ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246363

สกว
TRF

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานและการซ่อมแซมเยื่อบุหลอดเลือด"

สัญญาเลขที่ RDG5120068

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.สุวรา วัฒนพิทยกุล และคณะ

เมษายน 2553

600251044

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

246363

สัญญาเลขที่ RDG5120068

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานและการซ่อมแซมเยื่อบุหลอดเลือด"

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

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

**ชุดโครงการ "สมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิต"**

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

# Executive Summary

**บทนำ**

โรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการตายลำดับสองของประเทศ และกำลังทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากวิถีชีวิตที่ปรับเปลี่ยนไปตามวัฒนธรรมตะวันตก โรคหัวใจและหลอดเลือดมีค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วยสูง เนื่องจากเป็นโรคที่ต้องได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่องตลอดชีพ ดังนั้นการปรับวิถีการดำเนินชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องเกี่ยวกับโภชนะบำบัดจึงเป็นนโยบายที่สำคัญในการป้องกันโรคและสร้างเสริมสุขภาพ

เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจากในสภาวะปกติ จะทำหน้าที่สร้างไนตริกออกไซด์เพื่อรักษาสมดุลความตึงของหลอดเลือด รวมทั้งทำหน้าป้องกันการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด การเกาะติดของเม็ดเลือดขาว ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะช่วยป้องกันกระบวนการอักเสบ และการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดได้ เมื่อเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำหน้าที่ผิดปกติ (endothelial dysfunction) จากถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ หรือเกิดพยาธิสาภาพอย่างอื่นจะเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นการให้สารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์จึงมีประโยชน์ในการสร้างเสริมความแข็งแรงและส่งเสริมการทำหน้าที่ปกติของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ทำให้ลดปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งในการสร้างองค์ความรู้ในชุดโครงการ “Thai Fruits – Functional Fruits” เพื่อสนับสนุนการบริโภคผลไม้ไทย โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อสร้างหลักฐานทางวิทยาศาสตร์จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำคั้นส้มโอสองสายพันธุ์คือ ขาวแตงกวา และ ทับทิมสยาม ที่เตรียมในรูป freeze-dried ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของสารต้านอนุมูลอิสระบางกลุ่มที่อาจเกิดขึ้นเมื่อสารนั้นๆ อยู่ในสภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการเป็น antioxidant รวมทั้งวัดปริมาณ total phenolic compounds ในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทำการทดลองในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในด้านการทำงาน คือ การสร้างไนตริกออกไซด์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการซ่อมแซมเซลล์ในภาวะที่บาดเจ็บ

**ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง**

การทดสอบฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์ใช้วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay ได้ค่า FRAP value [mmol $FeSO_4.7H_2O$/mg lyophilize] สำหรับพันธุ์ขาวแตงกว่าเท่ากับ 53.43±4.265 μmol $FeSO_4.7H_2O$/g lyophilize ส่วนพันธุ์ทับทิมสยามมีค่าเท่ากับ 64.44±4.549 μmol $FeSO_4.7H_2O$/g

lyophilize หรือค่าเฉลี่ย 5.23 mmol $Fe^{2+}$/L และ 6.92 mmol $Fe^{2+}$/L ตามลำดับ ส่วนปริมาณ total phenolic compounds ตรวจวัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay โดยใช้เปรียบเทียบกับ gallic acid (gallic acid equivalence, GAE) พบว่าน้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์มีค่า GAE (mg/g freeze-dried powder) เท่ากับ 6.26 และ 6.91 ตามลำดับ หรือคิดเป็น GAE (mg/L) เท่ากับ 557.39 และ 698.09 ตามลำดับ

การทดลองในเซลล์เริ่มจากการเตรียมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจากสายสะดือทารกแรกคลอด แล้วทดสอบประสิทธิภาพของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด คือ วัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ในรูปของไนไตรท์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่คงตัวของไนตริกออกไซด์ ผลการทดลองพบว่าการบ่มน้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 1000 μg/mL กับเซลล์เป็นเวลา 48 ชม. ไม่ก่อให้เกิดความเปลี่ยนของปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ การทดสอบฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน eNOS ทำได้โดยเทคนิค RT-PCR โดยสกัด total RNA จากเซลล์ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แล้วเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA แล้วจึงทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ primers ที่จำเพาะกับ eNOS โดยเปรียบเทียบกับปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดจาก house keeping gene คือ GAPDH ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าน้ำคั้นส้มโอที่ปริมาณความเข้มข้นสูงสุด 1000 μg/mL ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน eNOS เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เนื่องจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ อาจเป็นกระบวนการหนึ่งของการซ่อมแซมบริเวณที่มีการบาดเจ็บ ดังนั้นจึงตรวจวัดผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด วิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay พบว่าน้ำคั้นส้มโอไม่มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านภาวะ oxidative stress จากการเหนี่ยวนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้วิธีวัด fluorescent intensity ที่เกิดจาก 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) โดยอาศัยหลักการคือ สาร DCFH-DA จะเป็นสาร non-fluorescent ที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้อย่างอิสระ แต่หลังจากทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม ROS จะเกิดเป็นอนุพันธ์ที่สามารถให้แสงฟลูออเรสเซนซึ่งจะแปรผันไปตามปริมาณอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น หรืออีกนัยหนึ่งก็คือปริมาณ ROS ที่มีภายในเซลล์ ผลการทดลองแสดงว่า น้ำคั้นส้มโอสามารถลดภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์จากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

การศึกษาฤทธิ์ต่อการสมานแผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ทำโดยวิธี scratch wound closure assay คือทำให้เกิดรอยแผลโดยการขีดลงบนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่เลี้ยงให้เจริญจนเต็มครอบคลุของภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นใช้วัสดุแข็งเช่น pipette tip ขีดให้เป็นรอย แล้ววัดระยะทางของการปิดเข้ามาของบาดแผลที่เกิดกับเซลล์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำคั้นส้มโอที่ความเข้มข้น 1000 μg/mL สามารถเร่งการปิดสมานแผลที่เกิดขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 48 ชั่วโมง

**สรุปผลการทดลอง**

น้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์เป็น antioxidant ในระดับใกล้เคียงกับน้ำผลไม้จากต่างประเทศบางชนิด เช่นน้ำแอปเปิ้ล น้ำสับปะรด ส่วนปริมาณ total phenolic compounds มีระดับใกล้เคียงกับน้ำผลไม้ประเภทเครื่องดื่ม เช่น turnip juice, orange nectar, sour cherry juice, และ apricot nectar เป็นต้น ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดพบว่าน้ำคั้นส้มโอไม่มีผลต่อการสร้างไนตริกออกไซด์เมื่อบ่มร่วมกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์คือ eNOS การศึกษาเกี่ยวกับการลดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์พบว่า น้ำคั้นส้มโอสามารถลดระดับ ROS ภายในเซลล์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการอยู่รอดของเซลล์ ผลการทดสอบการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดโดยใช้โมเดล scratch wound closure assay แสดงให้เห็นว่า น้ำคั้นส้มโอที่ความเข้มข้น 1000 μg/mL สามารถเร่งการสมานแผลได้อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 48 ชั่วโมง

# Abstract

246363

The hallmark of pathophysiology of cardiovascular disease is endothelial dysfunction and endothelial damage. Targeting against vascular endothelial cell dysfunction and promoting endothelial cell repair represent a new challenge in cardiovascular interventions. Here we investigate the antioxidant property of pomelo (*Citrus maxima* (Burm. f.) Merr., CM) fruit juice and effects on endothelial nitric oxide production and endothelial wound repair *in vitro*. Two varieties of pomelo were used in this study, including var. "Kao Tang Kwa" (CM1) and CM var. "Tub Tim Siam" (CM2). The fruit juice was lyophilized and kept at 4 °C until use. The antioxidant capacity was evaluated by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay and the total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu method. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from umbilical cord of newborns. Nitric oxide (NO) production was measured by Griess reaction while RT-PCR detected the change in eNOS mRNA expression. Effect of CM on $H_2O_2$-induced oxidative stress was detected by changes in fluorescent intensity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Endothelial cell proliferation (MTT assay) and scratch wound closure assay were evaluated for the potential activity of CM in enhancing wound healing. The antioxidant capacities of CM1 and CM2 were were 53.43±4.265 and 64.44±4.549 μmol $FeSO_4$/g lyophilize powder, respectively The total phenolic contents were equivalent to 6.26 and 6.91 mg gallic acid/g powder for CM1 and CM2, respectively. No changes in NO production or eNOS expression were detected in HUVECs treated with both CMs at highest concentration used (1000 μg/mL). CMs significantly reduced cellular ROS levels in HUVECs treated with $H_2O_2$ but no alteration in cell survival was observed. Despite no significant increase in cell proliferation was detected CMs at 1000 μg/mL promoted endothelial wound healing at 48 h ($p<0.05$). In summary, CM may enhance endothelial cell repair by mechanisms not related to nitric oxide production or cell proliferation.

# บทคัดย่อ

246363

ลักษณะที่เด่นชัดของพยาธิสรีรวิทยาของโรคหัวใจและหลอดเลือดคือการเสื่อมหน้าที่และการถูกทำลายของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด เป้าหมายหมายการรักษาใหม่ๆจึงมุ่งเน้นเกี่ยวกับการส่งเสริมการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด งานวิจัยนี้ศึกษาคุณสมบัติการเป็น antioxidant ของน้ำคั้นส้มโอสองสายพันธุ์คือ พันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) และศึกษาฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างไนตริกออกไซด์ และการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในหลอดทดลอง โดยเตรียมน้ำคั้นส้มโอในรูปของผงแห้งและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC จนกว่าจะทำการทดลอง วัดความสามารถในการเป็น antioxidant ด้วยวิธี Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay และวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ส่วนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสกัดได้จากหลอดเลือดดำของสายสะดือทารกแรกคลอด ตรวจวัดผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี Griess reaction และวัดการแสดงออกของยีน eNOS ด้วยวิธี RT-PCR การวัดฤทธิ์ต้าน oxidative stress ภายในเซลล์จากการเหนี่ยวนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำได้โดยวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate กับสารในกลุ่ม ROS การศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอในการเร่งการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำโดยวัดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย MTT assay และวัดการสมานแผลของเซลล์ด้วย scratch wound closure assay ผลการทดลองแสดงว่าน้ำคั้นส้มโอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวัดเป็นหน่วย µmol $FeSO_4$/g lyophilize powder มีค่าเท่ากับ 53.43±4.265 และ 64.44±4.549 สำหรับ CM1 และ CM2 ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 6.26 และ 6.91 mg gallic acid/g powder สำหรับ CM1 และ CM2 ตามลำดับ จากการตรวจวัดการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของยีน eNOS ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับน้ำคั้นส้มโอที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 1000 µg/mL น้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์สามารถลดระดับ ROS ในเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ น้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL มีฤทธิ์เร่งการสมานแผลเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดได้ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่มีผลกระทบต่อการแบ่งตัวเพิ่มปริมาณเซลล์ กล่าวโดยสรุป น้ำคั้นส้มโออาจมีฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดด้วยกลไกอื่นๆที่ไม่ผ่านการทำงานของไนตริกออกไซด์ หรือการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์

# สารบัญ

Executive Summary....................i
Abstract....................iv
**บทคัดย่อ** ....................v
**1. บทนำ** .................... 1
**2. ระเบียบวิธีวิจัย** .................... 4
2.1 การเตรียมน้ำคั้นส้มโอในรูป freeze-dried....................4
2.2 การหาปริมาณ total phenolic compound ในน้ำคั้นส้มโอ....................6
2.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นส้มโอ ....................6
2.4 การสกัดและเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ....................7
2.5 การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ....................7
2.6 การศึกษาฤทธิ์ต่อการเพิ่มระดับ mRNA ของ eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ....................10
2.7 การทดสอบผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay....................12
2.8 การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจากภาวะ Oxidative stress....................13
2.9 การทดสอบของน้ำคั้นส้มโอต่อการสมานแผลแบบ in vitro scratch wound closure assay...14
2.10 สถิติ....................15
**3. ผลการทดลอง** .................... 16
3.1 ปริมาณ total phenolic compound ในน้ำคั้นส้มโอ....................16
3.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นส้มโอ....................17
3.3 ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ....................17
3.5 ระดับ mRNA ของ eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดภายหลังได้รับน้ำคั้นส้มโอ ....................19
3.6 ผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับ $H_2O_2$....................23
3.7 ฤทธิ์ปกป้องเซลล์จากภาวะ Oxidative stress ....................25
3.8 ฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลของน้ำคั้นส้มโอ (scratch wound closure assay)....................27
**4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง**.................... 29
**ภาคผนวก** ....................41