# บทที่ 3 ผลการทดลอง

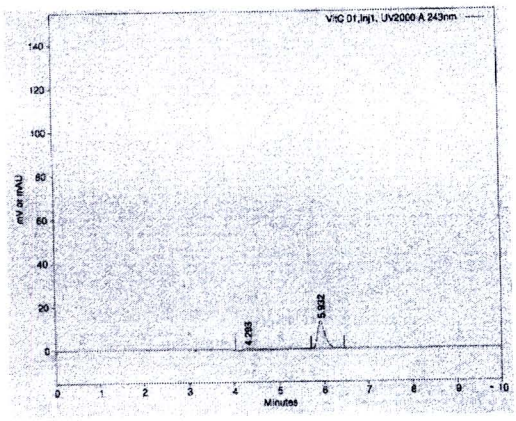
## 3.1 *น้ำคั้นมะขามป้อมสดในรูป freeze-dried*

จากเนื้อผลมะขามป้อมสด 302.95 กรัม เมื่อแยกกากออกและปั่นแยกตะกอนออกแล้วได้น้ำคั้น มะขามป้อมใส 157 มิลลิลิตร คิดโดยเฉลี่ยเป็น 2.54 มล. ต่อ 1 ลูก และเมื่อทำให้แห้งแบบเย็น จะได้สารในรูปของผงแห้งคิดเป็น yield 16.1% (w/v) หรือ ผงแห้ง 161 มก. ต่อ 1 มล. น้ำคั้น

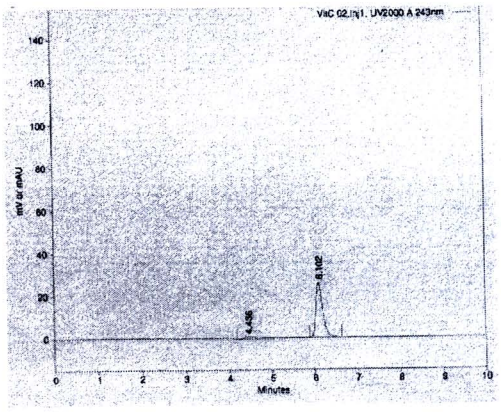
## 3.2 *การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในมะขามป้อมด้วยวิธี HPLC*

ปริมาณวิตามินซีในน้ำคั้นมะขามป้อมด้วยเทคนิค HPLC จากผลการทดลอง วิตามินซีในน้ำคั้นมะขามป้อมจาก calibration curve พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 1.574% ± 0.046% w/w ดังแสดงในรูปที่ 2

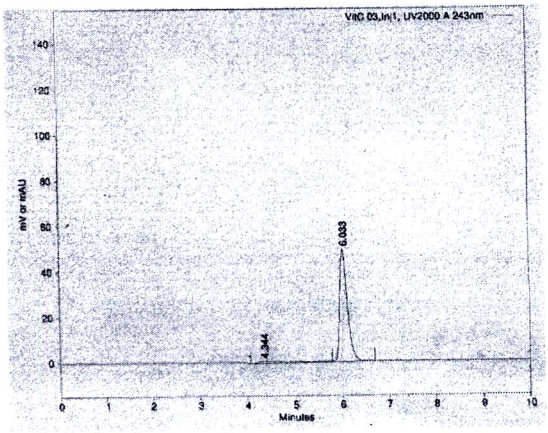
A)


VitC 01,Inj1, UV2000 A 243nm
mV or mAU
4.293
5.922
Minutes

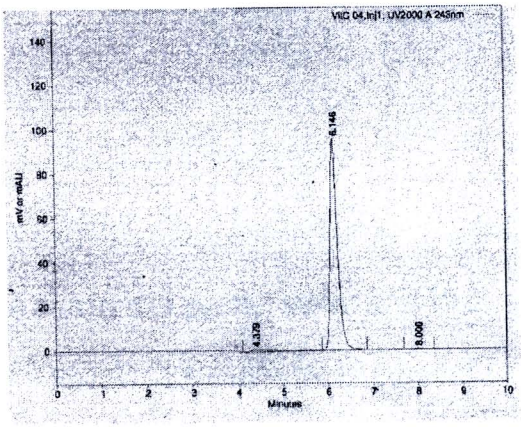
B)


VitC 02,Inj1, UV2000 A 243nm
mV or mAU
4.456
6.102
Minutes

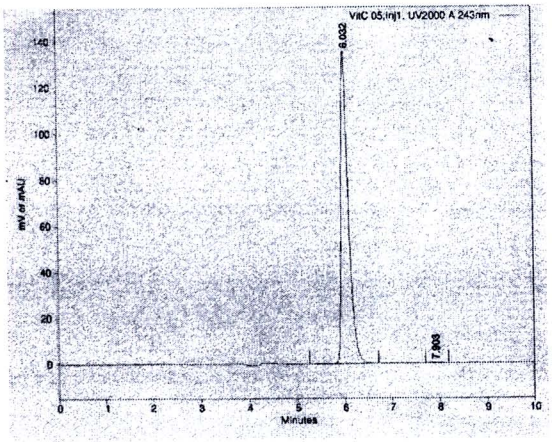
C)


VitC 03,Inj1, UV2000 A 243nm
mV or mAU
4.344
6.033
Minutes

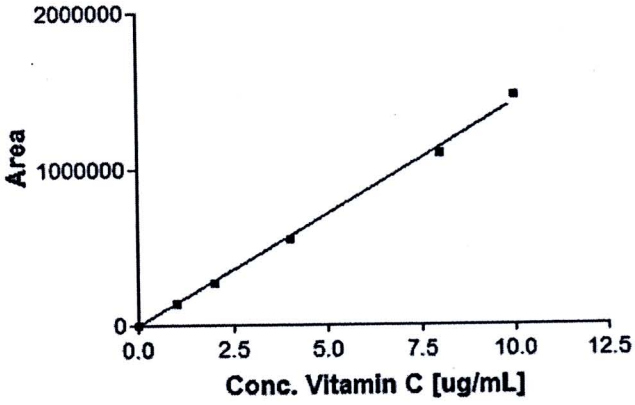
D)


VitC 04,Inj1, UV2000 A 243nm
mV or mAU
4.329
6.148
8.008
Minutes

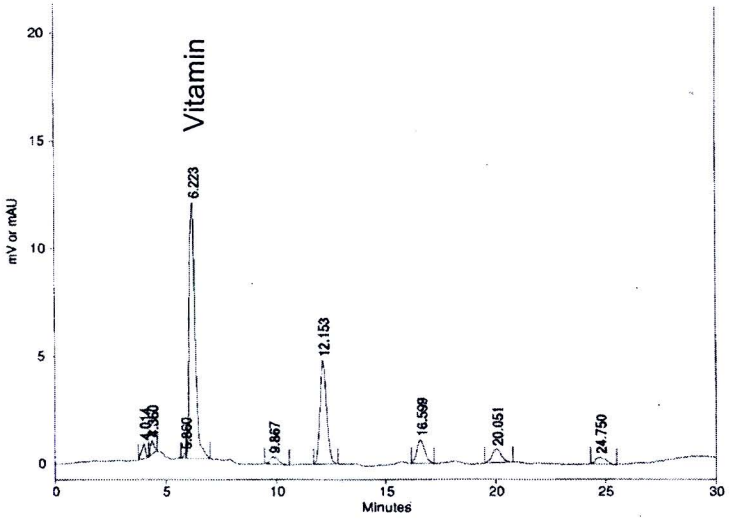
E)


VitC 05,Inj1, UV2000 A 243nm
mV or mAU
6.032
7.808
Minutes

F)


2000000
1000000
0
Area
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
Conc. Vitamin C [ug/mL]

G)




สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

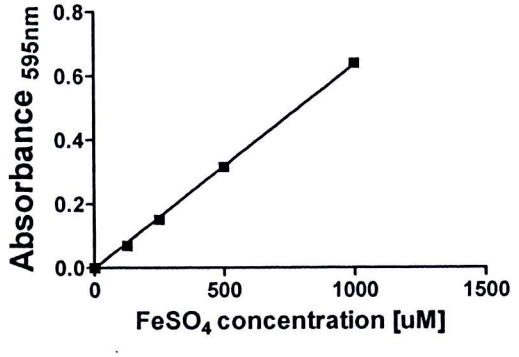
**รูปที่ 2.** HPLC chromatogram แสดง peak ของ ascorbic acid ที่มี retention time ที่ประมาณ 6 นาที. การสร้างกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid ที่ A) ความเข้มข้น 1 µg/mL; B) ความเข้มข้น 2 µg/mL; C) ความเข้มข้น 4 µg/mL; D) ความเข้มข้น 8 µg/mL; E) ความเข้มข้น 10 µg/mL; F) กราฟมาตรฐาน ascorbic acid; G) chromatogram ของมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 100 µg/mL วิเคราะห์ที่ปริมาตร 20 µL

### 3.3 *ปริมาณ Total phenolic compound ในน้ำคั้นมะขามป้อม*

การหาปริมาณฟีนอลรวมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และใช้คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลรวมในรูปของ gallic acid equivalents ต่อน้ำคั้นมะขามป้อมในรูปผงแห้ง 1 ไมโครกรัม(ไมโครกรัม gallic acid/ไมโครกรัม Freeze-dried) จากผลการทดลองเมื่อ 6 เดือนก่อน ปริมาณสารฟีนอลรวมในน้ำคั้นมะขามป้อมจาก calibration curve พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.361±0.005 ไมโครกรัม gallic acid/ไมโครกรัม Freeze-dried ส่วนผลการทดลองครั้งนี้ ปริมาณสารฟีนอลรวมในน้ำคั้นมะขามป้อมจาก calibration curve พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.375±0.006 ไมโครกรัม gallic acid/ไมโครกรัม Freeze-dried จะพบว่า น้ำคั้นมะขามป้อมที่เก็บไว้ในรูป Freeze-dried ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

### 3.4 *ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อม*

ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อมด้วยวิธี reducing power method ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวส์ของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) โดย คือ FRAP [Ferric Reducing/Antioxidant Power] assay และรายงานผลเป็นค่า FRAP value [mmol $FeSO_4.7H_2O$/mg freeze-dried] จากผลการทดลองเมื่อ 6 เดือนก่อน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อมจาก calibration curve พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 3,643.3 ± 192.5 µmole/mg ส่วนผลการทดลองครั้งนี้ ก่อน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อมจาก calibration curve (รูปที่ 3) พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 3,694.5 ± 105.8 µmole/mg จะพบว่า น้ำคั้นมะขามป้อมที่เก็บไว้ในรูป Freeze-dried ที่ 4 °C เป็นเวลา 12 เดือนไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ




**รูปที่** 3. กราฟมาตรฐานของ FRAP assay

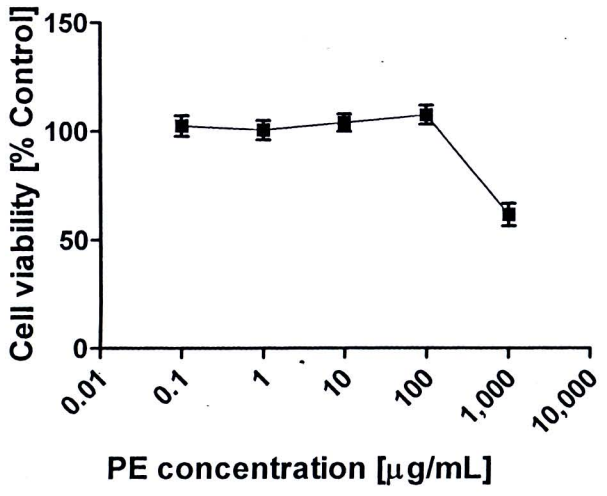
### 3.5 *ผลของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ในน้ำคั้นมะขามป้อม*

การศึกษาผลของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ในน้ำคั้นมะขามป้อมนั้นพบว่า น้ำมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 – 100 µg/mL ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL ทำให้เซลล์ลดลง 38.24% ดังนั้นความเข้มข้นสูงสุดที่เลือกใช้สำหรับการทดลองต่อไป คือ 100 µg/mL ส่วนวิตามินซีที่ความเข้มข้น 0.01-10 µg/mL ไม่เปลี่ยนแปลงการเจริญของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นพบว่า เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นประมาณ 56% เมื่อบ่มร่วมกับวิตามินซีที่ความเข้มข้น 100 µg/mL และ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า 3 เท่าเมื่อบ่มร่วมกับวิตามินซีที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL (ตารางที่ 1 และรูปที่ 4)

**ตารางที่ 1**. การเจริญของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเมื่อบ่มร่วมกับน้ำคั้นมะขามป้อม (PE) หรือวิตามินซี (ascorbic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

| Concentration | PE | |
|---|---|---|
| (µg/mL) | % Control | SEM |
| 0.1 | 102.67 | 4.68 |
| 1 | 100.80 | 4.44 |
| 10 | 104.07 | 4.07 |
| 100 | 107.68 | 4.34 |
| 1000 | 61.76* | 5.23 |

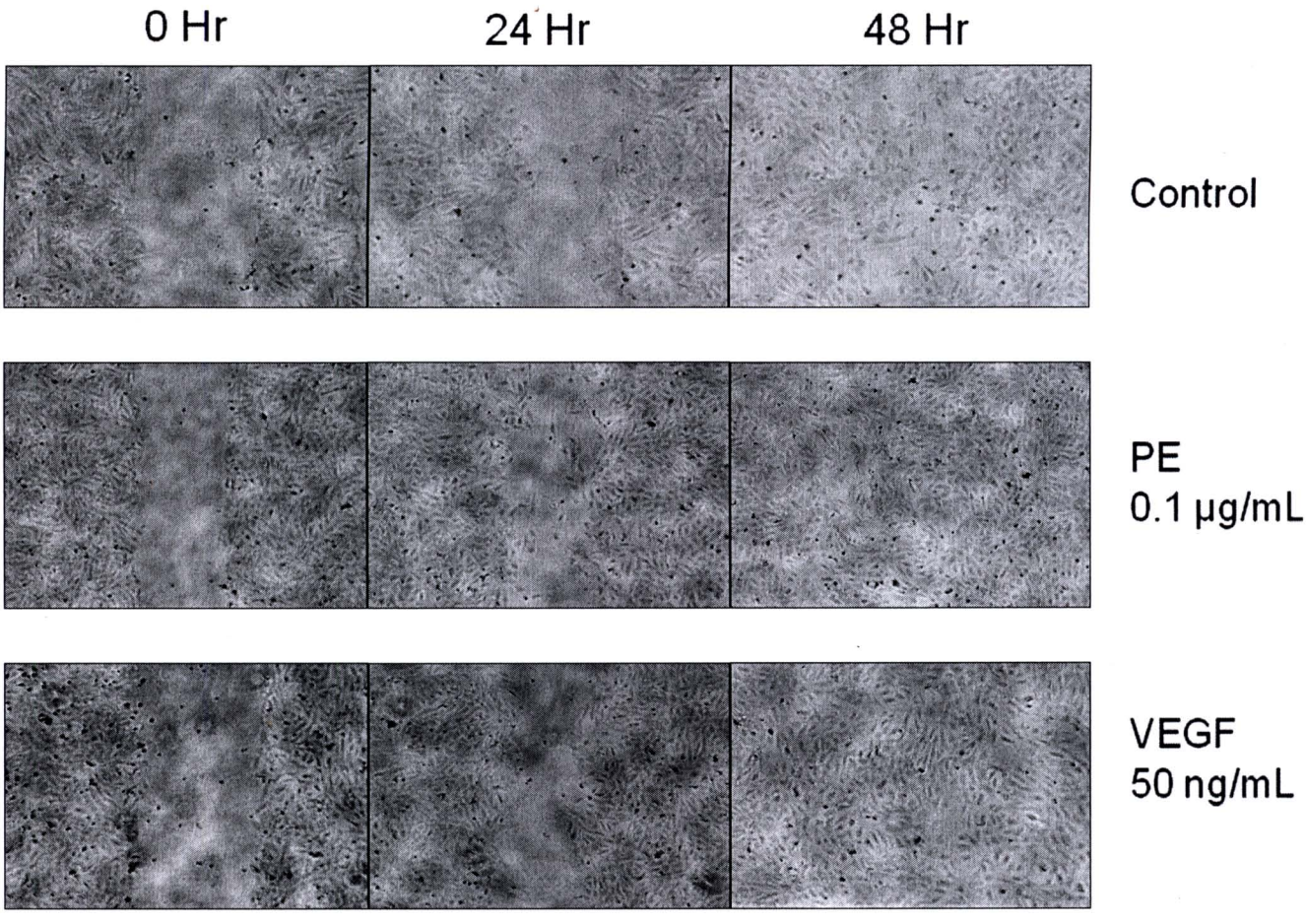
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



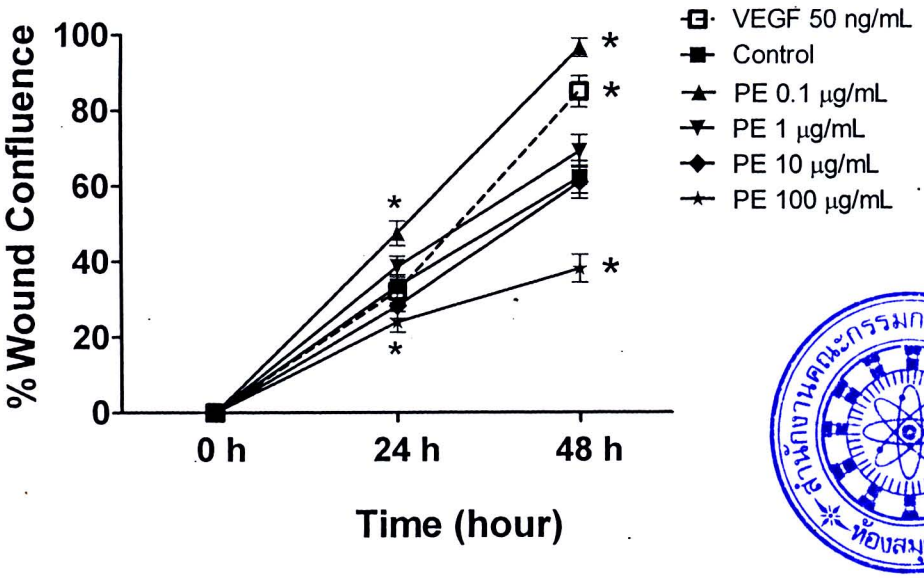

**รูปที่ 4.** การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay. ใช้น้ำคั้นมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 – 1,000 µg/mL

### 3.6 *ฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลของน้ำคั้นมะขามป้อม (Scracth wound closure assay)*

การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลของน้ำคั้นมะขามป้อม พบว่า ที่เวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง น้ำคั้นมะขามป้อมที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1 µg/mL) สามารถสมานแผลได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้ Growth factors แต่เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง น้ำคั้นมะขามป้อมที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1 µg/mL) สามารถสมานแผลได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมและเปรียบเทียบได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับ vascular endothelial growth factor (VEGF) แสดงดังรูปที่ 5 และ รูปที่ 6.




**รูปที่** 5. ภาพของการสมานแผลเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด. เปรียบเทียบที่เวลา 0, 24, และ 48 ชั่วโมง ระหว่างกลุ่มควบคุม (Control), กลุ่มที่ได้ Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF 50 ng/mL), กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นมะขามป้อม(PE) 0.1 µg/mL

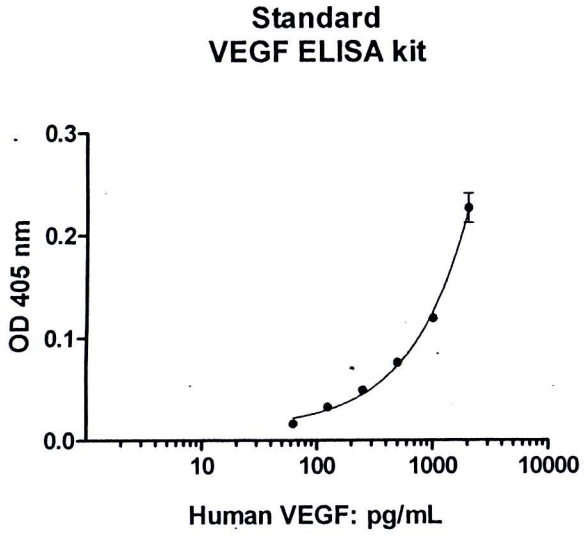



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

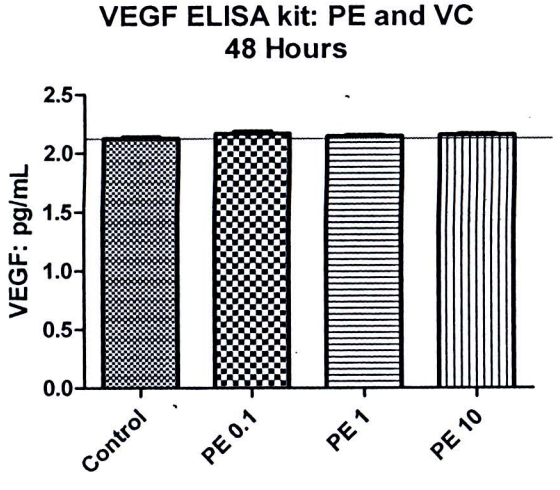
**รูปที่** 6. กราฟแสดงผลต่อการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด. บ่มด้วยน้ำคั้นมะขามป้อม (PE). ใช้ PE ที่ความเข้มข้น 0.1 – 100 µg/mL เปรียบเทียบกับ control และ VEGE ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL;

### *3.7 ผลของ PE ต่อปริมาณ VEGF ในอาหารเลี้ยงเซลล์*

VEGF เป็น growth factor กระตุ้นการแบ่งตัว การเจริญ และการเคลื่อนย้ายเซลล์ ในการทดลองนี้ทดสอบฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมสดต่อการสร้าง VEGF ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มะขามป้อมไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่ง VEGF ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด โดยคำนวณจาก standard curve ของ VEGF (pg/mL) ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8




**รูปที่** 7. แสดง Standard curve ของ Human VEGF (pg/mL) กับ rate OD 405 nm



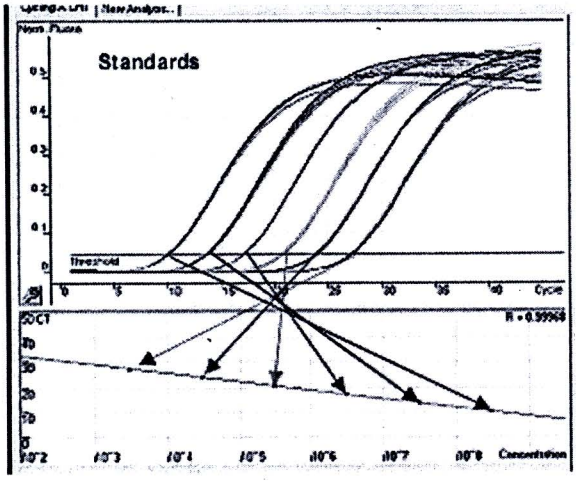

**รูปที่** 8 ฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมสดต่อปริมาณ VEGF ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทดสอบด้วยวิธี ELISA kit assays

### *3.8 ผลการศึกษาระดับ mRNA ของ VEGF ที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดภายหลังได้รับน้ำคั้นมะขามป้อมสด*

ผลของน้ำคั้นมะขามป้อมสดต่อระดับ mRNA ของ VEGF ที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด สามารถคำนวณได้จากการคำนวณเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลง (relative change) ที่เกิดขึ้น

ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารที่ใช้ทดสอบ ซึ่งในกรณีนี้คือน้ำคั้นมะขามป้อมสด โดยใช้การคำนวณจาก threshold cycle ($C_T$) ที่ได้จาก standard curve ของ primer แต่ละคู่ จะเรียกว่า การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณ (Quantification analysis) กล่าวคือ การวัด fluorescence ของ fluorophore ในปฏิกิริยาในเชิงปริมาณ สามารถมองเห็นการเพิ่มของ product ได้ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนในทุกรอบระหว่าง PCR (รูป S shape ของสัญญาณจะค่อยๆปรากฏเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบที่ทำ) และการวิเคราะห์การวัด fluorescence ในแต่ละรอบในช่วงเวลาหนึ่งๆทำได้โดยใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ สัญญาณในช่วง exponential phase จะสัมพันธ์กับปริมาณสารตั้งต้นของ target template ดังตัวอย่างของ standard ที่ 5 ความเข้มข้น (ดังรูปข้างล่าง) ซึ่งเมื่อนำมา plot กราฟ ได้เป็นเส้นตรงที่ทำให้สามารถเทียบหาความเข้มข้นของ unknown ซึ่ง amplify โดยใช้สภาวะเดียวกันได้

จากการทดลอง 4 ครั้ง แบบ triplicate พบว่า น้ำคั้นมะขามป้อมสดมีผลต่อการแสดงออกของยีน VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 9




**รูปที่** 9 แสดงการวัดปริมาณ fluorescence จาก standard ใน real-time PCR และกราฟเส้นตรงที่ได้ ซึ่งแสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ standard ณ ตำแหน่งใน exponential phase ของปฏิกิริยา

Standard curve ของ eNOS primer

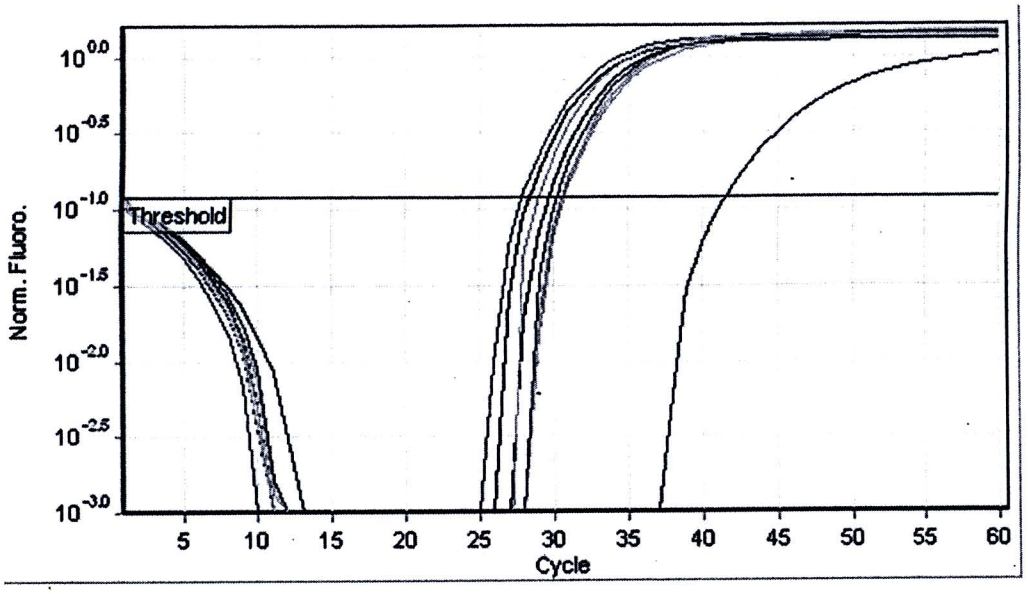
1. เตรียม cDNAs ของ HUVEC cells ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ทำ standard curve โดยเจือจางด้วย 50 ng/mL yeast RNA

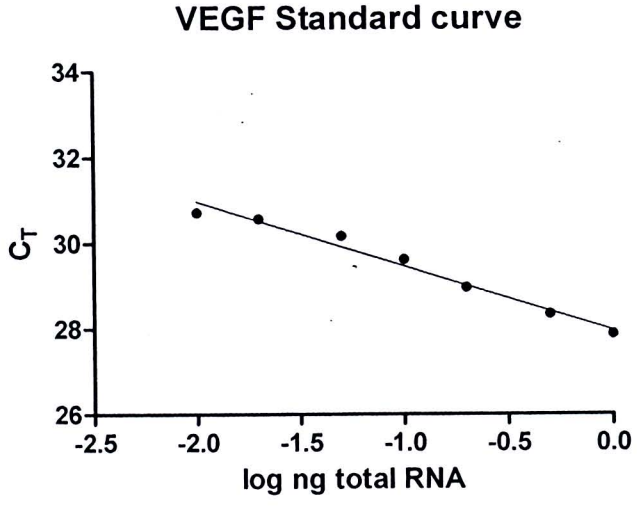
| Number tube | Volume(µL): yeast RNA 50 ng/mL | Volume(µL): cDNA HUVEC | Final conc. cDNA HUVEC |
|---|---|---|---|
| 1 | 18 | 10 ng/µL 2 µL | 1 ng/µL |
| 2 | 10 | 1 ng/µL 10 µL | 0.5 ng/µL |
| 3 | 12 | 0.5 ng/µL 8 µL | 0.2 ng/µL |
| 4 | 10 | 0.2 ng/µL 10 µL | 0.1 ng/µL |
| 5 | 10 | 0.1 ng/µL 10 µL | 0.05 ng/µL |
| 6 | 12 | 0.05 ng/µL 8 µL | 0.02 ng/µL |
| 7 | 10 | 0.02 ng/µL 10 µL | 0.01 ng/µL |
| 8 | 20 | - | 0 ng/µL |

2. นำ cDNA ของ HUVEC cells ที่ความเข้มข้นต่างๆมาทำ standard curve ด้วยเทคนิค Real time PCR (Rotor Gene 6000, Corbett Life Science, Australia)

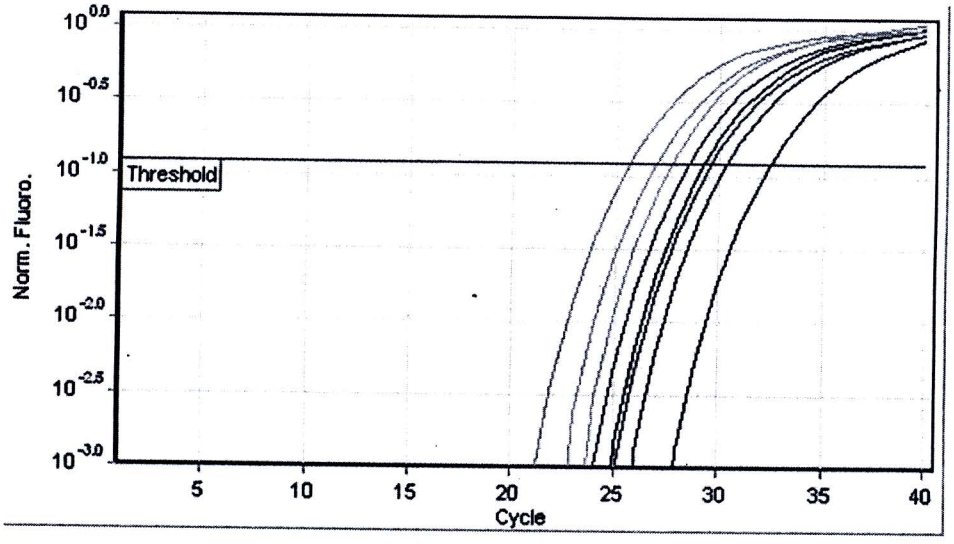
| | | | |
|---|---|---|---|
| Hold | 95 °C | 7 | นาที |
| Cycle: 60 | 95 °C | 10 | วินาที |
| | 45 °C | 15 | วินาที |
| | 72 °C | 20 | วินาที |
| Melt | 72 – 95°C | | |

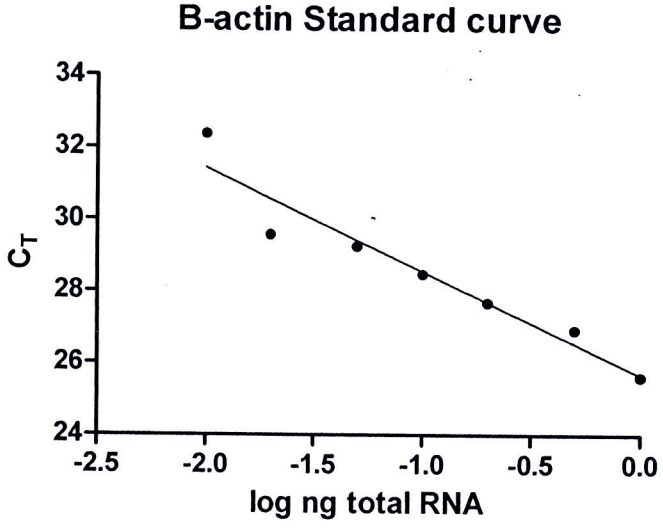
3. นำค่า $C_T$ ที่ได้มาเขียน Standard curve ดังรูปที่ 5 และ 6




**รูปที่ 10** แสดง Standard curve ของ VEGF primer



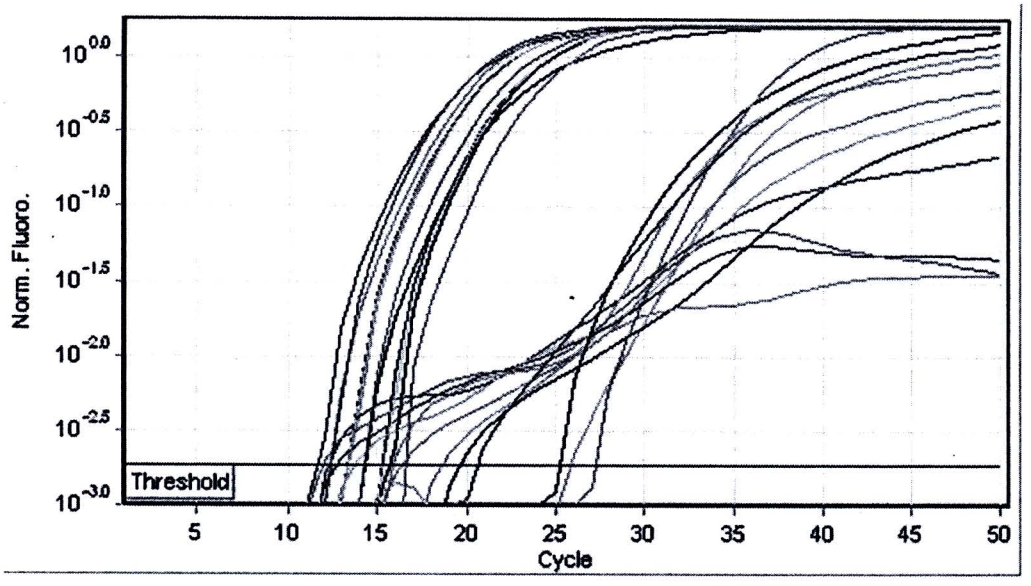

**รูปที่** 11. แสดง Standard curve ของ β-actin primer

ตัวอย่างการคำนวณผลการทดลองของการทดลอง 1 ครั้ง แสดงดังตารางที่ 2 (แต่ผลการทดลองใช้ค่าเฉลี่ยจากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง จาก separate experiments)

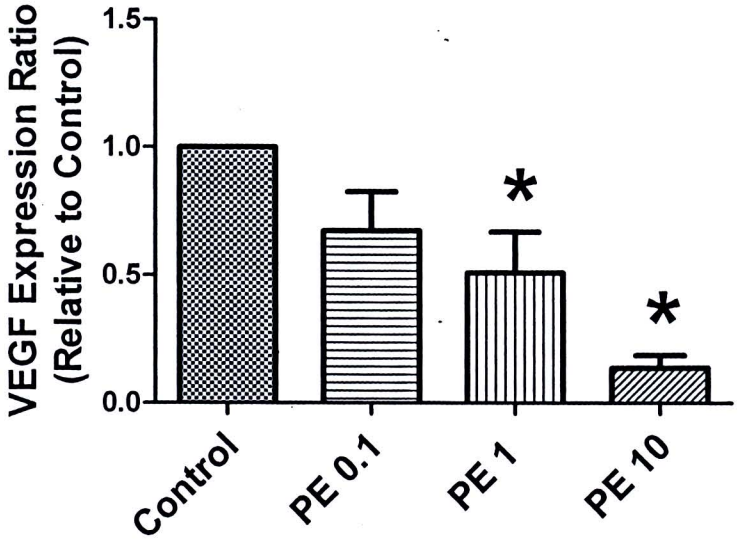
**ตารางที่ 2** ตัวอย่างการคำนวณค่าจากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ในตัวอย่าง mRNA ที่สกัดได้จากเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่บ่มร่วมกับน้ำคั้นมะขามป้อมสดที่ความเข้มข้นต่างๆ

| | B-actin set | VEGF set | Total RNA B-actin set | Total RNA VEGF set | VEGF Norm. to B-actin | VEGF Rel. to Control |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ctrl | 12.78 | 13.04 | 4.48 | 9.90 | | |
| Ctrl | 11.86 | 14.94 | 4.80 | 8.64 | | |
| Ctrl | 12.64 | 14.17 | 4.53 | 9.15 | | |
| AVG | 12.43 | 14.05 | 4.60 | 9.23 | 2.00 | 1.00 |
| PE 0.1 ug/mL | 11.89 | 17.01 | 4.79 | 7.27 | | |
| PE 0.1 ug/mL | 9.65 | 14.44 | 5.57 | 8.97 | | |
| PE 0.1 ug/mL | 13.74 | 13.55 | 4.15 | 9.56 | | |
| AVG | 11.76 | 15.00 | 4.84 | 8.60 | 1.78 | 0.89 |
| PE 1 ug/mL | 9.88 | 17.80 | 5.49 | 6.74 | | |
| PE 1 ug/mL | 8.90 | 16.08 | 5.83 | 7.88 | | |
| PE 1 ug/mL | 9.88 | 16.11 | 5.49 | 7.86 | | |
| AVG | 9.55 | 16.66 | 5.60 | 7.50 | 1.34 | 0.67 |
| PE 10 ug/mL | 13.82 | 24.63 | 4.12 | 2.21 | | |
| PE 10 ug/mL | 13.88 | 24.69 | 4.10 | 2.17 | | |
| PE 10 ug/mL | 15.03 | 25.76 | 3.70 | 1.46 | | |
| AVG | 14.24 | 25.03 | 3.97 | 1.83 | 0.46 | 0.23 |
| VitC 0.01 ug/mL | 13.68 | 18.99 | 4.17 | 5.95 | | |
| VitC 0.01 ug/mL | 13.71 | 19.72 | 4.16 | 5.47 | | |
| VitC 0.01 ug/mL | 12.70 | 20.61 | 4.51 | 4.88 | | |
| AVG | 13.36 | 19.77 | 4.28 | 5.43 | 1.27 | 0.63 |
| VitC 0.1 ug/mL | 12.04 | 22.08 | 4.74 | 3.90 | | |
| VitC 0.1 ug/mL | 12.12 | 22.05 | 4.71 | 3.92 | | |
| VitC 0.1 ug/mL | 12.01 | 21.55 | 4.75 | 4.25 | | |
| AVG | 12.06 | 21.89 | 4.73 | 4.03 | 0.85 | 0.42 |
| VitC 1 ug/mL | 11.15 | 24.73 | 5.05 | 2.14 | | |
| VitC 1 ug/mL | 12.96 | 25.67 | 4.42 | 1.52 | | |
| VitC 1 ug/mL | 13.91 | 24.18 | 4.09 | 2.51 | | |
| AVG | 12.67 | 24.86 | 4.52 | 2.06 | 0.46 | 0.23 |
| Mean | 12.43 | 14.05 | | | | |

A)



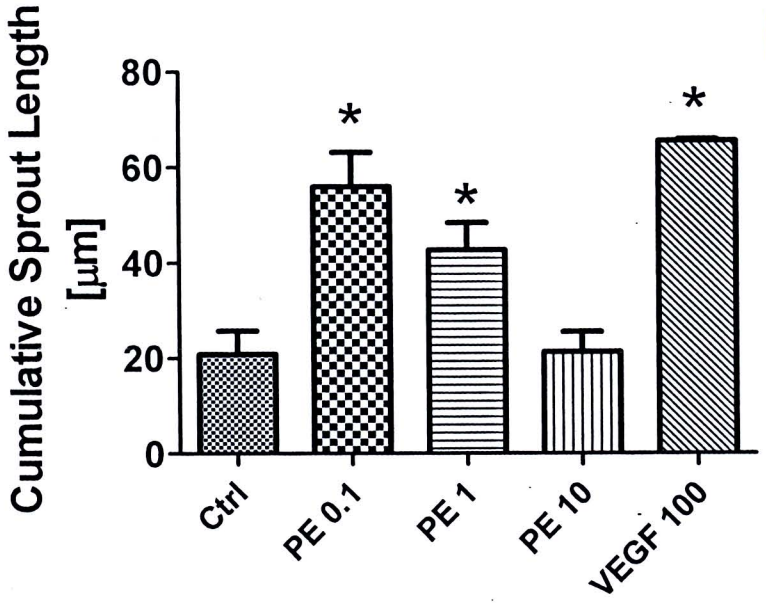

B)




**รูปที่** 12 ฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมสดต่อการแสดงออกของยีน VEGF ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR A) ภาพตัวอย่างของการเพิ่มปริมาณ target molecule เปรียบเทียบกับ reference molecule แล้วนำค่า threshold cycle ($C_T$) มาคำนวณเปรียบเทียบ ; B) ผลการทดลองเมื่อทดสอบน้ำคั้นมะขามป้อมสด (PE) ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 1, 10 µg/mL

### 3.9 *ฤทธิ์ต่อการงอกของหลอดเลือดใหม่ด้วยวิธี sprouting assay*

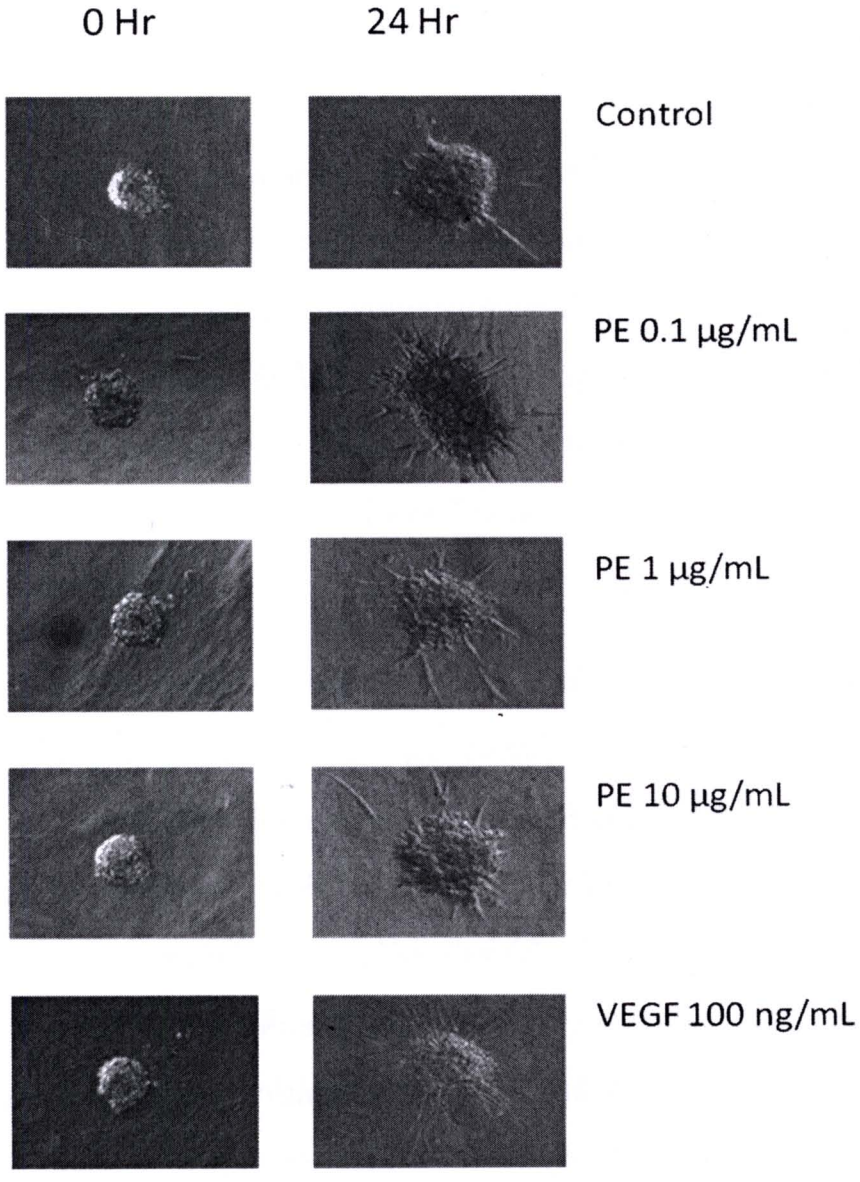
น้ำคั้นมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/mL มีฤทธิ์กระตุ้น endothelial sprouting อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เช่นเดียวกับการให้ VEGF ขนาด (100 ng/mL) ซึ่งใช้เป็น positive control สามารถเพิ่มการเกิด sprouting ได้ ประมาณ 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ PE ในปริมาณที่สูงขึ้นคือ 1 และ 10 µg/mL ไม่มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการเกิด endothelial sprouting อย่างมีนัยสำคัญ (รูป 13) ตัวแทนภาพถ่ายของการศึกษา endothelial sprouting แสดงดังรูปที่ 14




สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

**รูปที่ 13** ฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมสดต่อการงอกของหลอดเลือดใหม่ (angiogensis) ศึกษาด้วยวิธี sprouting assay. ศึกษามะขามป้อม (PE) ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10,100 µg/mL (PE 0.1, PE 1, PE 10 ตามลำดับ) *, $p<0.05$

A)




**รูปที่** 14 รูปแสดงฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อม (PE) ต่อการงอกของหลอดเลือดใหม่ (angiogensis) ศึกษาด้วยวิธี sprouting assay. PE ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 µg/mL (PE 0.1, PE 1, PE 10, ตามลำดับ)