kg)	104
ตารางที่ 29	ผลการตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการของเลือดที่ได้จากหนูทดลองที่ได้รับซิริซินนาน 5 เดือน (n = 6)	105
ตารางที่ 30	การวิเคราะห์กรดอะมิโนของซิริซินที่ใช้ในการทดลอง	108
ตารางที่ 31	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของ diluent และ Explotab	112
ตารางที่ 32	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลง อัตราส่วน Isopropanol : น้ำ	113
ตารางที่ 33	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Diluent	113
ตารางที่ 34	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน Avicel PH 101 : Corn starch	114

หน้า

ตารางที่ 35	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ standard sericin B ในน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	117
ตารางที่ 36	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของ standard sericin B ใน 0.1 N HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ	118
ตารางที่ 37	แสดงลักษณะทางกายภาพยาเม็ด sericin B เมื่อเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการผลิต	119
ตารางที่ 38	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด sericin B เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน Isopropanol : น้ำ	122
ตารางที่ 39	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด sericin B เมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Diluent	122
ตารางที่ 40	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด sericin B เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน Avicel : Corn starch	123
ตารางที่ 41	แสดงค่าเฉลี่ย % drug content และ % RSD ในแต่ละตำรับ	123
ตารางที่ 42	แสดงค่าการละลายในเวลาต่างของ sericin B	124
ตารางที่ 43	ปริมาณความชื้นที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	185
ตารางที่ 44	ปริมาณน้ำอิสระและความชื้นที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลสูง	186
ตารางที่ 45	ปริมาณเถ้าที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	187
ตารางที่ 46	ปริมาณเถ้าที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลสูง	188
ตารางที่ 47	ปริมาณทรายที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	189
ตารางที่ 48	ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	190
ตารางที่ 49	ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลสูง	191
ตารางที่ 50	ปริมาณไขมันที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	192
ตารางที่ 51	ปริมาณไขมันที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินและสูตรที่มีปริมาณโคเลสเตอรอลสูง	193
ตารางที่ 52	ปริมาณเส้นใยหยาบที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	194
ตารางที่ 53	ปริมาณสตาร์ชที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	195
ตารางที่ 54	ปริมาณเกลือที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน	198

หน้า

ตารางที่ 55	ค่า Log ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารหนูเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ	199
ตารางที่ 56	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และราและยีสต์ในตัวอย่างอาหารหนูเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C ที่ระยะต่างๆ	200
ตารางที่ 57	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลิทรีย์ทั้งหมดและรา และยีสต์ในตัวอย่างอาหารหนูเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35 °C ที่ระยะเวลาต่างๆ	201
ตารางที่ 58	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และราและยีสต์ในตัวอย่างอาหารหนูเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C ที่ระยะเวลาต่างๆ	202
ตารางที่ 59	น้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่มในระยะเวลา 5 เดือน	203
ตารางที่ 60	ปริมาณการกินอาหารของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่มในระยะเวลา 5 เดือน	203
ตารางที่ 61	น้ำหนักเฉลี่ยของอวัยวะต่างๆ หนูทดลองทั้ง 5 กลุ่มในระยะเวลา 5 เดือน	203
ตารางที่ 62	จำนวนเฉลี่ยของ ACF ต่อพื้นที่ (ตารางเซนติเมตร) ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ DMH ในระยะเวลา 5 เดือน	204
ตารางที่ 63	จำนวนเฉลี่ยของ ACF ต่อพื้นที่ (ตารางเซนติเมตร) ในส่วนต่างๆ ของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ DMH ในระยะเวลา 5 เดือน	204
ตารางที่ 64	จำนวน ACF ต่อพื้นที่ (ตารางเซนติเมตร) ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ DMH ในระยะเวลา 5 เดือน แบ่งตามประเภทของ ACF (1 ถึง ≥ 5 crypt/ACF)	204
ตารางที่ 65	พื้นที่เฉลี่ยของ ACF ที่แสดงขนาดของ ACF ประเภทที่มีจำนวน crypt ใน ACF ≥ 5 crypts ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ DMH ในระยะเวลา 5 เดือน	205
ตารางที่ 66	การย้อมติด surface markers (ร้อยละของเซลล์) ของในเลือดของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม ที่ได้จากการเจาะเลือดที่หัวใจ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 5 เดือน	205
ตารางที่ 67	ผลของซิริซิน 50μg/ml ต่อการนำเข้าของโคเลสเตอรอล ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2	206
ตารางที่ 68	ผลของซิริซิน 100 μg/ml ต่อการนำเข้าของโคเลสเตอรอล ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2	206
ตารางที่ 69	ผลของซิริซิน 500 μg/ml ต่อการนำเข้าของโคเลสเตอรอล ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2	206
ตารางที่ 70	ผลของซิริซิน 1000 μg/ml ต่อการนำเข้าของโคเลสเตอรอล ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2	207

หน้า

ตารางที่ 71	น้ำหนักของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ในช่วงระยะเวลา 5 เดือน	207
ตารางที่ 72	การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ในแต่ละช่วงระยะเวลา 5 เดือน	207
ตารางที่ 73	ปริมาณอาหารที่กินของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆในช่วงระยะเวลา 5 เดือน	208
ตารางที่ 74	ระดับของ total cholesterol ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ในช่วงระยะเวลา 5 เดือน	208
ตารางที่ 75	ระดับของ High density lipoprotein (HDL) ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ในช่วงระยะเวลา 4 เดือน	209
ตารางที่ 76	ระดับของ Triglyceride ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ในช่วงระยะเวลา 5 เดือน	209
ตารางที่ 77	ระดับของ total cholesterol ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ในช่วง 14 วัน	210
ตารางที่ 78	ระดับของ non-HDL cholesterol ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ในช่วง14 วัน	210
ตารางที่ 79	ระดับของ triglyceride ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆในช่วง14 วัน	211
ตารางที่ 80	ระดับของ triglyceride ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆในช่วง14 วัน	211
ตารางที่ 81	ตารางแสดง % drug content	212
ตารางที่ 82	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Diluent ,ชนิด Diluent กับ % Explotab	215
ตารางที่ 83	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Diluent ,ชนิด Diluent กับ % Explotab	216
ตารางที่ 84	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Sericin กับ Diluent	217
ตารางที่ 85	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน Isopropanol : น้ำ	217
ตารางที่ 86	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Sericin B กับ อัตราส่วน Isopropanol: น้ำ	218
ตารางที่ 87	แสดงส่วนประกอบของตำรับเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณ Diluent กับ % Explotab	219

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 SDS-PAGE ของโปรตีนซิริซินเอ (A) ซิริซินบี (B) และซิริซินซี (C) 11

รูปที่ 2 ลักษณะตัวอย่างสูตรอาหารหนูที่ผลิต 12

รูปที่ 3 ลักษณะอาหารหนูทางการค้า CP 08 13

รูปที่ 4 องค์ประกอบของตัวอย่างอาหารสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน 16

รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระ (A) และความชื้น (B) ในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินเมื่อทำแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ 20

รูปที่ 6 ผลของเคซีนและโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระและความชื้นในตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซินที่ทำแห้งที่อุณหภูมิ 70°C 21

รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระและความชื้นของตัวอย่างอาหารหนูสูตรควบคุมและสูตรเสริมซิริซินเมื่อทำแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ 22

รูปที่ 8 Water de- sorption isotherm ของตัวอย่างสูตรอาหารหนูเสริมซิริซิน (ST7) และสูตรอาหารควบคุม (CN7) 26

รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารหนูสูตรทางค้า (M) สูตรควบคุม (C) และสูตรเสริมซิริซิน (S) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 35 และ 55 °C ที่ระยะเวลาต่างๆ 33

รูปที่ 10 แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารหนูสูตรทางค้า (M) สูตรควบคุม (C) และสูตรเสริมซิริซิน (S) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 35 และ 55 °C ที่ระยะเวลาต่างๆ 34

รูปที่ 11 ลักษณะ Colony ของราและยีสต์ที่พบในตัวอย่างอาหารหนูสูตรควบคุม เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 37

รูปที่ 12 ลักษณะ Colony ของราและยีสต์ที่พบในตัวอย่างอาหารหนูสูตรควบคุมที่มีส่วนผสมของโซเดียมไบคาร์โบเนต เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 37

รูปที่ 13 ลักษณะ Colony ของจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างอาหารหนูสูตรเสริมซิริซินที่ผ่านการฆ่าสเตอไรส์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 38

รูปที่ 14 ลักษณะ Colony ของราและยีสต์ที่พบในตัวอย่างอาหารหนูสูตรเสริมซิริซินที่มีส่วนผสมของโซเดียมไบคาร์บอเนต เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 39

หน้า

รูปที่ 15 ลักษณะ Colony ของราและยีสต์ที่พบในตัวอย่างอาหารหนูทางการค้า เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ 40

รูปที่ 16 แผนการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และการให้อาหารซิริซินกับหนูทดลอง 47

รูปที่ 17 น้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลอง ทำการบันทึกน้ำหนักของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่มในช่วงระยะเวลา 5 เดือน 49

รูปที่ 18 ปริมาณเฉลี่ยของอาหารที่หนูกิน ทำการบันทึกน้ำหนักของอาหารที่หนูทั้ง 5 กลุ่มกินในช่วงระยะเวลา 5 เดือน 50

รูปที่ 19 น้ำหนักเฉลี่ยของอวัยวะต่างๆ ของหนู หลังสิ้นสุดการทดลองในช่วงระยะเวลา 5 เดือน ทำการเก็บและชั่งน้ำหนักอวัยวะต่างๆของหนูทั้ง 5 กลุ่ม 50

รูปที่ 20 ลักษณะภายนอกของลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วย DMH 52

รูปที่ 21 การแบ่งลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง 52

รูปที่ 22 ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal) ของหนูทดลองกลุ่มควบคุม เมื่อย้อมด้วย 0.2% methylene blue 53

รูปที่ 23 ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง (middle) ของหนูทดลองกลุ่มควบคุม เมื่อย้อมด้วย 0.2% methylene blue 53

รูปที่ 24 ลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal) ของหนูทดลองกลุ่มควบคุม เมื่อย้อมด้วย 0.2% methylene blue 53

รูปที่ 25 การเกิด ACF ที่ผนังลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูทดลอง 54

รูปที่ 26 การเกิด ACF ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่ได้รับ DMH 56

รูปที่ 27 การประเมินการดำเนินไปหรือความรุนแรงของโรค โดยทำการวิเคราะห์ผนังลำไส้ใหญ่ด้วยการนับจำนวน crypt ต่อ ACF 58

รูปที่ 28 การกระจายตัวของ ACF ขนาดต่างๆ ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย 59

รูปที่ 29 พื้นที่เฉลี่ยของ ACF ที่พบในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูที่ได้รับ DMH 60

รูปที่ 30 ลักษณะของผนังลำไส้ใหญ่ของหนูเมื่อตัดตามแนวขวาง (transverse section) 62

รูปที่ 31 การแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง 64

รูปที่ 32 การแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในผนังลำไส้ใหญ่ของหนูทดลองที่เป็นมะเร็ง 65

รูปที่ 33 รูปแบบการแบ่งโซนในการประเมินการแสดงออกของโปรตีน Ki67 67

หน้า

รูปที่ 34 ลักษณะรูปร่างของ crypt ปกติที่พบในกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม 70

รูปที่ 35 ลักษณะรูปร่างของ crypt ที่ผิดปกติที่พบในกลุ่ม 3 กินอาหารที่มีเคซีนและได้รับสาร DMH 71

รูปที่ 36 ลักษณะรูปร่างของ crypt ที่ผิดปกติที่พบในกลุ่ม 4 กินอาหารที่มีซิริซินก่อนได้รับสาร DMH 72

รูปที่ 37 ลักษณะรูปร่างของ crypt ที่ผิดปกติที่พบในกลุ่ม 5 กินอาหารที่มีซิริซินหลังการได้รับสาร DMH 73

รูปที่ 38 ผลของซิริซินต่อระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง 75

รูปที่ 39 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 85

รูปที่ 40 การทดสอบการทำงานของ alkaline phosphatase และ α–glucosidase 86

รูปที่ 41 การนำเข้าของโคเลสเตอรอล (cholesterol uptake) ในเซลล์ Caco-2 88

รูปที่ 42 เปรียบเทียบการนำเข้าของโคเลสเตอรอลใน insert และ regular well 89

รูปที่ 43 ผลของ ezetimibe ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 89

รูปที่ 44 ผลของซิริซินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 91

รูปที่ 45 ผลของซิริซินต่อการนำเข้าโคเลสเตอรอลในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 92

รูปที่ 46 น้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ 94

รูปที่ 47 ปริมาณอาหารที่หนูทดลองกิน 94

รูปที่ 48 ระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารประเภทต่างๆ 96

รูปที่ 49 ระดับของ HDL และ triglyceride ในเลือดของหนูทดลอง 97

รูปที่ 50 ระดับของโคเลสเตอรอล และ triglyceride ในเลือดของหนูทดลอง 99

รูปที่ 51 ระดับของ total cholesterol ในเลือดของหนูทดลอง 101

รูปที่ 52 ระดับของ non-HDL, HDL cholesterol และ triglyceride ในเลือดของหนูทดลอง 102

รูปที่ 53 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น sericin B กับค่าการดูดกลืนแสงในน้ำ 117

รูปที่ 54 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น sericin B กับค่าการดูดกลืนแสใน 0.1 N HCl 118

รูปที่ 55 แกรนูลหลังจากผ่านการอบแห้งแล้วนำไปผ่านแร่ง No. 16 120

หน้า

รูปที่ 56 ยาเม็ด sericin B ตำรับ C2 120

รูปที่ 57 ยาเม็ด sericin B ตำรับC4 มีสภาพบิ่นบริเวณขอบ (chipping) 122

รูปที่ 58 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % sericin B ที่ปลดปล่อยออกมาจากตำรับในตัวกลางที่เป็น 0.1 N HCl 125

รูปที่ 59 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % sericin B ที่ปลดปล่อยออกมาจากตำรับในตัวกลางที่เป็นน้ำ 125