



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ

การพัฒนาส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพ
(Development of Etlingera pavieana water extract as health
care products)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 103217

สัญญาเลขที่ 43/2558

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพ
(Development of *Etlingera pavieana* water extract as health
care products)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

โรคหัวใจและหลอดเลือด (CVDs) เป็นกลุ่มโรคที่เกิดความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือด กระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรค CVDs เกี่ยวข้องกับ endothelial dysfunction ที่เป็นผลให้มีชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์น้อยลง ในปัจจุบันพบว่าส่วนสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถป้องกันและรักษาโรค CVDs ได้โดยการกระตุ้นเอนไซม์เอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทส (eNOS) มีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า ส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมสามารถเพิ่มปริมาณไนตริกในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ดังนั้นเราจึงตั้งสมมติฐานว่าส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมอาจจะมีผลต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือ ตรวจสอบผลของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ที่เกิดจากเอนไซม์ eNOS และยังทำการตรวจสอบกลไกในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ด้วย ในการศึกษาทำการเตรียมส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าเร่วหอม (EPE) และส่วนสกัดน้ำที่ใช้อัตราส่วนของเร่วหอมและน้ำเท่ากับ 1:10, 1:20 และ 1:30 ตามลำดับ (EPW1 EPW2 และ EPW3) ทำการประเมินความเป็นพิษของส่วนสกัดและผลต่อการผลิตไนตริกออกไซด์โดยวิธี MTT และปฏิกิริยา Griess ตามลำดับ ส่วนสกัดน้ำทั้งหมดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ส่วนสกัด EPE ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 μ g/ml ลดจำนวนเซลล์มีชีวิตลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณไนตริกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด ส่วนสกัดน้ำของเร่วหอมไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS แต่ส่วนสกัดเอทานอล EPE สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ทั้งในระดับโปรตีน และ mRNA ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด ยิ่งกว่านั้นส่วนสกัด EPE เหนี่ยวนำการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ eNOS และ Akt ที่น่าสนใจคือส่วนสกัด EPE สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน vascular cell adhesion molecule-1 และ intercellular adhesion molecule-1 ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัด EPE อาจป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยปรับปรุงการทำงานของเซลล์เยื่อหลอดเลือด โดยการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ และโดยการยับยั้งการเกิดการอักเสบของหลอดเลือด ดังนั้นส่วนสกัดของเร่วหอมนี้อาจถูกนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อใช้รักษา และป้องกันโรค CVDs

คำสำคัญ: โรคหลอดเลือดและหัวใจ, ภาวะหลอดเลือดแข็ง, เร่วหอม, ไนตริกออกไซด์, เอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทส, การอักเสบของหลอดเลือด

Abstract

Cardiovascular diseases (CVDs) are group of disorders of the heart and blood vessels. A variety of pathological processes of CVDs are associated with endothelial dysfunction involving a reduced nitric oxide (NO) bioavailability. Currently, many plant extracts have been shown their prevention and treatment of CVDs via activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). The extract from *Etlingera pavieana* rhizomes was previously reported to increase nitrite levels in the RAW 264.7 macrophages, thus, we hypothesize that the extract of *E. pavieana* rhizomes is able to affect NO production of human endothelial cells. The aim of this study was to investigate the effect of extracts from *E. pavieana* rhizomes on production of eNOS-derived NO in human endothelial cells. The mechanism underlying their effects was also studied. In this study, we prepared extracts of *E. pavieana* rhizomes, including ethanol extract (EPE) and water extracts at a ratio of plant material and water at 1:10, 1:20 and 1:30, respectively (EPW1 EPW2 and EPW3, respectively). All extracts were determined their effect on cytotoxicity and NO production in EA.hy926 human endothelial cells by MTT and Griess reaction assay, respectively. All the water extracts of *E. pavieana* extracts did not show cytotoxicity on EA.hy926 cells but EPE at concentrations of 100 and 200 μ g/ml reduced significantly cell viability. The nitrite levels of media from endothelial cells treated with all extracts increased in a concentration-dependent manner. The water extract of *E. pavieana* did not up-regulate eNOS expression whereas EPE slightly but significantly increased the expression of eNOS mRNA and protein in endothelial cells. Moreover, EPE induced the phosphorylation of eNOS and Akt. Interestingly, EPE inhibited the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in TNF- α -induced endothelial cells. The obtained data indicated that EPE may protect atherosclerosis formation by improving endothelial dysfunction via stimulating NO production and eNOS expression in human endothelial cells as well as inhibiting vascular inflammation. Thus, the extracts from *E. pavieana* might be developed as food supplement for the treatment and prevention of CVDs.

Keywords: Cardiovascular diseases, atherosclerosis, *Etilingera pavieana*, endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, vascular inflammation

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ นางสาวสรินพร อุดมพงษ์ สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
สารบัญตาราง	7
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
บทนำ	9
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
วิธีการทดลอง	15
ผลการทดลองและอภิปราย	19
สรุปผลการทดลอง	34
บรรณานุกรม	36
ผลผลิตของโครงการวิจัย	39
ประวัตินักวิจัย	40

สารบัญญภาพ

		หน้า
รูปที่ 4-1	การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม	20
รูปที่ 4-2	การผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม	21
รูปที่ 4-3	ปริมาณไนไตรท์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม	22
รูปที่ 4-4	การผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม และ LPS	23
รูปที่ 4-5	การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม	24
รูปที่ 4-6	ปริมาณไนไตรท์ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม	25
รูปที่ 4-7	ปริมาณโปรตีน eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม	26
รูปที่ 4-8	ปริมาณโปรตีน eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE	27
รูปที่ 4-9	ปริมาณ mRNA ของ eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE	28
รูปที่ 4-10	ปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม	29
รูปที่ 4-11	ปริมาณโปรตีน pAkt ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE	30
รูปที่ 4-12	ปริมาณโปรตีน VCAM-1 ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE	33
รูปที่ 4-13	ปริมาณโปรตีน iCAM-1 ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE	33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดจากเร่วหอม	19

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

NO Nitric oxide

LPS Lipopolysaccharide

eNOS Endothelial nitric oxide synthase

MCC 4-methoxycinnamyl p-coumarate

VCAM-1 Vascular cell adhesion molecule-1

ICAM-1 Intercellular adhesion molecule-1

TNF- α Tumor necrosis factor- α

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันประชากรโลกมีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคเรื้อรังหรือโรคจากวิถีชีวิตมากขึ้น เช่น โรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง (อัมพฤกษ์ อัมพาต) โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ระบุว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยความดันโลหิตสูง มีมากถึง 970 ล้านคน และคาดว่าในปี พ.ศ. 2568 ผู้ป่วยจะเพิ่มขึ้นเป็น 1.56 พันล้านคน (World Health Organization, 2012) โดยครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดสมองและโรคหัวใจขาดเลือดเกิดจากความดันโลหิตสูง เนื่องจากความดันโลหิตสูงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) (World Health Organization, 2012; ภาณุวัฒน์ ปานเกตุ และคณะ, มปป) รายงานสถิติสาธารณสุขของไทยพบว่าเมื่อเปรียบเทียบในรอบ 10 ปี จากปี 2543 และปี 2552 พบว่าอัตราผู้ป่วยในสถานบริการสาธารณสุขของกระทรวงสาธารณสุขมีสูงขึ้น ดังนี้ โรคความดันโลหิตสูงจาก 259 เป็น 1230 ต่อประชากรแสนคน โรคหัวใจขาดเลือดจาก 98 เป็น 359 ต่อประชากรแสนคน และโรคหลอดเลือดสมอง จาก 105 เป็น 277 ต่อประชากรแสนคน (ศกวรรณ แก้วกลิน และนิตยา พันธุ์เวท, มปป) สาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการไม่ดูแลสุขภาพตัวเอง เช่น พักผ่อนไม่เพียงพอ เครียด ไม่ออกกำลังกาย และรับประทานผักผลไม้ไม่เพียงพอ (สถาบันวิจัยโรคเรื้อรัง, 2552; ศกวรรณ แก้วกลิน และนิตยา พันธุ์เวท, มปป) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเหล่านี้กำลังเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรได้รับการแก้ไข เนื่องจากเป็นโรคที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง และมีโอกาสเกิดความพิการตามมา ส่งผลกระทบทั้งต่อผู้ป่วย ครอบครัวและประเทศชาติ ทั้งในแง่การเสียรายได้ของตัวบุคคล องค์กร และใช้งบประมาณของประเทศในการดูแลรักษาพยาบาลผู้ป่วยซึ่งมาจากต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท แนวทางแก้ไขที่ดีที่สุดคือปรับเปลี่ยนพฤติกรรม และดูแลตนเองมากขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีโครงการให้การรักษาสุขภาพให้แข็งแรง เช่น การออกกำลังกาย การเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ รวมทั้งมีความนิยมในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดต่างๆ มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสุขภาพที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เห็นได้จากการมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่างๆ ออกมาจำหน่ายอย่างมากมาย และจากการสำรวจพบว่ามูลค่าของตลาดส่วนนี้มีมากกว่า 2,900 ล้านบาทต่อปีในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าประชาชนมีความใส่ใจในการดูแลตนเองให้มีสุขภาพที่ดี ในการนี้พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมที่สำคัญ ที่ทำให้ประชาชนมีทางเลือกในการรักษาแบบป้องกัน (chemopreventive therapy)

เซลล์เยื่อบุทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) เป็นเครื่องหมายของการเกิดโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด ภายในเซลล์เยื่อหลอดเลือดจะมีไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) เป็นสารสื่อกลางในการรักษาภาวะธำรงดุลย์ของหลอดเลือด โดยยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด ป้องกันการจับและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว และทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดเกิดการคลายตัว ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vanhouette et al., 2009) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เยื่อหลอดเลือดทำงานผิดปกติและเกิดพยาธิสภาพของโรคความดันโลหิตสูง และภาวะหลอดเลือดแข็ง คือการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์

(NO bioavailability) ไนตริกออกไซด์ที่ควบคุมการทำงานของเซลล์เยื่อหลอดเลือดถูกผลิตจากเอนไซม์ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ไนตริกออกไซด์นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ soluble guanylate cyclase ที่อยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทำให้มีการเพิ่ม cGMP ส่งผลให้เกิดขยายตัวของหลอดเลือด และยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (Koltermann et al., 2007) ซึ่งปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ และการสลายของไนตริกออกไซด์ ปัจจัยที่ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์น้อยลง คือ ความเครียดจากออกซิเดชัน ความชราภาพ การพักผ่อนไม่เพียงพอ และการสูบบุหรี่ เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009) ดังนั้นการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดในผู้สูงอายุ หรือในผู้ป่วยกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นวิธีการรักษาที่น่าสนใจอีกทางหนึ่ง แม้ว่าเอนไซม์ eNOS เป็นเอนไซม์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา แต่ปริมาณการแสดงออกของยีนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยสิ่งกระตุ้นทางชีวเคมี ชีวฟิสิกส์ และฮอร์โมน ทั้งในสภาวะสรีรวิทยา และพยาธิสภาพ (Li et al., 2002-) รวมทั้งอาหาร (Vanhoutte et al., 2009) ปัจจุบันมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากพืชต่างๆ และสารบริสุทธิ์จากพืชสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ได้ (Steinkamp-Fenske et al., 2007; Koltermann et al., 2007; Wattanapitayakul et al., 2007; Vanhoutte et al., 2009; Li et al., 2010) ดังนั้นการบริโภคส่วนสกัดพืชต่างๆ นี้จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันและรักษากลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมทั้งการกระตุ้นให้มีปริมาณ BH_4 ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เพื่อป้องกันการปฏิกริยา uncoupling ทำให้เกิด superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$)

เร่วหอม (*Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ที่เกษตรกรทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยทำการปลูกเป็นพืชแซมในสวนผลไม้ เหง้าเร่วหอมใช้เป็นเครื่องเทศใส่ในแกงและก๋วยเตี๋ยวในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้เหง้าเร่วหอมยังใช้ในการรักษาอาการท้องอืด ขับลม และขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พงษ์เสนา, 2550a) ในปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์ เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (วารสารเคหเกษตร, มปป.; รายการเกษตรกรรมน่ารู้, 2553) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ต่อมามีการแยกสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ผลจากการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นในเซลล์แมคโครฟาจ 264.7 (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2556) เมื่อทำการทดสอบยืนยันในเบื้องต้นโดยตัวยับยั้งเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) คือ aminoguanidine เพื่อยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์จากเอนไซม์ iNOS พบว่ามีการลดการผลิตไนตริกออกไซด์เพียงบางส่วน (กล่าวขวัญ ศรีสุข, ข้อมูลยังไม่เผยแพร่) จึงมีความเป็นไปได้ว่าส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์จากเอนไซม์ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์ และศึกษากลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในระดับโมเลกุลของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งทำการแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัดดังกล่าวเพื่อใช้เป็นสารที่

ควบคุมคุณภาพของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอม เพื่อเป็นข้อมูลในการนำส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและลดความดันโลหิต เป็นการประหยัดงบประมาณและนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหง้าเร่วหอมอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นและกลไกระดับโมเลกุลในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอม

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมที่สกัดในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน มาทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ ทดสอบฤทธิ์ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ และนำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดมาศึกษากลไกที่ส่วนสกัดนำจากเหง้าเร่วหอม มีต่อการกระตุ้นการผลิตไนตริก ออกไซด์ โดยศึกษาผลของส่วนสกัดต่อปริมาณโปรตีนและ mRNA ของเอนไซม์ eNOS นอกจากนี้จะทำการ ศึกษาผลของส่วนสกัดต่อการการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ศึกษาวิถีสัญญาณที่ส่วนสกัดนำจากเหง้าเร่วหอมใช้ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ ได้แก่ วิถี Akt

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์จาก L-arginine เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS, EC 1.14.13.39) มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม เกิด five-electron oxidation ขึ้นที่อะตอมของไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มกวานิดิน (guanidine) ของ L-arginine ได้เป็นไนตริกออกไซด์รวมทั้งได้ L-citrulline เป็นผลผลิตร่วม โดยในปฏิกิริยานี้จะอาศัย nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH4) เป็นโคแฟกเตอร์ร่วม (Alderton et al., 2001) โมเลกุลของ NOS ที่แยกทีมีลักษณะเป็น dimer โครงสร้างของ NOS แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย reductase domain และ oxygenase domain โดย oxygenase domain ประกอบด้วยบริเวณจับของ กลุ่ม heme, L-arginine และ BH4 ส่วน reductase domain ประกอบด้วยบริเวณจับของ NADPH, FAD, FMN และ calmodulin ในขณะที่ปฏิกิริยาจะมีการไหลของอิเล็กตรอนจาก NADPH ผ่านไปสู่ FAD และ FMN ใน reductase domain และไปที่กลุ่ม heme ใน oxygenase domain ซึ่งอิเล็กตรอนนี้จะใช้ในการรีดิวซ์อะตอมออกซิเจน และเกิดการออกซิไดซ์ L-arginine เป็น L-citrulline และไนตริกออกไซด์ (Forstermann and Sessa, 2012) เอนไซม์ NOS มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity)

ไอโซฟอร์ม eNOS ส่วนมากมีการแสดงออกที่เซลล์เยื่อ การทำงานของเอนไซม์ eNOS จะถูกกระตุ้นเมื่อระดับ Ca^{2+} ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น Ca^{2+} ที่สูงขึ้นจะจับกับ calmodulin และเหนี่ยวนำให้ calmodulin จับกับเอนไซม์ eNOS ได้แน่นขึ้นทำให้เพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ (Alderton et al., 2001) นอกเหนือจากการกระตุ้นด้วยการเพิ่มระดับของ Ca^{2+} แอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS ยังถูกกระตุ้นด้วยการถูกฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) เอนไซม์ eNOS ถูกฟอสโฟรีเลชันที่กรดอะมิโนเซอรีน (Ser), ทรีโอนีน (Thr) และไทโรซีน (Tyr) ที่อยู่ในโครงสร้าง เช่น การฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 จะกระตุ้นการไหลของอิเล็กตรอนในบริเวณ reductase domain เพิ่มความไวต่อ Ca^{2+} (Fleming and Busse, 2003) สารต่างๆ ที่สามารถกระตุ้นการแอกติวิตีของเอนไซม์ของ eNOS โดยผ่านการกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ได้แก่ oestrogen และ VEGF กระตุ้นเอนไซม์ Akt ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ฮอริโมน insulin กระตุ้นเอนไซม์ Akt และ AMP-activated protein kinase (AMPK) ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 สาร bradykinin กระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ผ่านการกระตุ้นเอนไซม์

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) และ shear stress กระตุ้นเอนไซม์ PKA ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการรายงานว่าเอนไซม์ kinase ต่างๆ ควบคุมเอนไซม์ eNOS ผ่านการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 แต่เอนไซม์ Akt เป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่มี รายงานว่าควบคุมเอนไซม์ eNOS ได้ในสิ่งมีชีวิต (Forstermann and Sessa, 2012) นอกเหนือจากการ ควบคุมโดยการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 เอนไซม์ eNOS ยังถูกควบคุมโดยการฟอสโฟรีเลชันที่ Thr495, Ser114, Ser633, Tyr81 และ Tyr657 แต่กลไกที่ชัดเจนยังอยู่ในระหว่างการศึกษา

ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS มีผลทางสรีรวิทยาต่างๆ โดยเฉพาะการควบคุมหลอดเลือด เช่น ทำให้หลอดเลือดขยายตัวโดยการไปจับกับกลุ่มฮีมของเอนไซม์ soluble guanylyl cyclase (sGC) ที่อยู่บริเวณกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดทำให้มีการเพิ่มการผลิต cGMP ส่งผลให้มีการขยายตัวของ หลอดเลือด (Ignarro et al., 1986) และยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือดและการยึดของเกร็ดเลือดจับ กับผนังหลอดเลือด ทำให้การไหลเวียนของเลือดเกิดได้ดี ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS ยังลดการ แสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะการแข็งตัวของหลอดเลือด (atherosclerosis) เช่น โปรตีน MCP-1 ลดการจับของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ยังไปยับยั้งการหลั่งของ platelet-derived growth factor (PDGF) จึงทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบลดลง (Forstermann and Sessa, 2012) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS แสดงฤทธิ์ต้านการเกิดการ แข็งตัวของหลอดเลือด เมื่อเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) จะทำให้ชีว ปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ลดลง สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไน ตริกออกไซด์ลดลงคือการเกิดความเครียดจากออกซิเดชัน เนื่องจากในขณะที่เกิดความเครียดจากออกซิเดชัน ทำให้มีการผลิต reactive oxygen species ในปริมาณที่สูงขึ้น โดยเฉพาะการผลิต superoxide (O₂⁻) โดย เอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้มีการรวมกันของไนตริกออกไซด์ และ O₂⁻ เป็น peroxynitrite (ONOO⁻) มากขึ้นจึงมีปริมาณไนตริกออกไซด์ลดลง นอกจากนี้ ONOO⁻ ที่เพิ่มมากขึ้นยังไปออกซิไดซ์ BH₄ ที่เป็น โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ eNOS ทำให้ลด affinity ระหว่างเอนไซม์ eNOS กับ L-arginine จึงทำให้ eNOS เร่งปฏิกิริยา uncoupling แทน ทำให้เกิด O₂⁻ แทนการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Zou et al., 2002) ดังนั้นจึงทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดลดลงเป็นผลให้การควบคุม การทำงานของหลอดเลือดผิดปกติ นำไปสู่ภาวะการแข็งตัวของหลอดเลือด และโรคหลอดเลือดและหัวใจใน ที่สุด โดยเฉพาะในผู้ที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดและหัวใจ เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ที่มีภาวะ โคเลสเตอรอลในเลือดสูง ผู้ที่มีความดันโลหิตสูง ผู้สูบบุหรี่ และผู้ที่มีความเครียด เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009; Forstermann and Sessa, 2012)

มีการศึกษาพบว่าการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำได้ หลายวิธี เช่น การเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS โดยการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS การเพิ่ม ปริมาณซับสเตรต L-arginine และการเพิ่มโคแฟกเตอร์ BH₄ และการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์โดย NO donor เป็นต้น (Zhang et al., 2010) การเพิ่มปริมาณ BH₄ โดยการเสริม BH₄ เป็นวิธีการป้องกันและ รักษาโรคหลอดเลือดและหัวใจทางหนึ่ง แต่ปัญหาของการให้ BH₄ เสริมคือความไม่เสถียรของ BH₄ (Zhang et al., 2010) จึงมีความพยายามหาสารที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ BH₄ ในเซลล์ เช่น fluvastatin สามารถเพิ่ม การแสดงออกของเอนไซม์ guanosine triphosphate cyclohydrolase-1 (GTPCH-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่

ควบคุมการผลิต BH4 ทำให้มีปริมาณ BH4 มากขึ้น (Aoki et al., 2010) ในปัจจุบันมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากพืชต่างๆ และสารบริสุทธิ์จากพืชสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ได้ (Steinkamp-Fenske et al., 2007; Koltermann et al., 2007; Wattanapitayakul et al., 2007; Vanhoutte et al., 2009; Li et al., 2010)

เร่วหอม [*Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.] เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกะหล่ำและปุด พบมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น ระยอง จันทบุรี และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับ ดอกช่อแทงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมแรง เหง้าหรือลำต้นใต้ดินใช้ขับปัสสาวะ แก้ลมและแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในอาหาร เช่น ก๋วยเตี๋ยวหมูเลียก ก๋วยเตี๋ยวเนื้อเลียก แกงป่า และผัดเผ็ด การปลูกเร่วหอมแต่ดั้งเดิมเป็นการปลูกเป็นพืชสวนครัว และปลูกแซมในสวนผลไม้เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย ในปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (วารสารเคหเกษตร, มปป.; รายการเกษตรกรนารู้, 2553) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมยังยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E2 (PGE2) ในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ต่อมา มีการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ 4-methoxycinnamyl 4-coumarate, p-anisic acid, p-hydroxy benzaldehyde, 4-methoxycinnamyl alcohol, p-coumaric acid, trans-4-methoxycinnamaldehyde, สาร (E)-methyl isoeugenol, trans-anethole และ , p-anisaldehyde และพบว่าสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate ซึ่งเป็นการพบเป็นครั้งแรกในเหง้าเร่วหอม มีฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และสารนี้ยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2556)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม

นำสมุนไพรร่่วหอมประมาณ 40 กิโลกรัมจาก จังหวัดจันทบุรี มาล้างด้วยน้ำประปา แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อน จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรร่่วหอมที่บดละเอียด สกัดในน้ำเดือด ในอัตราส่วน 1:10 1:20 1:30 ก่อนกรองส่วนสกัดน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยเครื่องดูดลดความดัน ที่อุณหภูมิห้อง ต้มผงเหง้าเร่วหอมอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนสกัดน้ำของเหง้าเร่วหอม มาทำการระเหยน้ำด้วยเครื่อง lyophilizer จัดบันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบต่อไป นอกจากนี้ยังได้เตรียมส่วนสกัดเอทานอล โดยนำสมุนไพรร่่วหอมที่บดละเอียด มาสกัดด้วย 95% เอทานอลเป็นเวลา 7 วัน และทำการกรอง จากนั้นนำผงพืชกลับมาแช่ในเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำสารละลายที่ได้มารวมกันและทำให้แห้งโดยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ จัดบันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบต่อไป ตารางที่ 4-1 แสดงน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT

เซลล์เยื่อหลอดเลือดของมนุษย์ (human umbilical vein endothelial cells) cell line EA.hy 926 ซึ่งมาจาก ATCC นำมาเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

จากนั้นทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของส่วนสกัดต่างๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อนำช่วงความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มาทดสอบในการทดลองต่อไป วิธีการโดยย่อ ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook และ Cha, 2004) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100 ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

3.3 การทดสอบส่วนสกัดต่อการผลิตไนตริกออกไซด์

ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ NOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ NOS ปริมาณไนไตรท์

ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัด และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100 μ l ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% N-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 μ l จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook และ Cha, 2005) ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง ในการศึกษานี้ใช้ resveratrol เป็นสารควบคุมแบบบวกในการกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

3.4 การทดสอบส่วนสกัดต่อปริมาณ mRNA และโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีน eNOS ด้วยเทคนิค real time-reverse-transcription polymerase chain reaction (real time-RT-PCR) โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัด และเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพ 37 องศาเซลเซียส ที่เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และสกัด RNA ทั้งหมด ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A260 เท่ากับ 40 μ g/mL ของ RNA สังเคราะห์ cDNA จาก RNA ทั้งหมดที่ได้การทำปฏิกิริยากับ 5x RT supermix ซึ่งประกอบด้วย (iScript MMLV-RT (RNaseH+), RNase inhibitor, dNTPs, oligo (dT), random primer, buffer, MgCl₂) ปริมาตร 4 μ l และเติมน้ำที่ปราศจาก Nuclease ปรับปริมาตรให้เป็น 20 μ l สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 25 °C นาน 5 นาที, 42 °C นาน 30 นาทีและ 82 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน eNOS, และ elongation factor (EF-2) ปฏิบัติสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย (2X) iTaq™ Universal SYBR® Green supermix [antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green I dye, enhancers, stabilizers และ blend of passive reference dyes] จำนวน 10 μ l, 10 μ M Forward primer จำนวน 0.5 μ l, 10 μ M Reverse primer จำนวน 0.5 μ l, cDNA ที่สังเคราะห์ จำนวน 2 μ l และปรับปริมาตรให้เป็น 20 μ l ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase ในสภาวะที่เหมาะสม ในปฏิกิริยา Real-time PCR ของยีน eNOS และ EF-2 และวิเคราะห์หา cycle of threshold (Ct) ของแต่ละปฏิกิริยา จากนั้นนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณหาโดยเปรียบเทียบเชิงสัมพัทธ์กับตัวอย่างควบคุม ตามสมการด้านล่าง

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{ตัวอย่างทดสอบ}) - \Delta Ct (\text{ตัวอย่างควบคุม})$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ of target gene} - Ct \text{ of housekeeping gene}$$

ในการศึกษานี้ใช้ EF-2 เป็น housekeeping gene ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง

การทดสอบปริมาณโปรตีน pSer1177-eNOS, total eNOS และ α -tubulin โดยวิธี Western blot analysis โดยให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัดในช่วงที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และเลี้ยง

เซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4] ที่เย็น 2 ครั้งก่อนเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% (v/v) SDS, 1% (v/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40] ปริมาตร 50 μL ที่เติมสารละลาย 1X protease inhibitors จากนั้นใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดพลาสติกหลอดใหม่ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ต่อไป

ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ ก่อนหยอดลงช่องของเจลที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนจะย้ายแผ่นเจลที่ได้ไปบนเมมเบรน Polyvinylidenedifluoride (PVDF) ที่ผ่านการแช่ใน absolute methanol เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol] เป็นเวลา 5 นาทีแล้ว นำเมมเบรน PVDF ที่ประกบกับเจลไปใส่ในแทงค์ที่มีบัฟเฟอร์ transfer buffer ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 25 V เป็นเวลานานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 °C นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการส่งผ่านโปรตีนแล้วมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl และ 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5% (w/v) non-fat dried milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที ก่อนนำแผ่นเมมเบรนมาแช่ในสารละลาย anti-mouse IgG (H+L) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนบ่มในสารละลายซับสเตรตสำหรับ enhanced chemiluminescence (ELC) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์ผลแถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม BIO-1D เวอร์ชัน 12.10a แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีนเป้าหมาย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ในการศึกษาที่ใช้ resveratrol เป็นสารควบคุมแบบบวกในการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ของเซลล์เยื่อหลอดเลือด

3.5 การทดสอบส่วนสกัดต่อการกระตุ้นวิถี Akt

วิถี PI(3)K/Akt เป็นวิถีที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS จึงทำการศึกษามูลของสารทดสอบต่อการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ Akt โดยใช้เทคนิค Wester blotting analysis เหมือนวิธีในข้อ 3.4 โดยใช้ anti pSer473-Akt, anti total Akt และ anti α -tubulin ในการศึกษาจะใช้ inhibitor ของวิถี PI(3)K/Akt เช่น wortmannin เป็น positive control ร่วมด้วย

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบแบบ two-tailed student's t-test และ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 น้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้จากเร่งหอม

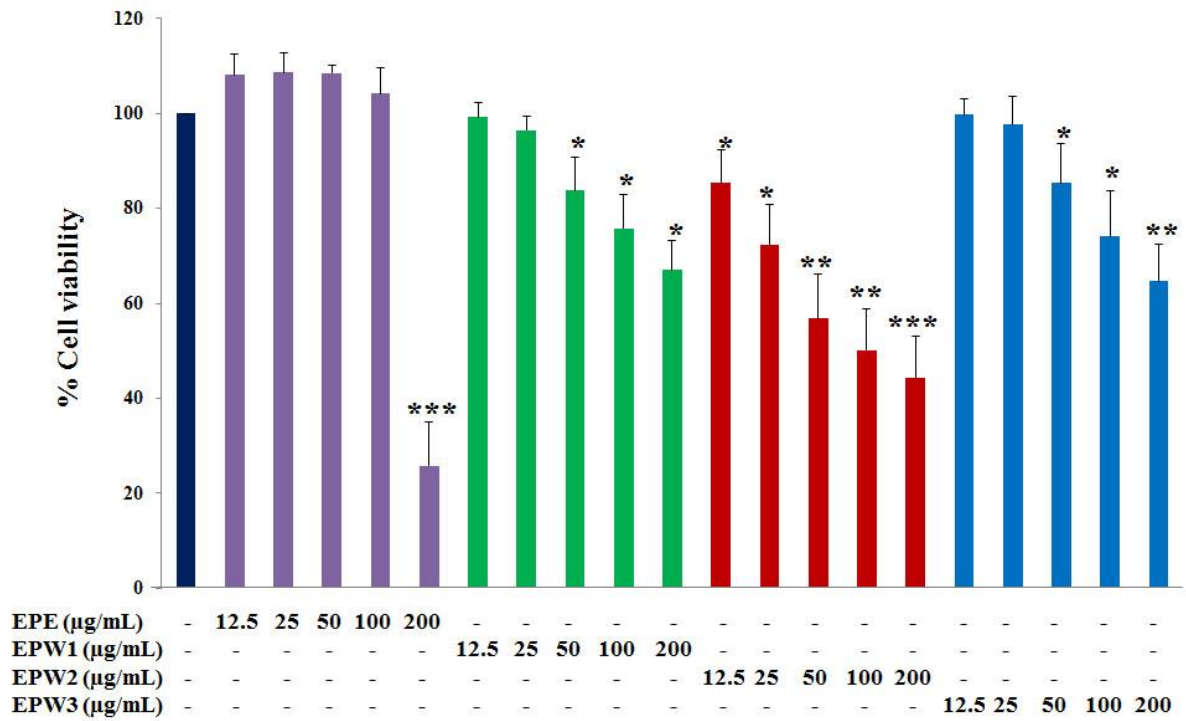
ตารางที่ 4-1 แสดงน้ำหนักของส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่งหอม พบว่าส่วนสกัดเอทานอลมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งน้อยที่สุด และส่วนสกัดน้ำที่อัตราส่วนของพืชต่อปริมาตรน้ำเท่ากับ 1:30 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมากที่สุด

ตารางที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดจากเร่งหอม

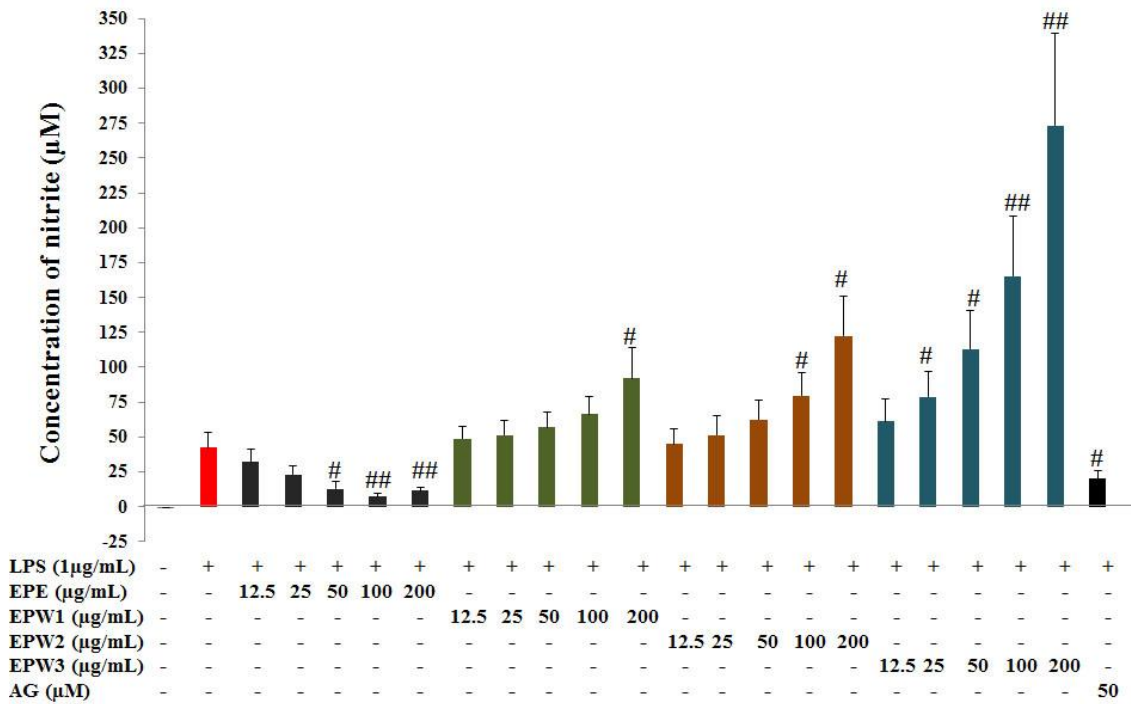
ส่วนสกัด	อัตราส่วน	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
ส่วนสกัดเอทานอล	1:10 (EPW1)	4.5	4.5
ส่วนสกัดน้ำ	1:10 (EPW1)	16.63	16.63
	1:20 (EPW2)	19.15	19.15
	1:30 (EPW3)	20.31	20.31

4.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ของส่วนสกัดจากเร่งหอม

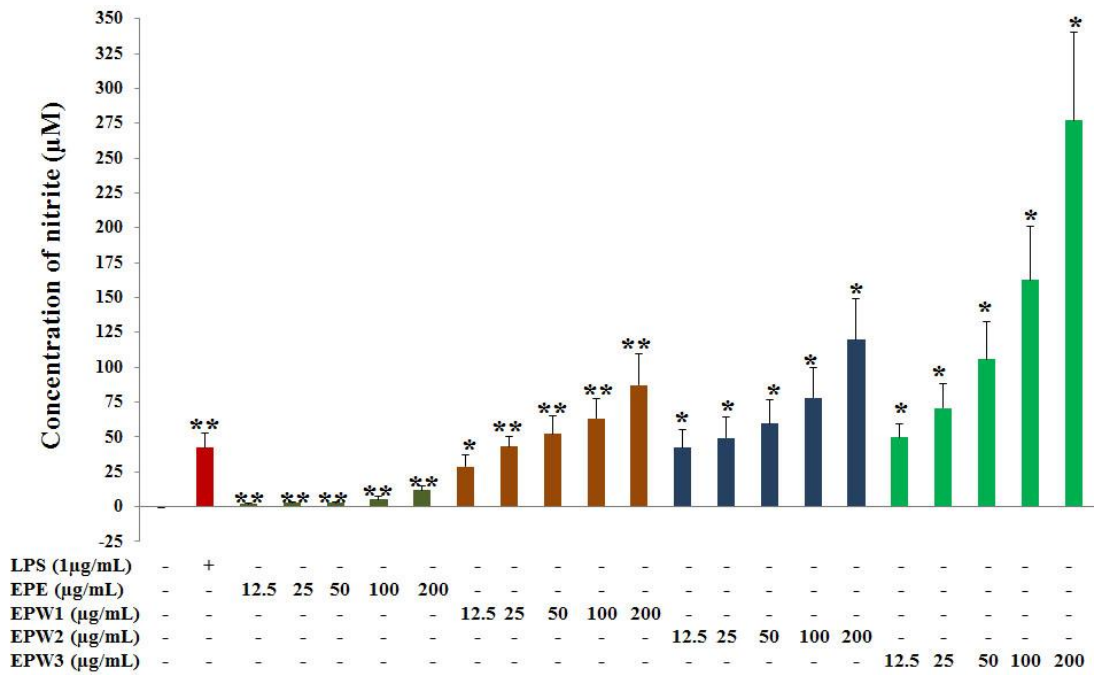
ก่อนนำส่วนสกัดต่างไปทำการทดลอง ได้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันผลของส่วนสกัดว่าเหมือนกับผลที่ได้จากการทดสอบโดยกล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข (2556) ที่รายงานว่าส่วนสกัดเอทานอลของเร่งหอมมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และส่วนสกัดน้ำสามารถเพิ่มปริมาณไนโตรทีโนอาหารเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 โดยทำการบ่มเซลล์แมคโครฟาจ ด้วยสารส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 12.5-200 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าส่วนสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 200 $\mu\text{g/ml}$ เป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำทุกส่วนสกัดที่ 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4-1 ส่วนสกัดเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ซึ่งวิเคราะห์ผลโดยตรวจสอบปริมาณไนโตรทีโนอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 4-2) ผลที่ได้เหมือนกับที่รายงานโดยเอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข (2554) ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำของเร่งหอมไม่ทำให้การผลิตไนตริกออกไซด์ลดลง แต่ยังทำปริมาณไนโตรทีโนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของส่วนสกัดที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4-2) เหมือนกับที่รายงานโดยกล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข (2556) แม้ในสภาวะที่เซลล์ได้รับส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวก็ยังคงพบปริมาณไนโตรทีโนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของส่วนสกัดที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4-3)



รูปที่ 4-1 การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *** p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบแต่สัมผัสกับ 0.4 % (v/v) DMSO

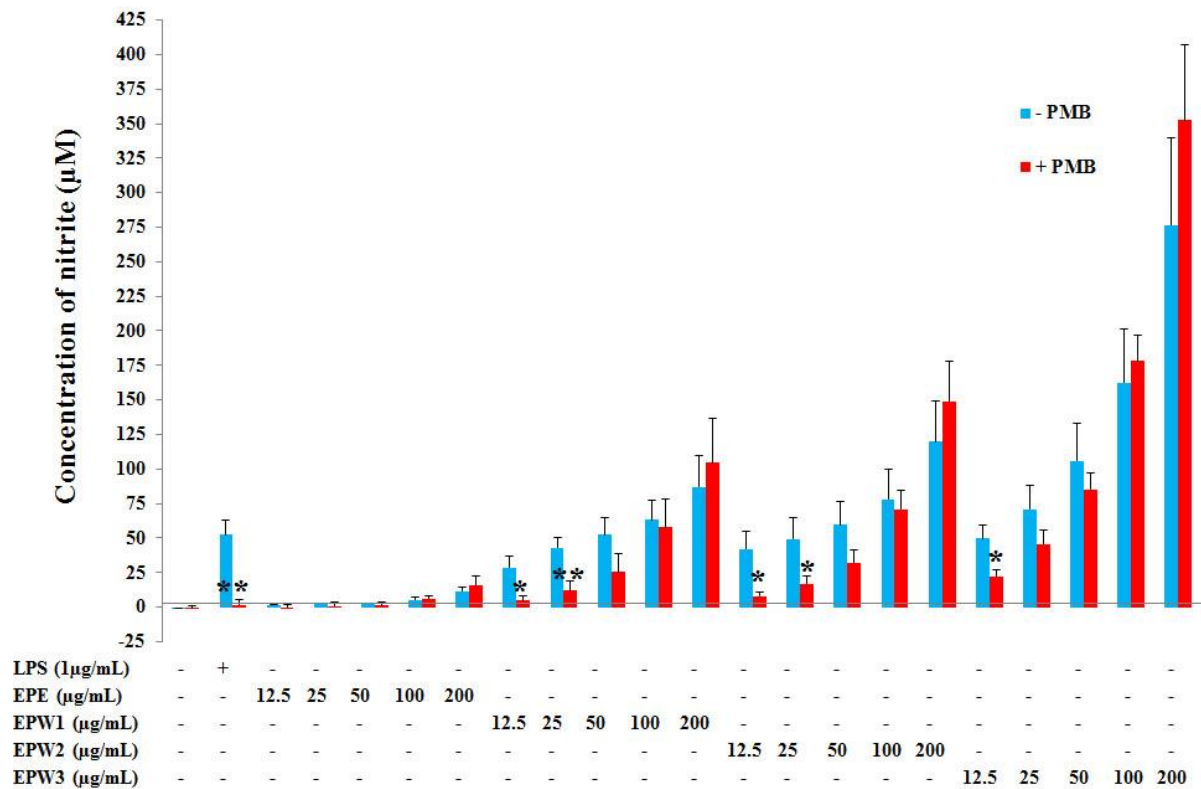


รูปที่ 4-2 การผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ #, ## $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4-3 ปริมาณไนไตรท์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง อย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *, ** $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ

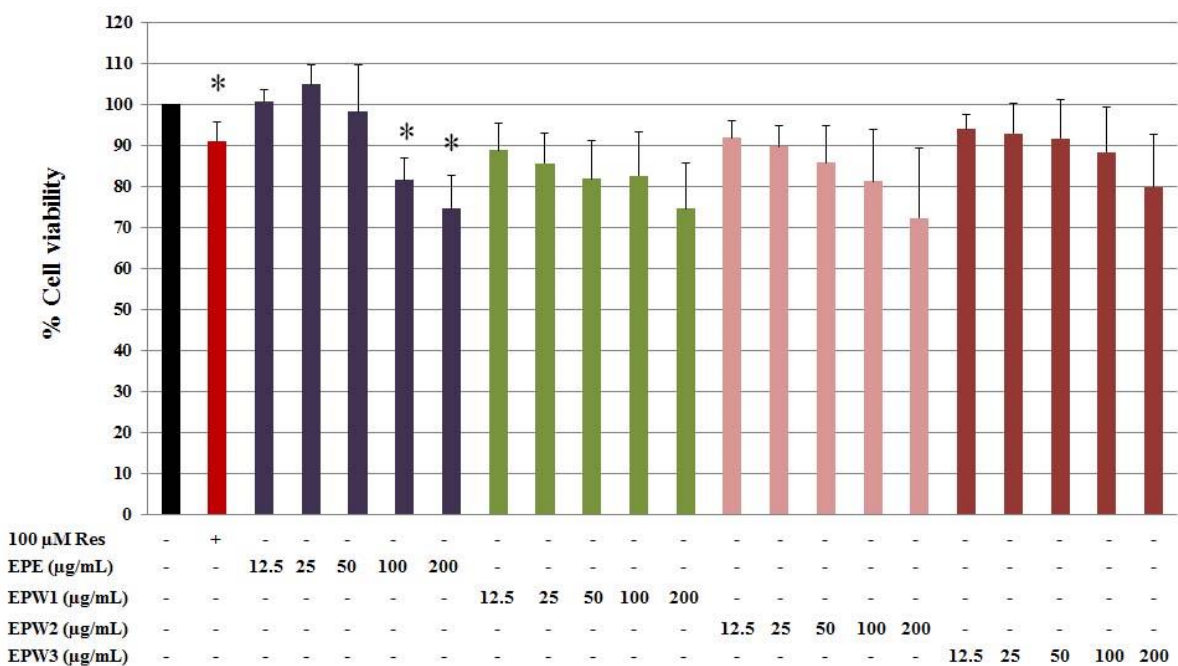
นอกจากนี้ยังทำการทดลองเพื่อทดสอบว่าการเพิ่มของปริมาณไนตริกออกไซด์ หรือไนโตรที่นั้นเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของ endotoxin ในส่วนสกัดพืชหรือไม่ ในการทดลองทำการกระตุ้นการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ด้วย lipopolysaccharide (LPS) ที่เป็น endotoxin ชนิดหนึ่ง ในการทดสอบนี้จึงทำการเติมสาร polymyxin B (PMB) ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่สามารถจับกับส่วน lipid A ที่เป็นองค์ประกอบของ lipopolysaccharide (endotoxin ชนิดหนึ่ง) ที่มีผลทำให้เกิดการ inactivation ของ LPS (Cardoso et al., 2007) ลดการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ ผลการทดลองในรูปแบบที่ 3-4 พบว่าเมื่อมีการเติม polymyxin B ลงในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS ทำให้ปริมาณไนโตรที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส LPS เพียงอย่างเดียว ส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 ที่ความเข้มข้นต่ำระดับ 12.5-25 $\mu\text{g/ml}$ มีปริมาณไนโตรที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเพียงอย่างเดียว แต่ส่วนสกัดที่ความเข้มข้นสูงมีปริมาณไนโตรที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเพียงอย่างเดียว ในขณะที่ส่วนสกัดเอทานอล EPE ทุกความเข้มข้นมีปริมาณไนโตรที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสส่วนสกัดเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4-4 การผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม และ LPS รวมทั้ง polymyxin B เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ *, ** $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

4.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926 ของส่วนสกัดจากเร่วหอม

หลังจากทดสอบเบื้องต้นกับเซลล์แมคโครฟาจ จึงทำการบ่มเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ด้วยส่วนสกัดต่างๆ จากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้น 12.5-200 µg/ml พบว่าส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 ทุกความเข้มข้นไม่มีพิษต่อเซลล์ แต่ส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/ml เป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (รูปที่ 4-5) แต่อย่างไรก็ตาม จะพบว่าการรอดชีวิตของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/ml มีปริมาณถึง 81 และ 75 % ตามลำดับ



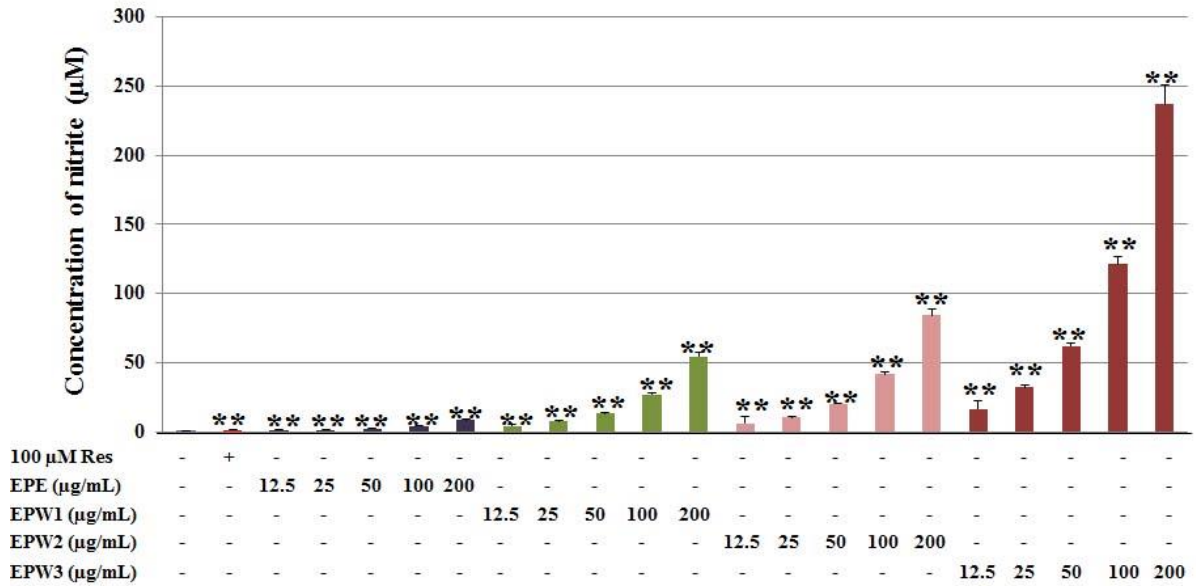
รูปที่ 4-5 การวิเคราะห์การมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งๆ ที่อิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ

4.4 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926

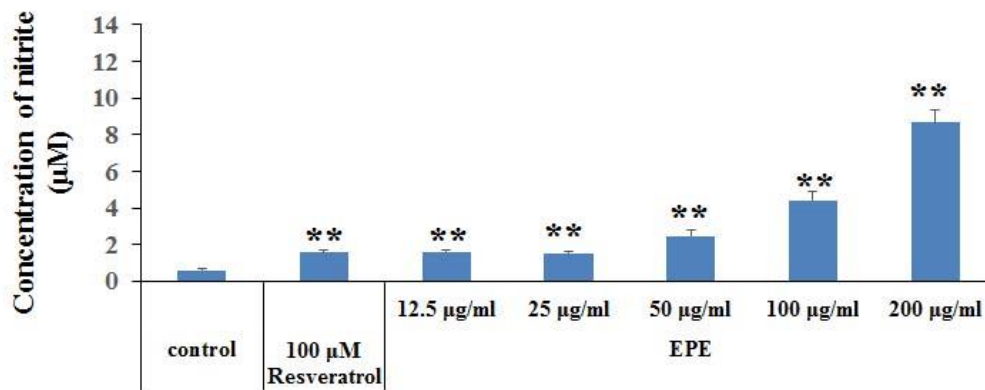
ทำการบ่มเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 กับส่วนสกัดต่างๆ จากเหง้าเร่วหอมที่ความเข้มข้น 12.5-200 µg/ml และวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่บ่งบอกปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เซลล์ผลิตขึ้นมา พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมีปริมาณไนโตรที่เพิ่มขึ้นในลักษณะที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของส่วนสกัดที่ใช้เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4-6 ในการทดลองนี้ใช้ resveratrol เป็นสารควบคุมแบบบวกในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า resveratrol สามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ (Wallerath et al., 2002; Appeldoorn et al., 2009)

(A)



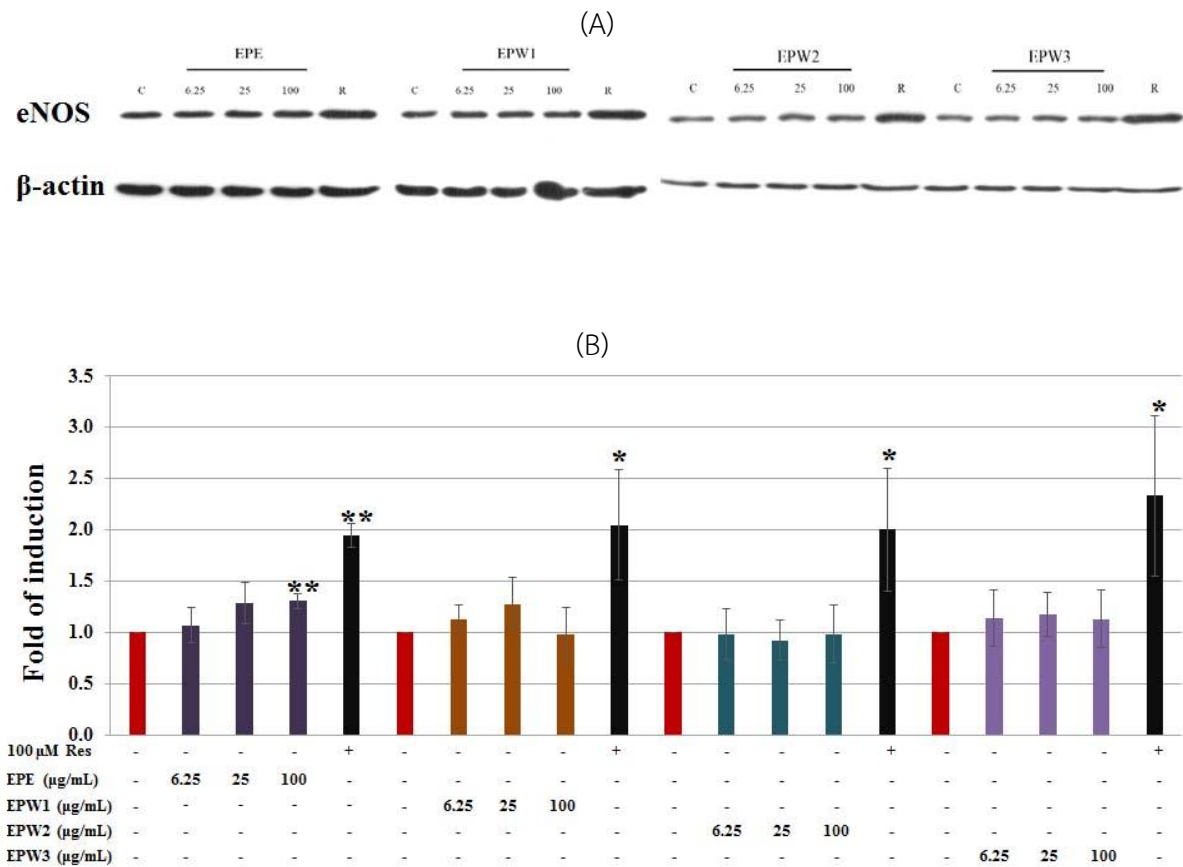
(B)



รูปที่ 4-6 ปริมาณไนตริกในเยื่อหลอดเลือดแดงมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และปริมาณไนตริกที่พบในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล EPE (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ** $p < 0.01$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ

4.5 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926

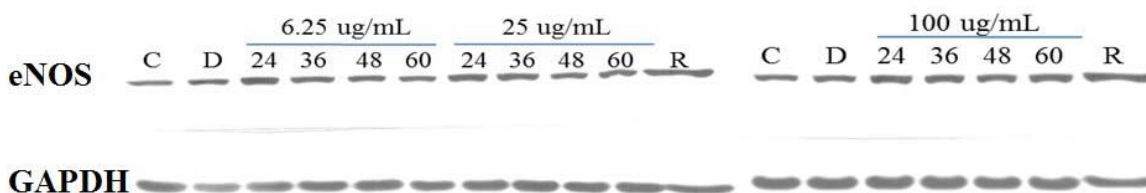
เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับ resveratrol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะทำให้มีปริมาณโปรตีน eNOS เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสารใด ส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณโปรตีน eNOS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถเหนี่ยวนำโปรตีน eNOS ได้ (รูปที่ 4-7) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า resveratrol สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน eNOS ได้ (Wallerath et al., 2002)



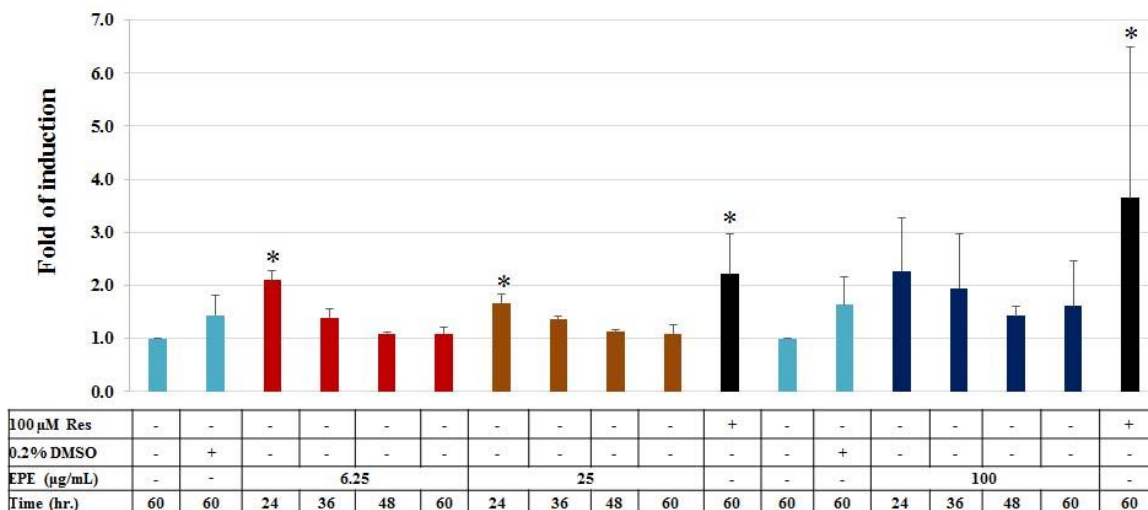
รูปที่ 4-7 ปริมาณโปรตีน eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดเดิมมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใด ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง *, ** $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ

เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 6.25 และ 25 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณโปรตีน eNOS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ในขณะที่เซลล์ที่บ่มกับส่วนสกัด EPE ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณโปรตีน eNOS เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การบ่มเซลล์กับส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ทุกความเข้มข้น นานกว่า 24 ชั่วโมง (36, 48 และ 60 ชั่วโมง) ไม่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีน eNOS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4-8)

(A)



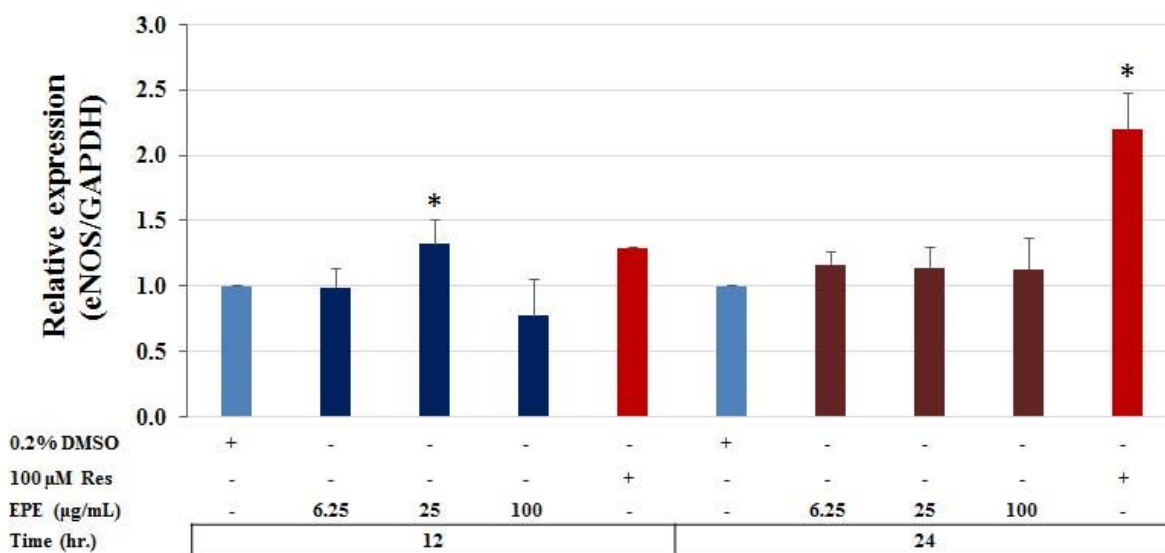
(B)



รูปที่ 4-8 ปริมาณโปรตีน eNOS ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 6.25-100 µg/ml เป็นเวลาต่างๆ กัน (A) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบใด ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง *p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ

4.6 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อการแสดงออกของ mRNA ของ eNOS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด EA.hy 926

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่า ส่วนสกัดเอทานอล EPE สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณโปรตีน eNOS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดได้ เราจึงทำการศึกษาต่อว่า จะทำให้ปริมาณ mRNA ของ eNOS เพิ่มขึ้นหรือไม่ จึงให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล EPE เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณ mRNA ของ eNOS ในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นชัดเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO (รูปที่ 4-9)



รูปที่ 4-9 ปริมาณ mRNA ของ eNOS ในเยื่อหลอดเลือดมนุษย์เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง * $p < 0.05$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO

4.7 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน eNOS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด EA.hy 926

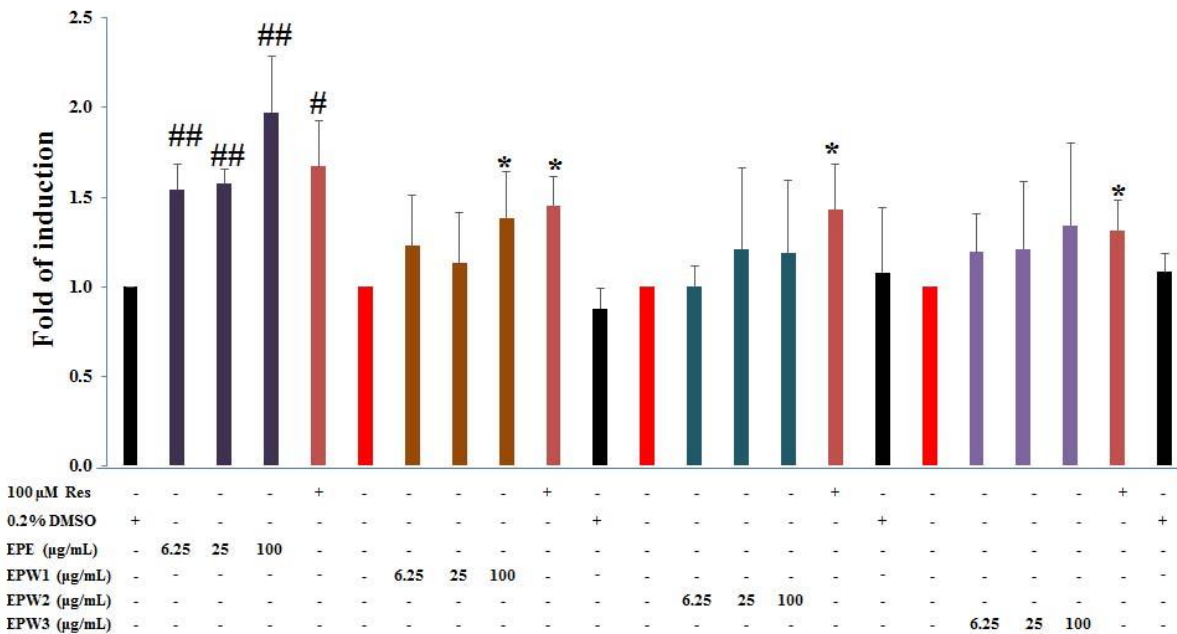
การกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS อีกวิธีหนึ่งนอกเหนือจากการเพิ่มระดับ Ca^{2+} คือการถูกฟอสโฟรีเลชันที่เอนไซม์ eNOS เช่น การฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177, Thr495, Ser114, Ser633, Tyr81 และ Tyr657 แต่บริเวณการฟอสโฟรีเลชันที่ถูกศึกษากลไกอย่างชัดเจน คือ ที่ Ser1177 (Fleming และ Busse, 2003) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการวิเคราะห์ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน eNOS (pSer1177-eNOS) ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด พบว่าส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ทุกความเข้มข้นสามารถเพิ่ม p-eNOS ที่ Ser1177 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (รูปที่ 4-10) ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำพบว่ามีแค่ EPW1 ที่ความเข้มข้นสูงสุดคือที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นการฟอสโฟรีเล

ชั้นที่ Ser1177 ได้ ส่วน resveratrol สามารถกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันของ eNOS ได้ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด เหมือนกับที่รายงาน Xia et al. (2014)

(A)



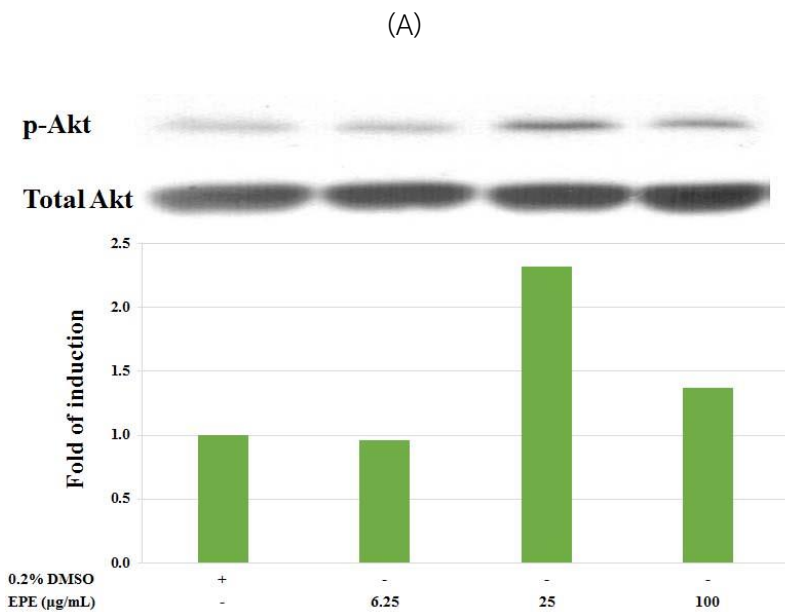
(B)



รูปที่ 4-10 ปริมาณโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ในเยื่อหลอดเลือดเดิมมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดจากเร่วหอม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที (A) เป็นภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน p-Ser 1177 eNOS ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง *p<0.05 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO

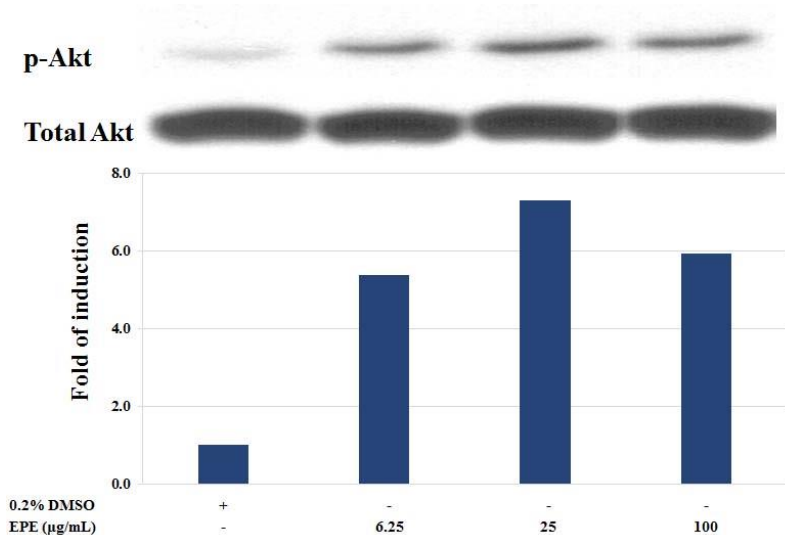
4.8 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อวิถีสัญญาณ Akt ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926

การกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ของ eNOS เกิดผ่านการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ upstream หลายเอนไซม์ ได้แก่ 1) เอนไซม์ Akt ที่ถูกกระตุ้นโดย oestrogen, VEGF และ insulin 2) เอนไซม์ AMP-activated protein kinase (AMPK) ที่ถูกกระตุ้นโดย insulin 3) เอนไซม์ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) ที่ถูกกระตุ้นโดยสาร bradykinin และ 4) เอนไซม์ PKA ที่ถูกกระตุ้นโดย shear stress การกระตุ้นของเอนไซม์ทั้งสี่กลุ่มนี้ทำให้เกิดการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ของเอนไซม์ eNOS อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการรายงานเอนไซม์ kinase ต่างๆ ควบคุมเอนไซม์ eNOS ผ่านการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 แต่เอนไซม์ Akt เป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่มีรายงานว่าควบคุมเอนไซม์ eNOS ได้ในสิ่งมีชีวิต (Forstermann and Sessa, 2012) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของส่วนสกัด EPE ต่อการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser 473 ของเอนไซม์ Akt เนื่องจากส่วนสกัด EPE สามารถกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ได้ดังแสดงผลในรูปที่ 4-10 จากการทดลองพบว่า ส่วนสกัด EPE เพิ่มปริมาณเอนไซม์ในรูป p-Akt ที่เวลา 10 และ 30 นาที หลังสัมผัสกับส่วนสกัด (รูปที่ 4-11)



รูปที่ 4-11 ปริมาณโปรตีน pAkt ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 (A) และ 30 นาที (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน pAkt ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO

(B)



รูปที่ 4-11 (ต่อ) ปริมาณโปรตีน pAkt ในเยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 (A) และ 30 นาที (B) กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน pAkt ที่แสดงผลเป็นจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมสัมผัสกับ 0.2 % (v/v) DMSO

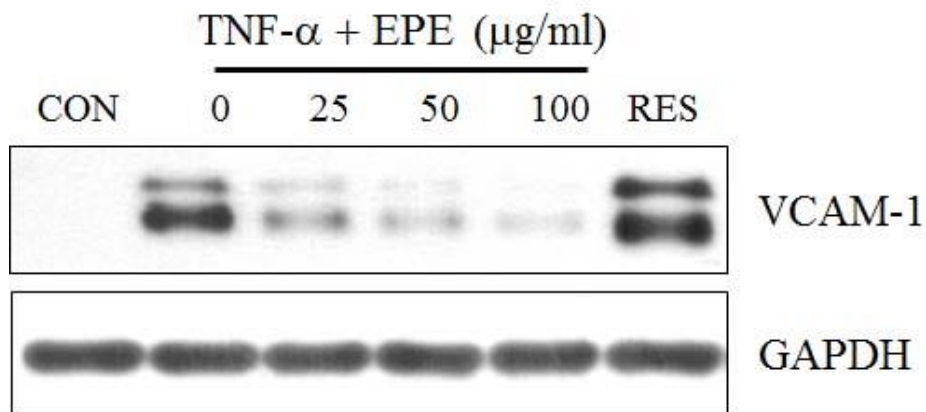
จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการเพิ่มปริมาณไนโตรทีในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926 ของส่วนสกัดเอทานอล EPE อาจเกิดจากกลไกอย่างน้อยสองทาง คือ ส่วนสกัดไปมีผลให้มีการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ eNOS ทำให้มีปริมาณ mRNA ของ eNOS เพิ่มขึ้นและส่งผลให้มีปริมาณโปรตีน eNOS เพิ่มขึ้น อีกกลไกหนึ่งอาจเป็นผลจากการที่ส่วนสกัดไปกระตุ้นผ่านวิถีสัญญาณ Akt ให้มีการฟอสโฟริเลชันบนเอนไซม์ Akt และเกิดการฟอสโฟริเลชันบนเอนไซม์ eNOS ทำให้มีแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS เพิ่มขึ้นจึงมีการผลิตไนตริกออกไซด์มากขึ้น และมีไนโตรทีสะสมมากในที่สุด

ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำของเร่วหอมทั้งสามส่วนสกัด มีการเพิ่มของปริมาณไนโตรทีในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำ แต่ส่วนสกัดกลับไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ eNOS และยังไม่มียผลกระตุ้นการฟอสโฟริเลชันของทั้งเอนไซม์ Akt และ eNOS ดังนั้นควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกที่ทำให้มีการเพิ่มปริมาณไนโตรทีของส่วนสกัดน้ำของเร่วหอม

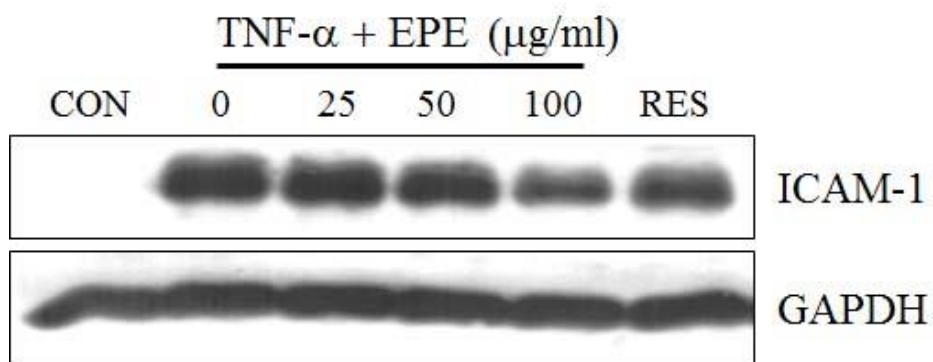
4.9 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอม และสาร MCC ต่อการแสดงออกของโปรตีน VCAM และ ICAM ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926

ปัจจัยที่ทำให้เกิด atherosclerosis ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรค CVD นอกจากเป็นผลมาจาก endothelial dysfunction ที่ให้มีปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ต่ำลง เนื่องจากมีการแสดงออกของยีน eNOS ลดลง (Li and Förstermann, 2013). อีกสาเหตุหนึ่งคือการเกิดการอักเสบภายใน

หลอดเลือด (Stoner et al., 2013) คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของส่วนสกัดเอทานอล EPE ต่อการแสดงออกของโปรตีน vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) และ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกบนเซลล์เยื่อหลอดเลือดในขณะที่มีการอักเสบถูกกระตุ้นการแสดงออกของโดยinflammatory cytokines ทั้ง VCAM-1 และ ICAM-1 มีส่วนร่วมในกระบวนการ leukocyte infiltration โดยทั้ง VCAM-1 และ ICAM-1 ทำหน้าที่จับกับโปรตีนบนเยื่อเซลล์ของเม็ดเลือดขาว เช่น macrophage และ lymphocyte เพื่อให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เยื่อหลอดเลือดมายังบริเวณที่มีการอักเสบทำให้เกิด atherosclerosis (Stoner et al., 2013) ผลการทดลองที่แสดงในรูป 4-12 และ 4-13 พบว่า TNF- α สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 25-100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าปริมาณโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส TNF- α เพียงอย่างเดียว โดยที่ส่วนสกัดเอทานอล EPE สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 ได้มากกว่าโปรตีน ICAM-1



รูปที่ 4-12 ปริมาณโปรตีน VCAM-1 ในเยื่อบุหลอดเลือดคนุขย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วย ส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เป็น ภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน



รูปที่ 4-13 ปริมาณโปรตีน ICAM-1 ในเยื่อบุหลอดเลือดคนุขย์ เซลล์ไลน์ EA.hy 926 ที่ถูกบ่มด้วย ส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เป็น ภาพตัวแทนจาก immunoblot ของแถบโปรตีนจากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE และส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 ที่ความเข้มข้น 12.5-200 $\mu\text{g/ml}$ เพิ่มปริมาณไนโตรทีในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดหนูเมอซี EA.hy 926 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น
2. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE และส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 ที่ความเข้มข้น 12.5-200 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดหนูเมอซี EA.hy 926 ยกเว้นส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ลดความมีชีวิตรอดของเซลล์ลง 19 และ 25 % ตามลำดับ
3. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน eNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ mRNA และโปรตีน ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 ไม่กระตุ้นการแสดงออกของยีน eNOS
4. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ eNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ eNOS ที่ตำแหน่ง Ser 1177 ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 ไม่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ eNOS
5. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ pAkt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ pAkt
6. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดหนูเมอซี EA.hy 926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการเพิ่มปริมาณไนโตรทีในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926 ของส่วนสกัดเอทานอล EPE อาจเกิดจากกลไกอย่างน้อยสองทาง คือ ส่วนสกัด EPE กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนและ mRNA ของเอนไซม์ eNOS อีกกลไกหนึ่งอาจเป็นผลจากการที่ส่วนสกัด EPE ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ eNOS โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ eNOS แต่สารที่เป็นองค์ประกอบในส่วนสกัดเอทานอล EPE และเป็นสารออกฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณไนโตรทียังไม่ได้ทำการตรวจสอบ จึงควรมีการศึกษาแยกสารที่เป็นสารออกฤทธิ์ต่อไป ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำของเร่วหอมทั้งสามส่วนสกัด มีการเพิ่มของปริมาณไนโตรทีในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำ แต่ส่วนสกัดกลับไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ eNOS และแอกทิวิตีของเอนไซม์ eNOS ดังนั้นควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกที่ทำให้มีการเพิ่มปริมาณไนโตรทีของส่วนสกัดน้ำของเร่วหอม นอกจากนี้คณะผู้วิจัยพบว่า ส่วนสกัดเอทานอล EPE ยังสามารถลดการอักเสบของหลอดเลือดโดยลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ผลที่ได้ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดของเร่วหอมโดยเฉพาะส่วนสกัดเอทานอล EPE มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด

ป้องกันการเกิด atherosclerosis และช่วยลดความดันโลหิต เป็นการประหยัดงบประมาณและนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหง้าเร่วหอมอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นพิษของส่วนสกัดของเร่วหอมในสัตว์ทดลองและการระบุสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดเอทานอล EPE เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของส่วนสกัดของเร่วหอมต่อไป

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2556). การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบเร่วหอม: มูลค่าเพิ่มจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายเผ่าพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- รายการเกษตรน่ารู้. พืชสมุนไพร เร่วหอม. สถานีโทรทัศน์กองทัพบกช่อง 7. 28 ตุลาคม 2553.
- ภาณุวัฒน์ ปานเกตุ จุรีพร คงประเสริฐ นิตยา ภัทรกรรม นงนุช ตันติธรรม ศุภวรรณ มโนสุนทร และพัชริยา ยิ่งอินทร์ (มปป) รายงานการพยากรณ์โรคและภัยสุขภาพ สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- วารสารเคหเกษตร. เร่วหอม สมุนไพรที่ขยายพันธุ์ ปลูก และแปรรูป ไม่ยาก.
http://www.kehasset.com/index.php?option=com_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38. สืบค้นวันที่ 26 กันยายน 2554.
- ศกวรรณ แก้วกลิน และ นิตยา พันธุ์เวทย์. (มปป) ประเด็นรณรงค์วันหัวใจโลก ปี พ.ศ. ๒๕๕๔. สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357:593-615.
- Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb. Cell Fact*. 6: 1. doi: 10.1186/1475-2859-6-1.
- Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2003); 284: R1–R12.
- Forstermann U, and Sessa W. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* (2012) 33, 829–837
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237:893–900.

- Koltermann A, Hartkorn A, Koch E, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(13):1715-22.
- Li, H., and Förstermann, U. (2013). Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology.* 13:161–167
- Li H, Wallerath T, Förstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7 (2002) 132–147.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology.* 15:323-350.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 1998. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 408 Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2001. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
- Seo JW, Srisook E, Son HJ, Hwang O, Cha YN, Chi DY. Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(14):3369-3373.
- Srisook, K., Cha., Y.N. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68: 1709-1720.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Völler N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Förstermann U, Li H. Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 195 (2007) e104–e111.
- Stoner, L., Lucero, A.A., Palmer, B.R., Jones, L.M., Young, J.M., Faulkner, J. (2013). Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry.* 46: 1353–1371.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2009; 196(2):193-222.
- World Health Organization. World Health Statistics 2012. All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site (www.who.int)

- Wattanapitayakul SK, Suwatronnakorn M, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsukul S, Charuchongkolwongse S, Chansuvanich N. Kaempferia parviflora ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 110 (2007) 559–562.
- Xia, N., Förstermann, U., Li, H. (2014). Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 2014, 19, 16102-16121.
- Zhang X, Xiong H, Liu L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141 : 206-211.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 2002;109: 817–826.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาเอก หลักสูตรดุขฎฐิบััฒฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จำนวน 1 คน คือ นางสาวสรินพร อุฒพงษ์ (อยู่ในระหวังกการศึคษา)
2. Sarinporn Udompong, Ekaruth Srisook and Klaokwan Srisook. *Etlingera pavieana* increase nitric oxide production and eNOS activation in human endothelial cells. Life Sciences (Manuscript in preparation).
3. ผลการศึคษาที่ไ้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่างของเร่วหอมที่เป็นพืชสมุนไพรรพื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียง นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของชุมชนในภาคตะวันออกเฉียงของไทย

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย :

- ชื่อ นางกล่าวขวัญ ศรีสุข
Mrs. Klaokwan Srisook
- ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745-900 ต่อ 3058 E-mail: klaokwan@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ.	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถานศึกษา
2547	Ph.D.	Medical Science	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเคมีของอนุมูลอิสระ อนุชีววิทยา และการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

6. ผลงานทางวิชาการ

Books

- กล่าวขวัญ ศรีสุข. (๒๕๕๖). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (พิมพ์ครั้งที่ ๒). กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- Srisook, K. & Cha, Y. N. (2005). Biphasic induction of HO-1 in macrophages treated with lipopolysaccharide: role of HO-1 induction in cell survival from oxidative stress. In Y.J. Surh & L. Packer (Eds), *Oxidative stress, Inflammation and Health* (pp. 145-193). Boca Raton: Taylor & Francis.

Journals

- กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หริ่มเพ็ง และคณะ. (๒๕๕๗). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, ๑๙, ๓๐๔-๓๑๑.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข*, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ เอกรัฐ ศรีสุข. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150
- Klaiwattana, P., Srisook, K., Srisook, E., Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15, 157-169.

- , K., Srisook, E., Nachaiyo, W., Chan-In, M., Thongbai, J., Wongyoo, K., et al. (2015). Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, *165*, 94-102.
- Jaratjaroonphong, J., Tuengpanya, S., Saeeng, R., Udompong, S., & **Srisook, K.** (2014). Green synthesis and anti-inflammatory studies of a series of 1,1-bis(heteroaryl)alkane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *83*, 561-568.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., & **Srisook, K.** (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, *146*, 495-504.
- Srisook, K.**, Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*, 4077-4081.
- Srisook, K.**, Palachot, M., Mongkol, N., Srisook, E., & Saraputit, S. (2011). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn. may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*, 1008-1014.
- Klaokwan Srisook**, Shan-Shu Han, Hyung-Sim Choi, Mei-Hua Li, Hideo Ueda, Chaekyun Kim, Young-Nam Cha. (2006). CO from enhanced HO activity or from CO-donor inhibits both O_2^- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical Pharmacology*. *71*: 307-318.
- Klaokwan Srisook**, Nam-Hee Jung, Bum-Rae Kim, Seok-Ho Cha, Hye-Sun Kim, Young-Nam Cha. (2005). Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotection effect by NO on cadmium induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. *Toxicology in Vitro*. *19*: 31-39.
- Klaokwan Srisook** and Young-Nam Cha. (2005). Superinduction of heme oxygenase-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. *12*: 70-79.
- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Role of NO in enhancing the expression of HO-1 in LPS-stimulated macrophages. *Methods in Enzymology*. *396*: 368-377.
- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Cytotoxic and cytoprotective actions of O_2^- and NO ($ONOO^-$) are determined both by cellular GSH level and HO activity in macrophages. *Methods in Enzymology*. *396*: 414-424.

- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Molecular mechanisms involved in enhancing in HO-1 expression: De-repression by heme and activation by Nrf2 , the “one-two” punch. *Antioxidants Redox Signaling*. 7: 1674-1687.
- Klaokwan Srisook**, Nopporn Sarataphan Kosum Chansiri. (2005). Detection of *Babesia bovis* in Cow Blood by PCR-ELISA. *Burapha Science Journal*. 10: 49-57.
- Klaokwan Srisook** and Young-Nam Cha. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68: 1709-1720.
- Chantra Tananyutthawongese, **Klaokwan Saengsombut**, Wasana Sukhumsirichat, Walaya Uthaisang, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. (1999). Detection of bovine hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. *ScienceAsia* 25: 85-90.

Proceedings

- Srisook, K.**, Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.
- Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7. *Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.
- Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. *Proceeding of the 5th international Conference on Natural Products for Health and Beauty* (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.
- Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCCT Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok: The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCCT) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).

- Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaroonphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*.(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.
- Srisook, K.**, Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). .A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.
- Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). .*In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.
- Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).
- Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).
- Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).
- Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.
- Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9th National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Klaokwan Srisook and Nadtaya Mongkol. Effect of carboxy-PTIO on heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages. *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand, 2006.

Klaokwan Saengsombut, Wasana Sukhumsirichart, Jarun Boonchai, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. *Analysis of partial sequences of LSUrRNA genes of Theileria parasites isolated in Thailand and T. sergenti*. The 25th Congress on Science and Technology of Thailand, Pitsanuloke, Thailand, 1999, p. 804-805.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

- ชื่อ นายเอกรัฐ ศรีสุข
Mr. Ekaruth Srisook
- ตำแหน่ง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3009 E: mail ekaruth@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

<u>ปี พ.ศ.</u>	<u>คุณวุฒิ</u>	<u>สาขาวิชา</u>	<u>สถานศึกษา</u>
2548	Ph.D.	Chemistry	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	อินทรีย์เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่ชำนาญพิเศษ

Organic synthesis, Medicinal chemistry, Natural products

6. ผลงานทางวิชาการ

Journals

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กาญจนา หริ่มเพ็ง และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19, 304-311

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ **เอกรัฐ ศรีสุข**. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150

Keun Sam Jang, Dong Seok Shin, **Ekaruth Srisook**, Ho-Chun Song, Dae Yoon Chi. (2016). Versatile functionalization of electron rich-fused heterocyclic arenes via electrophilic

- aromatic addition reaction and their applications. *Tetrahedron*. (In press). doi: 10.1016/j.tet.2016.07.010.
- Klaiwattana, P., Srisook, K., **Srisook, E.**, Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *15*, 157-169.
- Klaokwan Srisook*, **Ekaruth Srisook***, Wenuka Nachaiyo, Mingkwan Chan-In, Jitra Thongbai, Karnjanapa Wongyoo, Sasithorn Chawsuanthong, Kanita Wannasri, Sudarat Intasuwan and Kingkan Watcharanawee. (2015). Bioassay-guided fractionation of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. leaves and its mechanistic action through the suppression of iNOS and COX-2 pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. *165*, 94-102.
- Prasopthum A, Pouyfung P, Sarapusit S, **Srisook E**, Rongnoparut P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. *30*, 174-181.
- Rattanawadee Kotewong, Panida Duangkaew, **Ekaruth Srisook**, Songklod Sarapusit, Pornpimol Rongnoparut. Structure-function relationships of inhibition of mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. *Parasitology research*. 2014; *113*(9): 3381-3392.
- Phisit Pouyfung, Aruna Prasopthum, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Mechanism-based Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2014; *29*:75-83.
- Klaokwan Srisook, Doungnapa Buapool, Rattiya Boonbai, Panadda Simmasut, Yaowaluck Charoensuk, **Ekaruth Srisook**. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*; 4077-4081.
- Sirikun Pethuan, Panida Duangkaew, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Inhibition against mosquito cytochrome P450 enzymes by rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on cypermethrin cytotoxicity in *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Medical Entomology*. 2012 *49*(5):993-1000
- Seo JW, **Srisook E**, Son HJ, Hwang O, Cha YN, Chi DY. Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells *Eur J Med Chem*. 2008 Jun;*43*(6):1160-70

Ekaruth Srisook,^{*} Areerat Makbodee and Supatra Karnkla “Synthesis of 3-Substituted-*p*-cresol via 2,5-Cyclohexadienone Intermediate” *Burapha Science Journal*. **2006**, 11 (2).

JaeWoong Seo, **Ekaruth Srisook**, Hyo Jin Son, Oon Yoo Hwang, Young Nam Cha, Dae Yoon Chi. Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005,15:3369-3373.

Han Young Choi, **Ekaruth Srisook**, Kun Sam Jung, Dae Yoon Chi. Electrophilic Aromatic Addition : Electrophilic Attack at H Position. *J. Org. Chem*. 2005, 70, 1222-1226.

Ekaruth Srisook and Dae Yoon Chi, The Syntheses of 3-Substituted 4-(Pyridin-2-ylthio)indoles via Leimgruber-Batcho Indole Synthesis. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2004, 25, 895-899.

Gloria L. Silva, Roberto R. Gil, Baoliang Cui, Heebyung Chai, Thawatchai Santisuk, **Ekaruth Srisook**, Vichai Reutrakul, Patoomratana Tuchinda, Smaisukh Sophasan, Suparp Sujarit *et al.* Novel cytotoxic ring-a *seco*-cycloartane triterpenes from *Gardenia coronaria* and *G. sootepensis*. *Tetrahedron*, 1997, 53, 529-538.

Proceedings

Srisook, K., Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.

Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed

responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7.

Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.

Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. *Proceeding of the 5th international Conference on Natural Products for Health and Beauty* (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICST Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok:The American

Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCT) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).

Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaroonphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*.(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.

Srisook, K., Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). .A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.

Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).

Klaokwan Srisook*, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).

Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.

Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the

1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9th National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Phrommanich, S., Techasauvapak, P., **Srisook, E.**, Mujchacheep, S., Hrimpeng, K. *Screening for anti-Staphylococcus aureus activity of plant extracts*. The 18th Biennial Conference of the Asian Association for Biology Education, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, 2000.8.

Ekaruth Srisook, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. Syntheses and biological activity of NAMDA derivatives. The 1st Congress on Chemistry and Applied Chemistry, Chonburi, Thailand, Mar 2007.

Ekaruth Srisook*, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. "Syntheses of NAMDA derivatives as nitric oxide reducing agents." *The 6th National Symposium on Graduate Research, Bangkok, Thailand, 2006*.