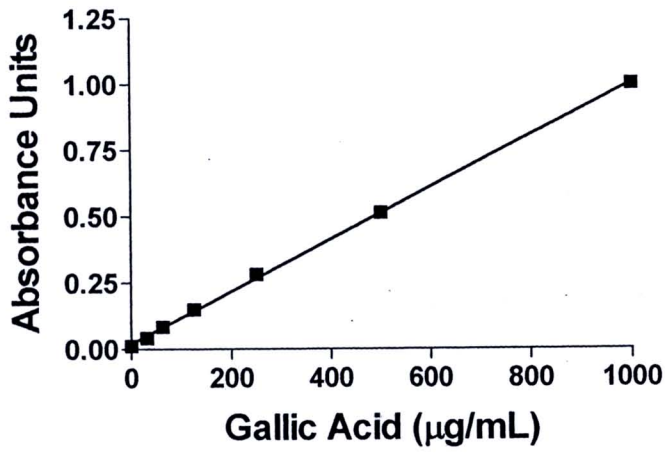
3. ผลการทดลอง

3.1 *ปริมาณ total phenolic compound ในน้ำคั้นส้มโอ*

การหาปริมาณฟีนอลรวมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และใช้คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลรวมในรูปของ gallic acid equivalents โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3) ต่อน้ำคั้นส้มโอในรูปผงแห้ง 1 กรัม (มิลลิกรัม gallic acid/1 กรัม freeze-dried) จากผลการทดลอง ปริมาณสารฟีนอลรวมในน้ำคั้นส้มโอจาก calibration curve พบว่า CM1 มีค่า 6.26 mg GAE/g Lyophilized ส่วน CM2 มีค่า 6.91 mg GAE/g freeze-dried หรือ 557.39 g GAE/L และ 698.09 g GAE/L ตามลำดับ



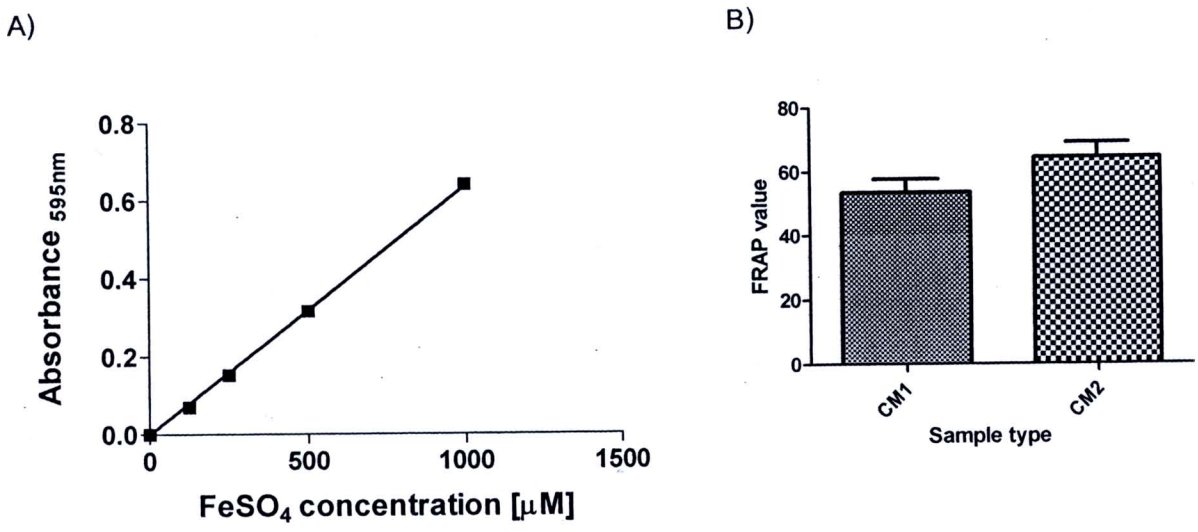
รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของ gallic acid

วิธีคำนวณ

ส้มโอพันธุ์	Fruit Juice (mL)	Freeze-dried powder (g)	mL fruit juice per 1 g freeze-dried powder	GAE (mg/g freeze-dried powder)	GAE (mg/L)
CM1	125	11.13	11.23	6.26	557.39
CM2	380	38.39	9.90	6.91	698.09

3.2 *ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นส้มโอ*

ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นส้มโอด□วยวิธี reducing power method ซึ่งเป□นการทดสอบความสามารถในการเป□นตัวรีดิวส□ของสารต□านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) โดย คือ FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) assay และรายงานผลเป□นค□า FRAP value (mmol $FeSO_4.7H_2O$/mg lyophilize) จากผลการทดลองความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นส้มโอจาก calibration curve พบว่า CM1 มีค่าอยู่ในช่วง 53.43±4.27 μmol $FeSO_4.7H_2O$/g lyophilize ส่วน CM2 มีค่าอยู่ในช่วง 64.44±4.55 μmol $FeSO_4.7H_2O$/g lyophilize หรือค่าเฉลี่ย 5.23 mmol Fe^{2+}/L และ 6.92 mmol Fe^{2+}/L ตามลำดับ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ปริมาณ Antioxidant Power ในน้ำคั้นส้มโอ; A) กราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$; B) ค่า FRAP value (μmol Fe^{2+}/g dry fruit juice powder) แตกต่างกันระหว่างส้มโอสองสายพันธุ์

3.3 *ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด*

การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดด้วยวิธี Griess Reaction พบว่า น้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา และพันธุ์ทับทิมสยามไม่มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการหลั่งไนตริกออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.41$ และ $p = 0.31$ ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 5 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม positive control คือ

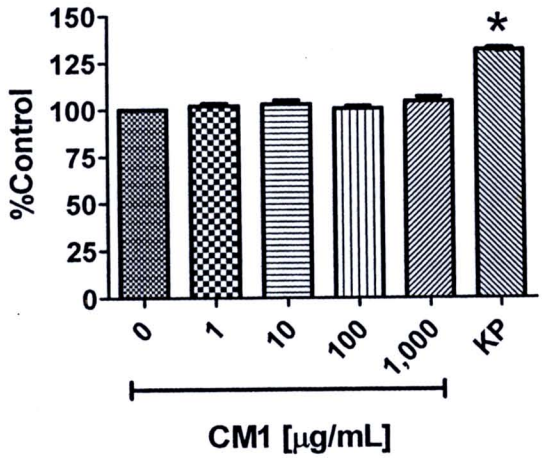
เซลล์ที่ได้รับสารสกัดกระชายดำ พบว่าสารสกัดกระชายดำสามารถเพิ่มการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ ซึ่งแสดงว่าวิธีการทดลองนี้สามารถตรวจวัดความเปลี่ยนแปลงของปริมาณเมตาบอไลท์ซึ่งเป็นสารคงตัวของไนตริกออกไซด์ได้

ตารางที่ 2 ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ของน้ำคั้นส้มโอ (ตัวเลขแสดงในรูปของ mean ± SEM) และ positive control (กระชายดำสกัด, KP) ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL

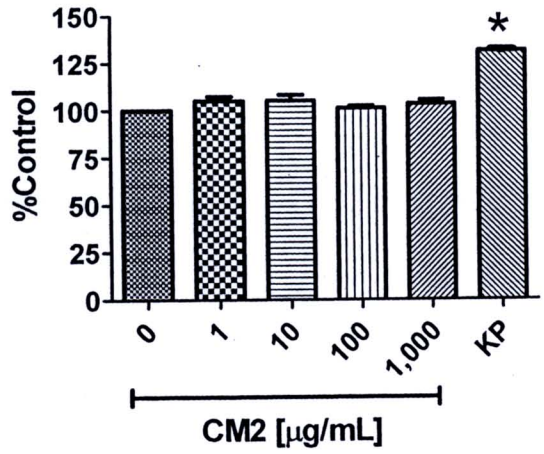
ตัวอย่าง	**ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ (% control) เมื่อใช้ส้มโอในรูปแบบ freeze-dried หรือสารสกัดที่ความเข้มข้น (µg/mL)**			
	1	10	100	1000
ขาวแตงกวา (CM1)	102.07 ± 1.37	102.79 ± 2.12	100.59 ± 1.25	104.22 ± 2.41
ทับทิมสยาม (CM2)	105.03 ± 2.42	105.20 ± 3.15	101.20 ± 1.09	103.34 ± 2.08
กระชายดำ (KP)	-	131.48 ± 0.46 *	-	-

*, $p < 0.05$

A)



B)



รูปที่ 5 ฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่อการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด A) น้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1); B) พันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) โดยเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดกระชายดำ (KP) ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL. *, $p<0.05$

3.5 ระดับ mRNA ของ eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดภายหลังได้รับน้ำคั้นส้มโอ

ผลของน้ำคั้นส้มโอต่อระดับ mRNA ของ eNOS ที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสามารถคำนวณได้จาก realtime quantitative PCR และวิธี $2^{-\Delta\Delta C_T}$ การคำนวณในลักษณะนี้เรียกว่าเป็นการเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลง (relative change) ที่เกิดขึ้นระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารที่ใช้ทดสอบ (27) ซึ่งในกรณีนี้คือน้ำคั้นส้มโอ โดยใช้การคำนวณจาก threshold cycle (C_T) ซึ่งมีการderive มาจากสูตรคำนวณเบื้องต้นของการคำนวณการเพิ่มจำนวนดีเอนเอในกระบวนการ PCR คือ

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

เมื่อ

X_n คือจำนวน target molecule ที่ cycle n

X_0 คือ จำนวนเริ่มต้นของ target molecule

E_x คือ efficiency ของ target amplification

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ถ้าในสมการใช้ค่า threshold cycle (C_T) ในการบ่งบอกถึง fractional cycle number ที่ปริมาณของโมเลกุลเป้าหมายมีจำนวนถึงปริมาณที่กำหนด (fixed threshold) ก็จะได้สมการดังนี้คือ

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x$$

เมื่อ

X_T คือ threshold number ของโมเลกุลเป้าหมาย

$C_{T,X}$ คือ threshold cycle ของการเพิ่มจำนวนโมเลกุล

K_x คือ ค่าคงที่

ในกรณีที่มี internal control หรือโมเลกลุอ้างอิง (reference molecule ซึ่งในการทดลองนี้คือยีนของ beta-actin) สมการจะเป็นดังนี้

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

เมื่อ

R_T คือ threshold number ของโมเลกุลอ้างอิง

R_0 คือ จำนวนเริ่มต้นของ reference molecule

E_R คือ efficiency ของ reference amplification

$C_{T,R}$ คือ threshold cycle ของการเพิ่มจำนวนโมเลกุลอ้างอิง

K_R คือ ค่าคงที่

เมื่อนำค่า X_T มาหารด้วย R_T จะได้สัดส่วนการแสดงออกของยีน

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1+E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1+E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K$$

ซึ่งเมื่อคำนวณในลักษณะ Normalized

กล่าวโดยสรุป การคำนวณโดยใช้การอ้างอิงโมเลกุลมาตรฐานจะแสดงออกมาในรูปของสัดส่วนของปริมาณยีนที่เปลี่ยนแปลงไปและอยู่ในรูปของสมการ

$$-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$$; cb = calibrator

ดังนั้น Amount of target molecule = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

เมื่อ ΔC_T = ความแตกต่างระหว่าง threshold cycle ของ target และ reference molecule $(C_{T,x} - C_{T,R})$

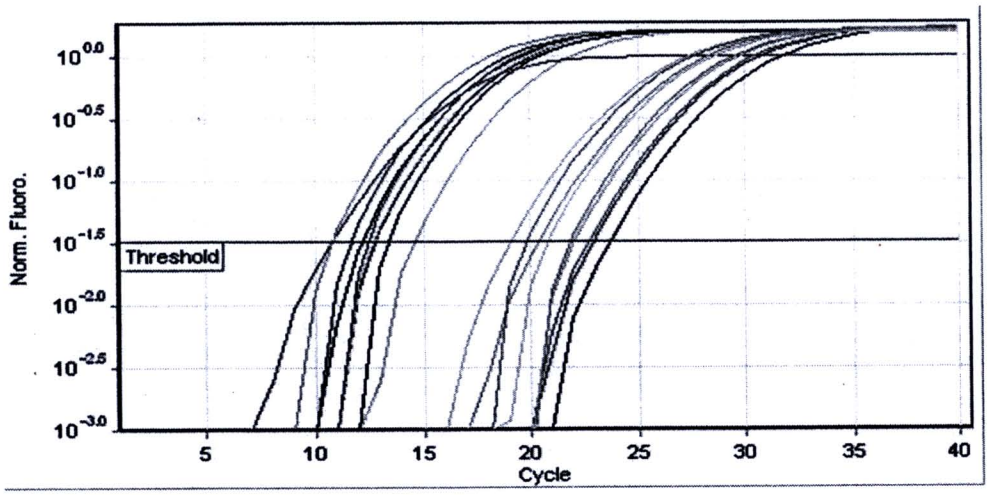
ตัวอย่างการคำนวณผลการทดลองของการทดลอง 1 ครั้ง แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการคำนวณค่า $2^{-\Delta\Delta C_T}$ จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ในตัวอย่าง mRNA ที่สกัดได้จากเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่บ่มร่วมกับน้ำคั้นส้มโอที่ความเข้มข้นต่างๆ

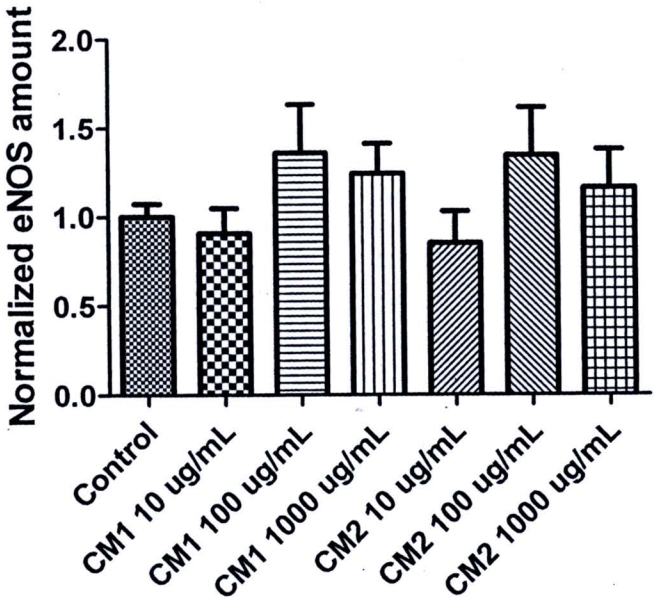
	B-actin set	eNOS set	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Mean Fold change in gene expression	SEM	Ratio	Mean Ratio to CTRL	SEM ratio to CTRL
Ctrl	13.20	22.96	1.02			1.01		
Ctrl	15.16	25.20	0.84			0.83		
Ctrl	15.86	25.43	1.16	1.01	0.09	1.15	1.00	0.09
CM1 10	16.61	26.66	0.84			0.83		
CM1 10	14.58	25.64	0.41			0.41		
CM1 10	16.88	26.68	0.99	0.75	0.17	0.98	0.74	0.17
CM1 100	14.21	22.91	2.13			2.11		
CM1 100	12.87	21.83	1.78			1.76		
CM1 100	12.55	22.18	1.12	1.67	0.30	1.11	1.66	0.29
CM1 1000	13.05	21.87	1.96			1.94		
CM1 1000	13.82	22.78	1.78			1.76		
CM1 1000	13.26	22.44	1.53	1.75	0.13	1.51	1.74	0.12
CM2 10	15.70	25.24	1.19			1.18		
CM2 10	16.83	26.54	1.06			1.05		
CM2 10	14.97	25.51	0.59	0.95	0.18	0.59	0.94	0.18
CM2 100	18.66	28.41	1.03			1.02		
CM2 100	15.88	26.99	0.40			0.40		
CM2 100	16.45	27.34	0.47	0.63	0.20	0.46	0.63	0.20
CM2 1000	13.44	22.13	2.14			2.12		
CM2 1000	13.27	24.10	0.49			0.48		
CM2 1000	13.20	23.33	0.79	1.14	0.51	0.78	1.13	0.50

จากการทดลอง 4 ครั้ง แบบ triplicate พบว่า น้ำคั้นส้มโอไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน eNOS อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 6

A)



B)



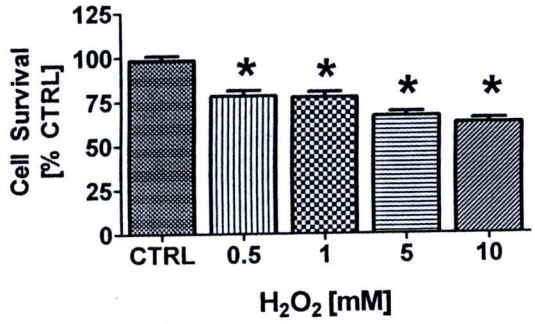
รูปที่ 6 ฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่อการแสดงออกของยีน eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทดสอบด้วยวิธี real-time RT-PCR A) ภาพตัวอย่างของการเพิ่มปริมาณ target molecule เปรียบเทียบกับ reference molecule แล้วนำค่า threshold cycle (C_T) มาคำนวณเปรียบเทียบ ; B) ผลการทดลองเมื่อทดสอบน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) พันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 10, 100, 1000 µg/mL

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

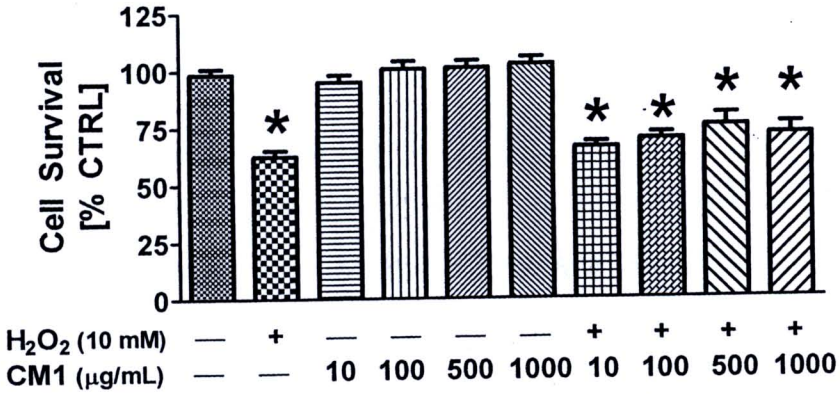
3.6 *ผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับ* H_2O_2

เนื่องจากการเปรียบเทียบปริมาณ ROS ภายในเซลล์มีปัจจัยเรื่องของจำนวนเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ดังนั้น เพื่อให้เกิดการเปรียบเทียบอย่างถูกต้อง จึงต้องวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หลังได้รับสารที่ใช้ทดสอบ แล้วจึงนำมาคำนวณเปรียบเทียบปริมาณ ROS ต่อจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน ในการศึกษานี้ใช้ MTT assay วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต พบว่า H_2O_2 ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (0.5, 1, 5, 10 mM) ลดการอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 7A) และเมื่อให้เซลล์บ่มร่วมกับน้ำคั้นส้มโอ พบว่า น้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ไม่มีฤทธิ์เพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ (รูปที่ 7B-7C)

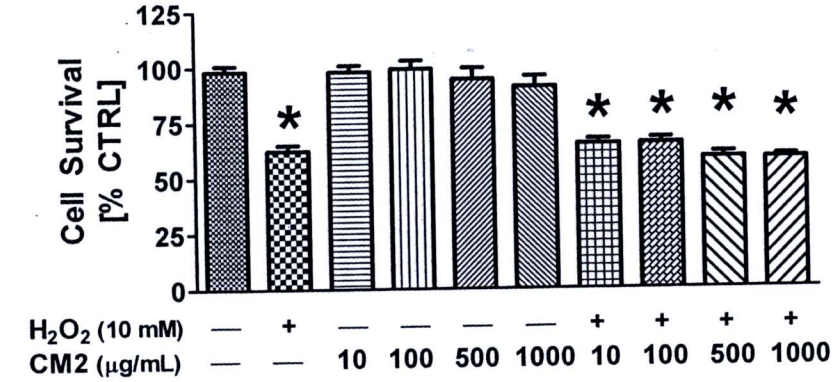
A)



B)



C)



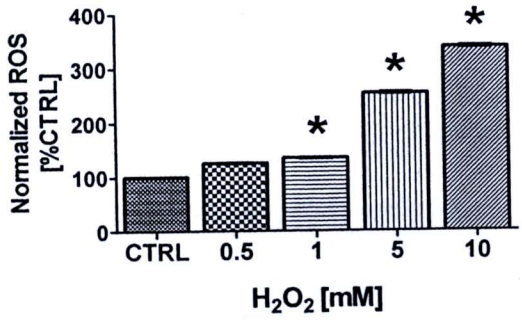
รูปที่ 7 ผลของน้ำคั้นส้มโอต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2. A) ทดสอบการอยู่รอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดด้วยวิธี MTT assay โดยบ่มเซลล์ร่วมกับ vehicle หรือ B) น้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และ C) พันธุ์ทับทิมสยามเป็นเวลา 24 ชม. แล้วเติม H_2O_2 เป็นเวลา 10 นาทีก่อนการวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (ดูในวิธีการศึกษา). * $p<0.05$ vs. control

3.7 *ฤทธิ์ปกป้องเซลล์จากภาวะ Oxidative stress*

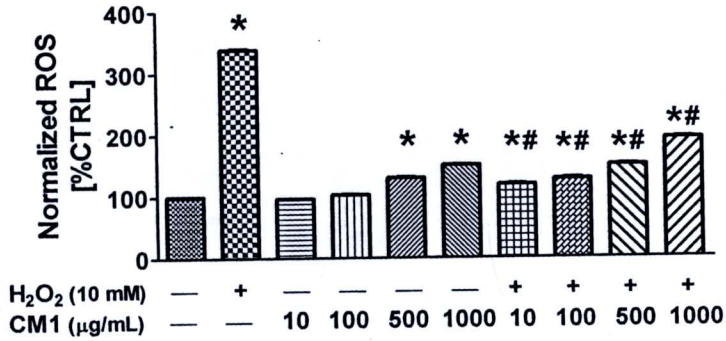
ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดยทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 5, 10 mM และแสดงผลในรูปของการ normalized ด้วยจำนวนเซลล์ที่เท่ากันคือ 30,000 เซลล์ โดยคำนวณออกมาในรูปของ %CTRL พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงระดับ oxidative stress ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นระดับ 1, 5, 10 mM ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้น ความเข้มข้นที่เลือกใช้จึงเป็นความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress อย่างชัดเจน คือ 10 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เพิ่มระดับ oxidative stress เป็น 3.4 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 8A

การทดสอบฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10, 100, 500, 1000 µg/mL) ต่อระดับ oxidative stress พบว่า น้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มระดับ oxidative stress อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 µg/mL ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 8B, 8C) เมื่อบ่มน้ำคั้นส้มโอร่วมกับ H_2O_2 พบว่าน้ำคั้นส้มโอสามารถลดปริมาณ ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการให้ H_2O_2 เดี่ยวๆ ($p<0.05$)

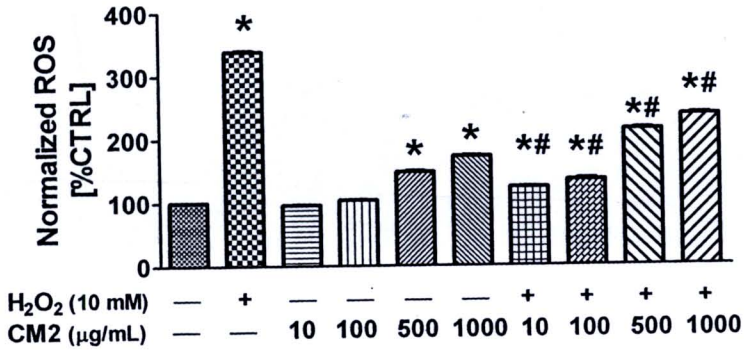
A)



B)



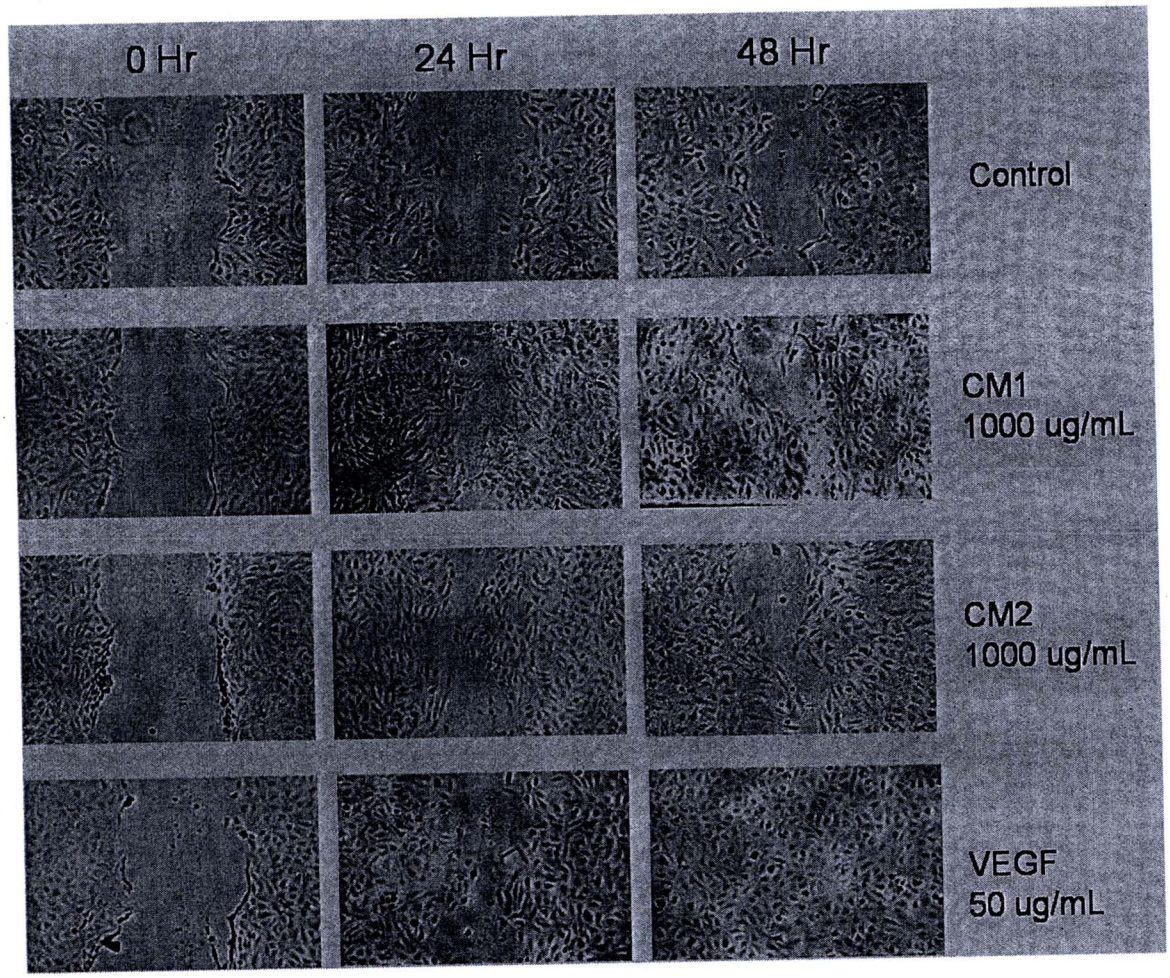
C)



รูปที่ 8 ฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด. การทดลองใช้ H_2O_2 10 mM เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress และคำนวณปริมาณ ROS ด้วยจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน (normalization). A) ผลของ H_2O_2; B) ผลของน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1); C) ผลของน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2). * $p<0.05$ vs. CTRL, # $p<0.05$ vs. H_2O_2 10 mM treatment.

3.8 *ฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลของน้ำคั้นส้มโอ (scratch wound closure assay)*

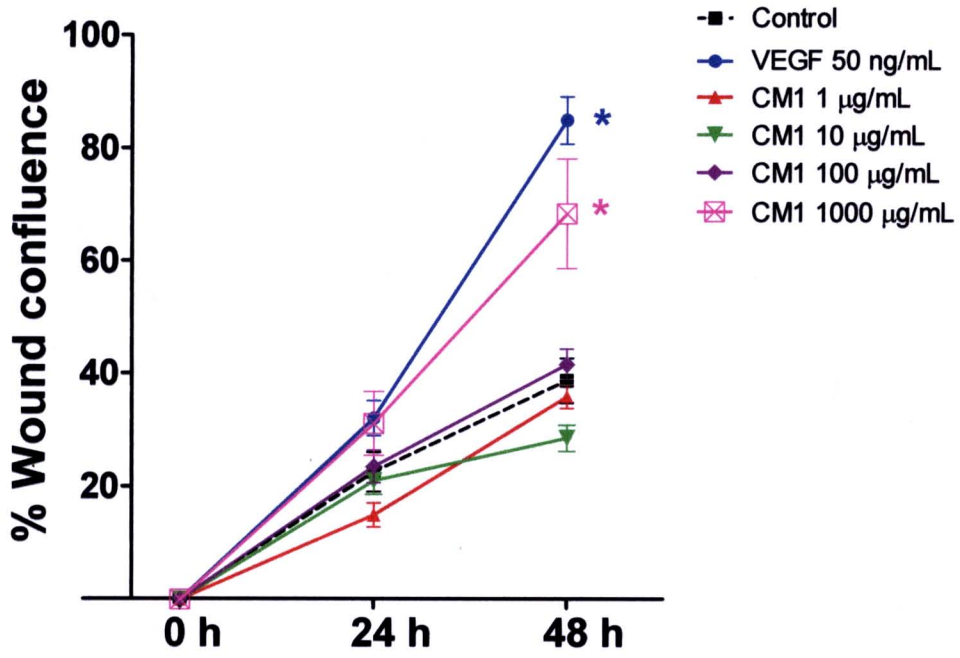
การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลของน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) พบว่า ที่เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง น้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) สามารถสมานแผลได้ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9, 10)



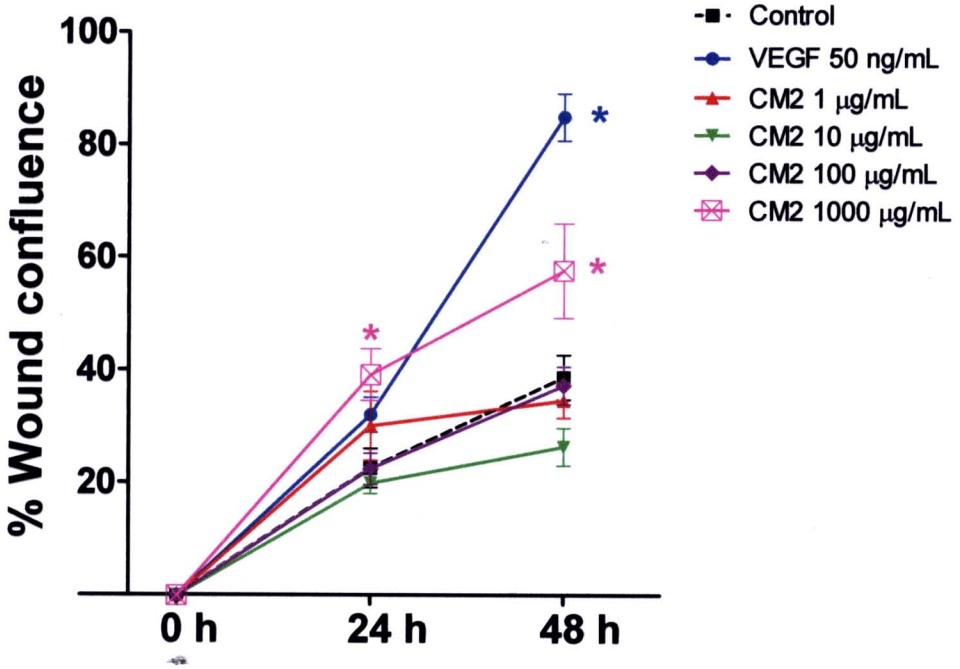
รูปที่ 9 ภาพของการสมานแผลของกลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้ Growth factors (VEGF 50 ng/mL), กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) 100 ug/mL และกลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) 100 ug/mL ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

A



B



รูปที่ 10 ผลของการสมานแผลของน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1, รูป A) และน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2, รูป B) ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง, * $p<0.05$ vs. control