DBG5180023 รศ.ดร. สุวรา วัฒนพิทยกุล

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247381

สกว
TRF

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สัญญาเลขที่ DBG5180023

โครงการ "ฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมสดในการกระตุ้นการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและการสร้างหลอดเลือดใหม่"

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.สุวรา วัฒนพิทยกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลินดา จุฬาโรจน์มนตรี

สิงหาคม 2553

b00252643 247381

สัญญาเลขที่ DBG5180023

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247381

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "ฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมสดในการกระตุ้นการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและการสร้างหลอดเลือดใหม่"

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. รศ.ดร.สุวรา วัฒนพิทยกุล	คณะแพทยศาสตร์ มศว.
2. ผศ.ดร.ลินดา จุฬาโรจน์มนตรี	คณะแพทยศาสตร์ ม.ธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

บทนำ

ปัจจุบันโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุหนึ่งของความเจ็บป่วยและการเสียชีวิตที่สำคัญของคนไทย โดยปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคนี้ ได้แก่ อายุ เพศ ประวัติในครอบครัว ความดันโลหิต ระดับไขมันในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือด พฤติกรรมการรับประทานอาหาร การออกกำลังกาย การสูบบุหรี่ และภาวะน้ำหนักเกิน อย่างไรก็ตามบางปัจจัยเสี่ยงนี้มีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพที่เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและส่งผลให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) ดังนั้นการดูแลและป้องกันโรคโดยลดปัจจัยเสี่ยงต่างๆ เหล่านี้จึงมีความสำคัญต่อผู้ป่วย

ในภาวะปกติเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมีบทบาทสำคัญในรักษาสมดุลของหลอดเลือด (vascular homeostasis) โดยควบคุมแรงตึงตัวของหลอดเลือด (vascular tone) การทำงานของเกล็ดเลือด การยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดขาวและการเกิดภาวะหลอดเลือดมีลิ่มเลือด (thrombosis) หากเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำงานผิดปกติอันเกิดจากการถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระหรือปัจจัยอื่นๆ จะมีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) หัวใจขาดเลือด (myocardial infarction) และหัวใจวาย เป็นต้น ดังนั้นการให้สารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และเร่งการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดหลังเซลล์ถูกทำลาย จึงมีประโยชน์ในการสร้างเสริมความแข็งแรงและส่งเสริมการทำหน้าที่ปกติของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ทำให้ลดปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้ผลมะขามป้อมสด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phyllanthus emblica* L. ทำการแยกน้ำและเตรียมน้ำคั้นน้ำมะขามป้อมสดในรูป freeze-dried powder ได้ yield 16.1% (w/v) และวิเคราะห์ปริมาณ ascorbic acid ด้วยวิธี HPLC พบว่ามีปริมาณ 1.574%$\pm$0.046 % (w/w) การศึกษาปริมาณ total phenolic compound ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay และใช้สาร gallic acid เป็นมาตรฐาน พบว่าน้ำคั้นมะขามป้อม 1 mg มีค่าเทียบเท่ากับ gallic acid 0.361$\pm$0.007 mg หรือ 36.1% การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay พบว่า

มีค่า FRAP value ในเดือนที่ 0 เท่ากับ 3,643±192.5 µmole/mg และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำมาทดสอบซ้ำในเดือนที่ 12 พบว่ามีค่าเท่ากับ 3,694 ± 105.8 µmole/mg แสดงให้เห็นว่าการเก็บน้ำคั้นมะขามป้อมสดในรูปผงแห้งไว้ในที่เย็น 4 °C ไม่ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์พบว่ามะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 – 100 µg/mL ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL ทำให้เซลล์ลดจำนวนลงเหลือประมาณ 62% ($p<0.05$) การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลด้วยวิธี scratch wound closure assay พบว่า มะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/mL มีฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลได้อย่างมีนัยสำคัญ และใกล้เคียงกับการใช้ vascular endothelial growth factor (VEGF) ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบการเกิด endothelial sprouting พบว่า มะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/mL มีฤทธิ์กระตุ้นการเกิดการงอกของโครงสร้างคล้ายหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการทดลอง

มะขามป้อมที่นำมาทดสอบมีปริมาณ ascorbic acid อยู่ในระดับปานกลางคือ 1.57% (พบได้ตั้งแต่ 1.1 ถึง1.7%) และการเก็บน้ำคั้นในรูป freeze-dried ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ปี ไม่ทำให้ฤทธิ์เป็นตัวต้านออกซิเดชันลดลง น้ำมะขามป้อมไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/mL มีฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด โดยไม่พบความเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน VEGF และปริมาณการสร้าง VEGF ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ดังนั้น กลไกในการเร่งการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจึงน่าจะเกิดจากการกระตุ้นการเคลื่อนย้ายเซลล์ นอกจากนี้น้ำคั้นมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/mL ยังให้ผลในการกระตุ้นการเกิด endothelial sprouting ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำคั้นมะขามป้อมมีแนวโน้มในการเร่งการสมานแผลและการสร้างหลอดเลือดใหม่ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดหลังจากเกิด endothelial damage และอาจช่วยป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้

Abstract

247381

The hallmark of pathophysiology of cardiovascular disease is endothelial dysfunction characterized by diminished bioavailability of nitric oxide (NO) produced by endothelial cells. The loss in endothelial function is associated with oxidative stress leading to endothelial damage, apoptosis, and pathogeneses of atherosclerosis, stroke and myocardial infarction. Several studies have been shown that antioxidants from natural sources decrease oxidative stress and protect against cellular damage caused by reactive oxygen species (ROS). In this study, we examined the antioxidant constituents and capacity of *Phyllanthus emblica* L. (PE) fruit juice, including ascorbic acid content, total phenolic content, and total antioxidant capacity evaluated by the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. Additionally, The pharmacological properties of PE were investigated using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in the aspects of endothelial cell proliferation, wound healing, and sprouting. The ascorbic acid content of PE was 1.574%+0.046 % (w/w) as determine by HPLC and the total phenolic content was 36.1%±0.7% gallic acid equivalent when measured by Folin-Ciocalteu assay. The FRAP assay revealed a relatively high antioxidant capacity at 3,643+192.5 μmole/mg. PE at 0.1 – 100 μg/mL did not significantly influence endothelial cell proliferation but PE at 1,000 μg/mL decreased cell survival to 62%. PE 0.1 and 1 μg/mL significantly promoted endothelial wound closure and enhanced endothelial sprouting. Therefore, antioxidant supplements and agents that promote healing of endothelial damage may have significant role in prevention and reduction of cardiovascular risks.

บทคัดย่อ

247381

ลักษณะที่เด่นชัดของพยาธิสรีรวิทยาของโรคหัวใจและหลอดเลือดคือการเสื่อมหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ซึ่งมีลักษณะสำคัญคือการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด การสูญเสียหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสัมพันธ์กับภาวะความเครียดออกซิเดส ซึ่งจะนำไปสู่การทำลายเซลล์ การตายแบบ apoptosis และพยาธิกำเนิดของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง โรคหลอดเลือดในสมอง และโรคหัวใจขาดเลือด มีการศึกษามากมายแสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติสามารถป้องกันการทำลายเซลล์จาก reactive oxygen species โครงการวิจัยนี้ศึกษาองค์ประกอบที่เป็นตัวต้านออกซิเดชันของน้ำคั้นมะขามป้อม ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phyllanthus emblica* L.(PE) ได้แก่ปริมาณวิตามินซี ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และความาสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay นอกจากนี้ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยใช้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่แยกได้จากสายสะดือทารกเพื่อทดสอบผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การสมานแผล และการเกิดการงอกของหลอดเลือด การวิเคราะห์ด้วย HPLC พบปริมาณวิตามินซี 1.574%+0.046 % (w/w) และพบปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 36.1%±0.7% gallic acid equivalent เมื่อทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay ความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันค่อนข้างสูง เท่ากับ 3,643+192.5 µmole/mg จาก FRAP assay PE ที่ความเข้มข้น 0.1 – 100 µg/mL ไม่มีผลกระทบต่อการแบ่งตัวอย่างมีนัยสำคัญ แต่ PE ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL ลดจำนวนเซลล์ลงเหลือ 62% เมื่อให้ PE ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 µg/mL จะเร่งการสมานแผลเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และการงอกของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ดังนั้น การให้ตัวต้านออกซิเดชั่นเสริม หรือให้สารที่เร่งการสมานแผลเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจากการที่เซลล์ถูกทำลายจึงอาจมีความสำคัญในการป้องกันและลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้

สารบัญ

Executive Summary i

Abstract iii

บทคัดย่อ iv

1. บทนำ 1

2. ระเบียบวิธีวิจัย 5

2.1 การเตรียมน้ำคั้นมะขามป้อมสดในรูป freeze-dried 5

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในมะขามป้อมด้วย HPLC 5

2.3 การหาปริมาณ Total phenolic compound ในน้ำคั้นมะขามป้อม 6

2.4 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อม 6

2.5 การสกัดและเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด 7

2.6 การทดสอบผลของน้ำคั้นมะขามป้อมต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay 7

2.7 การทดสอบของน้ำคั้นมะขามป้อมต่อการสมานแผลแบบ in vitro (Scratch wound closure assay) 8

2.8 การวัดปริมาณ VEGF ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี competitive ELISA 9

2.9 การศึกษาฤทธิ์ต่อการเพิ่มระดับ mRNA ของ VEGF ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดภายหลังได้รับน้ำคั้นมะขามป้อม 11

2.10 การศึกษาฤทธิ์ต่อการงอกของหลอดเลือดใหม่ด้วยวิธี sprouting assay 13

3. ผลการทดลอง 15

3.1 น้ำคั้นมะขามป้อมสดในรูป freeze-dried 15

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในมะขามป้อมด้วยวิธี HPLC 15

3.3 ปริมาณ Total phenolic compound ในน้ำคั้นมะขามป้อม 18

3.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นมะขามป้อม 18

3.5 ผลของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ในน้ำคั้นมะขามป้อม 19

3.6 ฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลของน้ำคั้นมะขามป้อม (Scracth wound closure assay) 20

3.7 ผลของ PE ต่อปริมาณ VEGF ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 22

3.8 ผลการศึกษาระดับ mRNA ของ VEGF ที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดภายหลังได้รับน้ำคั้นมะขามป้อมสด 23

3.9 ฤทธิ์ต่อการงอกของหลอดเลือดใหม่ด้วยวิธี sprouting assay 30

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 31

5. เอกสารอ้างอิง 35