



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. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 181713

สัญญาเลขที่ 76/2559

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

กรกฎาคม พ.ศ. 2561

บทคัดย่อ

ความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (CVDs) ภาวะหลอดเลือดแข็งเกี่ยวข้องกับ endothelial dysfunction ที่เป็นผลให้มีชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์น้อยลง และจัดเป็นโรคของการอักเสบเรื้อรัง ในปัจจุบันพบว่าส่วนสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถป้องกันภาวะหลอดเลือดแข็งได้โดยการเพิ่มชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์ รวมทั้งลดภาวะเครียดออกซิเดชัน และการอักเสบ ผลการศึกษาของเราก่อนหน้านี้พบว่าไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำ (EPW1 EPW2 and EPW3) และส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม (EPE) มีปริมาณเพิ่มขึ้นในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ส่วนสกัด EPE สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำทั้งหมดไม่ของเร่วหอมไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ในการศึกษาการวิเคราะห์ส่วนสกัดทั้งหมดจากเร่วหอม ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าส่วนสกัดเองมีไนไตรท์และไนเตรทเป็นองค์ประกอบ

ส่วนสกัดเอทานอล EPE ยังสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ ได้แก่ vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) และ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น นอกจากนี้ส่วนสกัด EPE สามารถยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ JNK แต่ไม่มีผลต่อ ERK และ p38 MAPK ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ส่วนสกัด EPE ยังเพิ่มระดับ phosphorylated Akt (Ser473) การแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่บ่มกับสาร wortmannin ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ Akt/PI3K และสาร SP600125 ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ JNK และส่วนสกัด EPE เรายังพบว่าสารในส่วนสกัด EPE ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดเลือด คือ สาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) และ trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD) สาร MCC และ MCD ลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 นอกจากนี้ยังทำการทดสอบผลของส่วนสกัด EPE ต่อการผลิต ROS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α โดย H₂DCF-DA probe ส่วนสกัด EPE ยับยั้งการผลิต ROS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมสามารถเพิ่มชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์ โดยผ่านการยับยั้งการเกิดความเครียดจากออกซิเดชัน และการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS รวมทั้งลดการอักเสบในหลอดเลือดผ่านวิถีสัญญาณ JNK และ Akt ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ดังนั้นส่วนสกัดของเร่วหอมนี้อาจถูกนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อใช้ป้องกันภาวะหลอดเลือดแข็ง

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

Abstract

Hypertension is a major risk factor for developing atherosclerosis which is a leading cause of cardiovascular diseases (CVDs). Atherosclerosis is associated with endothelial dysfunction involving a reduced nitric oxide (NO) bioavailability and has been considered as a chronic inflammatory disease. Currently, many plant extracts have been shown their prevention of atherosclerosis via increasing NO bioavailability and decreasing oxidative stress as well as inflammatory response. From our previous data, the nitrite levels of media from human endothelial EA.hy926 cells treated with water (EPW1 EPW2 and EPW3) and ethanol (EPE) extract from *Etingera pavieana* rhizomes increased in a concentration-dependent manner. EPE slightly increased eNOS expression in endothelial cells whereas the water extracts did not. In the present study, we found that all extracts from *E. pavieana* itself contain nitrite and nitrate as determined by HPLC.

EPE suppressed the expression of inflammatory responsive proteins such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in TNF- α -induced endothelial cells in a concentration-dependent manner. Moreover, EPE inhibited the phosphorylation of JNK but not ERK and p38 MAPK in endothelial cells. Also, EPE upregulated the levels of phosphorylated Akt (Ser473). The expression of ICAM-1 and VCAM-1 was increased in cells co-treated with inhibitor of Akt/PI3K (wortmannin) or JNK (SP600125) and EPE. We found the active compounds responsible for anti-vascular inflammatory effect of EPE are 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) and trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD). They down-regulated ICAM-1 and VCAM-1 expression in a concentration-dependent manner. Furthermore, EPE was determined its effect on ROS production in TNF- α -induced endothelial cells by H₂DCF-DA probe. EPE inhibited ROS level in a concentration-dependent manner. Taken together, the obtained data suggest that the rhizome extract from *E. pavieana* increased NO bioavailability through inhibiting oxidative stress and activating eNOS expression as well as decreased vascular inflammation via JNK and Akt signaling pathway in endothelial cells. Thus, *E. pavieana* rhizomes might be developed as food supplement for preventing atherosclerosis.

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 นางสาวกมลพร โปธิประสาธ และนางสาวฐิติพร ทองเย็น สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
สารบัญตาราง	8
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
บทนำ	10
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลองและอภิปราย	21
สรุปผลการทดลอง	37
บรรณานุกรม	39
ผลผลิตของโครงการวิจัย	42
ประวัตินักวิจัย	43

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4-1	ปริมาณไนไตรท์ที่พบในส่วนสกัดจากเหง้าเร่งหอมที่วิเคราะห์โดย ปฏิกิริยา Griess	21
ภาพที่ 4-2	กราฟมาตรฐานของไนไตรท์ (NO_2^-) ที่ปริมาณต่างๆ กับพื้นที่ใต้กราฟ ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC	22
ภาพที่ 4-3	กราฟมาตรฐานของไนเตรท (NO_3^-) ที่ปริมาณต่างๆ กับพื้นที่ใต้กราฟ ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC	22
ภาพที่ 4-4	โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์ และไนเตรทใน ส่วนสกัด EPW1	23
ภาพที่ 4-5	โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์ และไนเตรทใน ส่วนสกัด EPW2	23
ภาพที่ 4-6	โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์ และไนเตรทใน ส่วนสกัด EPW3	24
ภาพที่ 4-7	โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์และไนเตรทในส่วนสกัด EPE	24
ภาพที่ 4-8	โครมาโตแกรม HPLC ของสาร MCC (A) ของส่วนสกัดเอทานอล EPE (B) และสารผสมระหว่างส่วนสกัดเอทานอล EPE กับสาร MCC (C)	26
ภาพที่ 4-9	โครมาโตแกรม HPLC ของสาร MCD (A) ของส่วนสกัดเอทานอล EPE (B) และสารผสมระหว่างส่วนสกัดเอทานอล EPE กับสาร MCD (C)	28
ภาพที่ 4-10	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 โดยวิธี Western blot ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE	29
ภาพที่ 4-11	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ที่สัมผัสกับ MCC และ $\text{TNF-}\alpha$	31
ภาพที่ 4-12	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ที่สัมผัสกับ MCD และ $\text{TNF-}\alpha$	32
ภาพที่ 4-13	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-ERK (A), p-p38 (B) และ p-JNK (C) ในเซลล์ เยื่อบุหลอดเลือด ที่สัมผัสกับ EPE	34
ภาพที่ 4-14	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-Akt (A) และ p-c-Jun (B) ในเซลล์ เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4-15	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-Akt ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE เป็นเวลา 30 นาที (A) และปริมาณโปรตีน ICAM-1 (B) และ VCAM-1 (C)	36
ภาพที่ 4-16	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE และ SP600125	37
ภาพที่ 4-17	การยับยั้งปริมาณ intracellular ROS โดย EPE เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE	38

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 แสดงสถานะของ HPLC ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ MCC	25
ตารางที่ 4-2 แสดงสถานะของ HPLC ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ MCD	27

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

NO	Nitric oxide
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
EPE	Ethanol extract from <i>Etlingera pavieana</i> rhizomes
MCC	4-methoxycinnamyl p-coumarate
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ROS	Reactive oxygen species
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 พันธุเวท, มปป) สาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการไม่ดูแลสุขภาพตัวเอง เช่น พักผ่อนไม่เพียงพอ เครียด ไม่ออกกำลังกาย และรับประทานผักผลไม้ไม่เพียงพอ (สถาบันวิจัยโรคเรื้อรัง, 2552; ศกวรรณ แก้วกลิน และนิตยา พันธุเวท, มปป) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเหล่านี้กำลังเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรได้รับการแก้ไข เนื่องจากเป็นโรคที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง และมีโอกาสเกิดความพิการตามมา ส่งผลกระทบทั้งต่อผู้ป่วย ครอบครัวและประเทศชาติ ทั้งในแง่การเสียชีวิตของตัวบุคคล องค์กร และใช้งบประมาณของประเทศในการดูแลรักษาพยาบาลผู้ป่วยซึ่งมาจากต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท แนวทางแก้ไขที่ดีที่สุดคือปรับเปลี่ยนพฤติกรรม และดูแลตนเองมากขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีแรงจูงใจให้มีการรักษาสุขภาพให้แข็งแรง เช่น การออกกำลังกาย การเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ รวมทั้งมีความนิยมในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดต่างๆ มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสุขภาพที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เห็นได้จากการมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่างๆ ออกมาจำหน่ายอย่างมากมาย และจากการสำรวจพบว่ามูลค่าของตลาดส่วนนี้มีมากกว่า 2,900 ล้านบาทต่อปีในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าประชาชนมีความใส่ใจในการดูแลตนเองให้มีสุขภาพที่ดี ในการนี้พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมที่สำคัญ ที่ทำให้ประชาชนมีทางเลือกในการรักษาแบบป้องกัน (chemopreventive therapy)

เซลล์เยื่อบุทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) เป็นเครื่องหมายของการเกิดโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด ภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจะมีไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) เป็นสารสื่อกลาง

ในการรักษาภาวะอัมพาตของหลอดเลือด โดยยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด ป้องกันการจับและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว และทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดเกิดการคลายตัว ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vanhoutte et al., 2009) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำงานผิดปกติและเกิดพยาธิสภาพของโรคความดันโลหิตสูง และภาวะหลอดเลือดแข็ง คือการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ไนตริกออกไซด์ที่ควบคุมการทำงานของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดถูกผลิตจากเอนไซม์ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ไนตริกออกไซด์นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ soluble guanylate cyclase ที่อยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทำให้มีการเพิ่ม cGMP ส่งผลให้เกิดขยายตัวของหลอดเลือด และยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (Koltermann et al., 2007) ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ และการสลายของไนตริกออกไซด์ ปัจจัยที่ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์น้อยลง คือ ความเครียดจากออกซิเดชัน ความชราภาพ การพักผ่อนไม่เพียงพอ และการสูบบุหรี่เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009) ดังนั้นการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในผู้สูงอายุ หรือในผู้ป่วยกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นวิธีการรักษาที่น่าสนใจอีกทางหนึ่ง แม้ว่าเอนไซม์ eNOS เป็นเอนไซม์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา แต่ปริมาณการแสดงออกของยีนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยสิ่งกระตุ้นทางชีวเคมี ชีวฟิสิกส์ และฮอโมน 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 BH₄ ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เพื่อป้องกันการปฏิกริยา uncoupling ทำให้เกิด superoxide anion radical (O₂^{•-})

เร่วหอม (*Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Sm.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ที่เกษตรกรทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยทำการปลูกเป็นพืชแซมในสวนผลไม้ เหง้าเร่วหอมใช้เป็นเครื่องเทศใส่ในแกงและก๋วยเตี๋ยวในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้เหง้าเร่วหอมยังใช้ในการรักษาอาการท้องอืด ขับลม และขับปัสสาวะ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) ในปัจจุบันสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกรมส่งเสริมการเกษตร ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์ เพื่อจำหน่ายเหง้าทั้งในและนอกประเทศ (วารสารเกษตร, มปป.; รายการเกษตรกรรมนำรู้, 2553) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2551) ต่อมา มีการแยกสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของเหง้าเร่วหอมจำนวน 9 ชนิด ได้แก่สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ผลจากการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถกระตุ้น

การผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นในเซลล์แมคโครฟาจ 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) คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ และศึกษากลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในระดับโมเลกุลของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอม รวมทั้งทำการแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัดดังกล่าวเพื่อใช้เป็นสารที่ควบคุมคุณภาพของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอม เพื่อเป็นข้อมูลในการนำส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและลดความดันโลหิต เป็นการประหยัดงบประมาณและนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหง้าเร่วหอมอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นและกลไกระดับโมเลกุลในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ของส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอม
2. เพื่อแยกสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์จากส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอม

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการวิเคราะห์สารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดในส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมโดยการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์โดยวิธี bioassay-guided isolation โดยใช้เซลล์ไลน์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ เป็นโมเดล และวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดด้วยเทคนิค HPLC และนำส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด มาทดสอบฤทธิ์ป้องกันหลอดเลือด

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 ประกอบด้วยบริเวณจับของกลุ่ม 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 ส่วนมากมีการแสดงออกที่เซลล์เยื่อๆ การทำงานของเอนไซม์ eNOS จะถูกกระตุ้นเมื่อระดับ Ca^{2+} ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น Ca^{2+} ที่สูงขึ้นจะจับกับ calmodulin และเหนี่ยวนำให้ calmodulin จับกับเอนไซม์ eNOS ได้แน่นขึ้นทำให้เพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ (Alderton et al., 2001) นอกเหนือจากการกระตุ้นด้วยการเพิ่มระดับของ Ca^{2+} แอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS ยังถูกกระตุ้นด้วยการถูกฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) เอนไซม์ eNOS ถูกฟอสโฟริเลชันที่กรดอะมิโนเซอรีน (Ser), ทรีโอนีน (Thr) และไทโรซีน (Tyr) ที่อยู่ในโครงสร้าง เช่น การฟอสโฟริเลชันที่ Ser1177 จะกระตุ้นการไหลของอิเล็กตรอนในบริเวณ reductase domain เพิ่มความไวต่อ Ca^{2+} (Fleming and Busse, 2003) สารต่างๆ

ที่สามารถกระตุ้นการแยกตัวของเอนไซม์ของ eNOS โดยผ่านการกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ได้แก่ oestrogen และ VEGF กระตุ้นเอนไซม์ Akt ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ฮอร์โมน 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 มีผลทางสรีรวิทยาในด้านต่างๆ 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) จะทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ลดลง สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ลดลงคือการเกิดความเครียดจากออกซิเดชัน 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)

มีการศึกษาพบว่าการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS โดยการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS การเพิ่มปริมาณซัสเตรต L-arginine และการเพิ่มโคแฟกเตอร์ BH4 และการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์โดย NO donor เป็นต้น (Zhang et al., 2010) การเพิ่มปริมาณ BH4 โดยการเสริม BH4 เป็นวิธีการป้องกันและรักษาโรคหลอดเลือดและหัวใจทางหนึ่ง แต่ปัญหาของการให้ BH4 เสริมคือความไม่เสถียรของ BH4 (Zhang et al., 2010) จึงมีความพยายามหาสารที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ BH4 ในเซลล์ เช่น fluvastatin สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ guanosine triphosphate cyclohydrolase-1 (GTPCH-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการผลิต 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 [*Etingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.] เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นไม้สกุลเดียวกับกาหลาและปุด 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.; รายการเกษตรกรน่ารู้, 2553) จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) และต้านการอักเสบ โดยส่วนสกัดย่อยแยกและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ 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 ซึ่งเป็น

สารที่มีการพบเป็นครั้งแรกในเหง้าเร่วหอม มีฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และสารนี้ยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ (เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555) ส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นในเซลล์แมคโครฟาจ 264.7 (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2556)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การสกัดสารจากเหง้าเร่วหอม

นำสมุนไพรเร่วหอมจากจังหวัดจันทบุรี มาล้างด้วยน้ำประปา แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อน จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร นำเหง้าเร่วหอมที่บดละเอียด สกัดในน้ำเดือด ในอัตราส่วน 1:10 1:20 1:30 ก่อนกรองส่วนสกัดน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยเครื่องดูดลดความดัน ที่อุณหภูมิห้อง ต้มผงเหง้าเร่วหอมอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนสกัดน้ำของเหง้าเร่วหอม มาทำการระเหยน้ำด้วยเครื่อง lyophilizer จดบันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบต่อไป นอกจากนี้ยังได้เตรียมส่วนสกัดเอทานอล โดยนำสมุนไพรที่บดละเอียด มาสกัดด้วย 95% เอทานอลเป็นเวลา 7 วัน และทำการกรอง จากนั้นนำผงพืชกลับมาแช่ในเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำสารละลายที่ได้มารวมกันและทำให้แห้งโดยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ จดบันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมด ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555)

การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อหุ้หลอดเลือดสายพันธุ์ EA. hy926 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไร้เชื้อและเสริมด้วยซีรัมเข้มน้ซ้ร้อยละ 10 (V/V) สารละลายยาเพนิซิลิน (100 µg/ml) และ สเตรปโตไมซิน (100 µg/ml) บนจานเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 100 mm และนำไปบ่มเซลล์ในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มน้ซ้ร้อยละ 5 (V/V) เป็นเวลา 2 คีน จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำเซลล์ไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ต่ออีก 1 คีน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตประมาณร้อยละ 80 ของจานเพาะเลี้ยง จึงทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะโดยการไ้ใช้เอนไ้มน้ทริบซิน

3.3 การ subculture โดยใช้เอนไ้มน้ทริบซิน (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555)

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ชั้นตอนแรกทำการดูดอาหารเก่าจากเซลล์เยื่อหุ้หลอดเลือด EA. hy926 ทั้ง และทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS 10 ml [NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM] ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมที่อุ่น หลังจากนั้นทำการดูด PBS ทั้งและใส่ 2 ml

สารละลายทริปซิน/อีดีทีเอ นำไปบ่มเซลล์ในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 (V/V) นาน 2 นาที และเขย่าจานเพาะเชื้อเบาๆ ให้สารละลายกระจายทั่วจาน เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะ ใช้ปิเปตพลาสติกขนาด 10 ml ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 8 ml แล้วใช้ปิเปตพลาสติกขนาด 10 ml ดูดสารละลายเซลล์จากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดพลาสติกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 5 นาที ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไร้เชื้อและเสริมด้วยซีรัมเข้มข้นร้อยละ 10 (V/V) ลงในหลอดแล้วทำการกระจายเซลล์โดยการ ปิเปตสารละลายเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายตัวดี ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี 0.4% trypan blue แล้วทำการนำเซลล์บน hemocytometer ภายใต้อ่างจุลทรรศน์หัวกลับ แบ่งเซลล์ลงภาชนะใหม่ในอัตราส่วนที่ต้องการ

3.4 การทดสอบส่วนสกัดต่อการผลิตไนตริกออกไซด์

ไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) เกิดจากการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ NOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอกทีวิตีของเอนไซม์ NOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ ให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีส่วนสกัด และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 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 และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook และ Cha, 2005) ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละสภาวะการทดลอง ในการศึกษานี้ใช้ resveratrol เป็นสารควบคุมแบบบวกในการกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือด

3.4 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในส่วนสกัด

3.4.1 แยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์จากส่วนสกัดย่อยโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี เช่น คอลัมน์โครมาโทกราฟี ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และ HPLC

3.4.2 พิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปี เช่น NMR

3.4.3 วิเคราะห์ HPLC fingerprint ของส่วนสกัด และวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ที่แยกได้

3.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

3.5.1 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 30 มิลลิเมตร จำนวน 3×10^5 เซลล์ต่อจาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตู้อาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร EPE ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ TNF- α (10 ng/ml) แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่กำหนด เมื่อครบเวลาทำการสกัดโปรตีน โดยเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS ที่เย็นจำนวน 2 ครั้ง โดยใช้ RIPA protein lysis buffer ที่มี 1X PI และ 1X phosphatase inhibitor cocktail (PhosStop) ปริมาตร 50 μ l จากนั้นใช้ที่ขูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนแบ่งใส่ในหลอดพลาสติก 1.5 ml ใหม่ นำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และทำการวิเคราะห์ โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โปรตีนส่วนที่เหลือ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำการวิเคราะห์โดยนำโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่น 8 μ l ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม แล้วทำการผสมกับสารละลาย 1x quick start Bradford dye reagent ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลทและคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่มี ปริมาณ 0, 0.5, 1, 2, 4 และ 6 ไมโครกรัม

3.5.3 การวิเคราะห์โปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Immuno blot

ทำการเตรียม 10% SDS-PAGE จากนั้นนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ มาทำการเจือจาง สารละลายโปรตีนตัวอย่างด้วย 6X protein loading buffer [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 12% (w/v) SDS, 0.06% (w/v) bromophenol blue, 60% (v/v) glycerol, 1.2 M β -mercaptoethanol] ในอัตราส่วน 5:1 และให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก่อนนำสารละลายไปหยอดลงในเจล 10% SDS-PAGE ทำการแยกโปรตีนในสารละลาย 1X Running buffer [0.0625 M Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% (w/v) SDS] โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 80 V จน Bromophenol blue tracking dye เคลื่อนที่เข้าสู่ Separating gel จึงปิดสวิทช์เครื่อง Power supply ก่อนเพิ่มความต่าง ศักย์ไฟฟ้าเป็น 100 V และให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จึงปิดสวิทช์เครื่อง Power supply แล้วย้ายแถบโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ทำการ pretreated โดยแช่ใน absolute methanol ประมาณ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่เมมเบรนใน Transfer buffer [192 mM

glycine, 25 mM Tris, 10% (w/v) methanol] ประมาณ 5 นาที โดยในการย้ายโปรตีนจะใช้กระแสไฟฟ้า ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 25 V ตลอดคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อย้ายโปรตีนลงบนเมมเบรนแล้ว นำเมมเบรนบ่มใน blocking solution ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมเขย่า จากนั้นนำเมมเบรนบ่มในสารละลาย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน เป้าหมาย โดยจะทำการวิเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย ในรูปที่ถูกเติมฟอสเฟตก่อน เมื่อครบเวลาแล้วล้างเมมเบรนด้วย TBS-T buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นบ่มด้วย secondary antibody ก่อนนำไปผ่าน ECL substrate และทำการประกบฟิล์ม X-ray หลังจากทำการประกบฟิล์ม X-ray แล้วให้นำเมมเบรนมารีโพรบ แล้วบ่มเมมเบรนด้วย blocking solution และ primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน total p38, total ERK และ total JNK

3.5.4 การรีโพรบเมมเบรน PVDF

นำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย TBS-T buffer จำนวน 1 ครั้ง นาน 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย stripping buffer [10% SDS, 2 M Tris-HCl (pH 7.4), 98 mM β -mercaptoethanol] ก่อนนำสารละลาย stripping buffer มาใช้ควรแช่ไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเอาเมมเบรนลงแช่ในสารละลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเมมเบรนมาล้างด้วย TBS-T buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที พร้อมเขย่าภาชนะใส่เมมเบรน จากนั้นจึงบ่มเมมเบรนด้วย blocking solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย primary antibody และสารละลาย secondary antibody ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

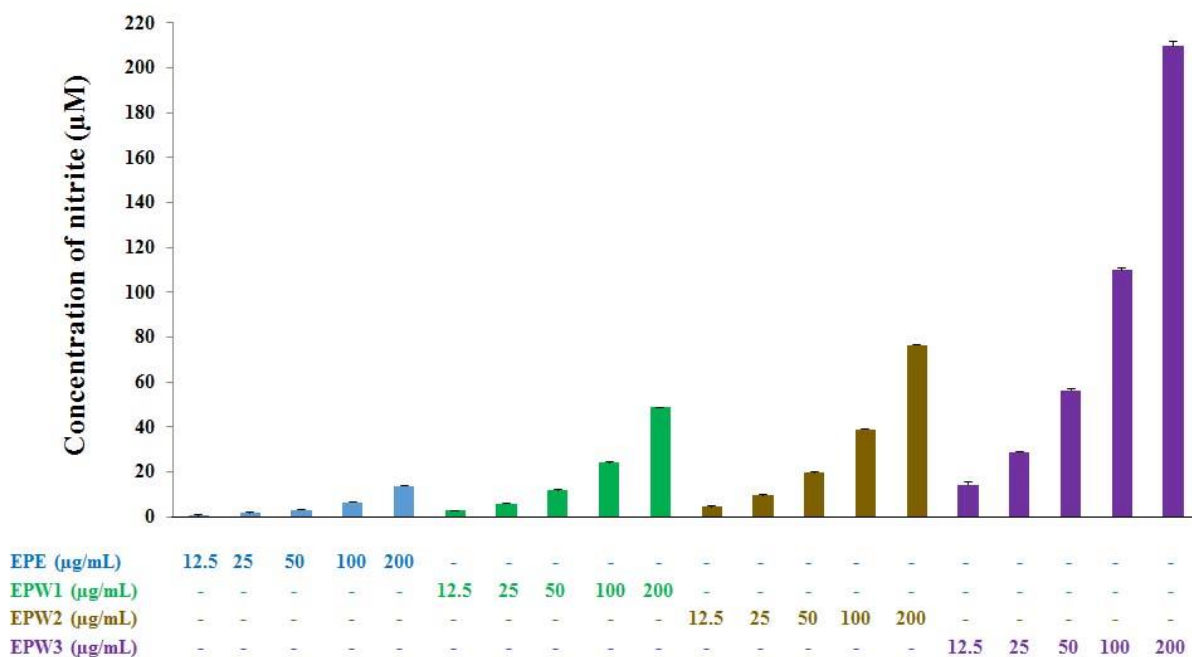
ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าเฉลี่ยเบนมาตรฐานของการทดลองอิสระต่อกันอย่างน้อยจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ซึ่งเป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยจากข้อมูลที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่มเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป โดยการใช้ one-way ANOVA วิธี Tukey (Tukey's studentized rang test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม minitap

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในส่วนสกัดจากเร่งหอม

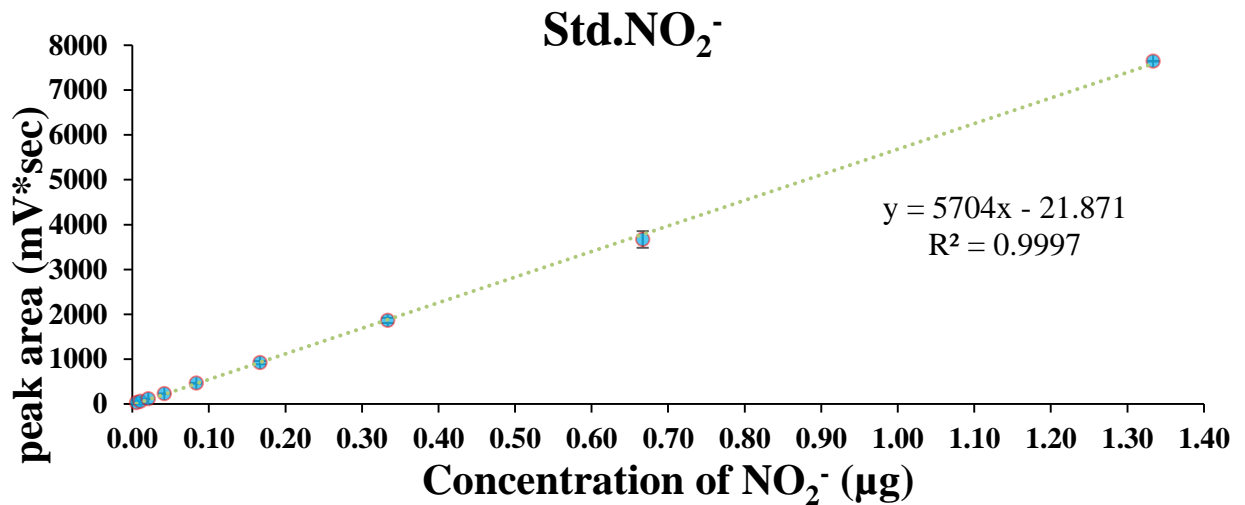
จากการศึกษาในปีที่ 1 พบว่าการเพิ่มปริมาณไนไตรท์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926 ของส่วนสกัดเอทานอล EPE อาจเกิดจากการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ eNOS โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ eNOS ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำของเร่งหอมทั้งสามส่วนสกัด มีการเพิ่มของปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำ แต่ส่วนสกัดกลับไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ eNOS และแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS ดังนั้นการศึกษาในปีที่สองนี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ไนไตรท์และไนเตรทในส่วนสกัดด้วยวิธี Griess พบว่าส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลมีไนไตรท์ในปริมาณที่แปรผันตามความเข้มข้นของส่วนสกัด ดังแสดงในภาพที่ 4-1



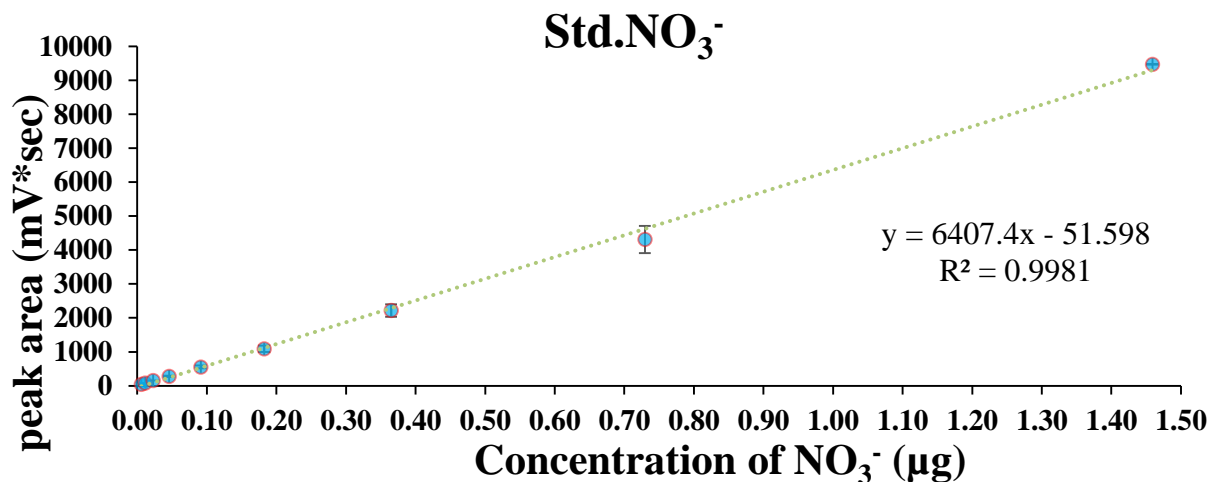
ภาพที่ 4-1 ปริมาณไนไตรท์ที่พบในส่วนสกัดจากเหง้าเร่งหอมที่วิเคราะห์โดยปฏิกิริยา Griess

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในส่วนสกัดต่างๆ เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา Griess โดยใช้เทคนิค HPLC กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ไนไตรท์และไนเตรท กับพื้นที่ใต้กราฟ แสดงในภาพที่ 4-2 และ 4-3 ผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดจากเหง้าเร่งหอมพบว่าปริมาณไนไตรท์

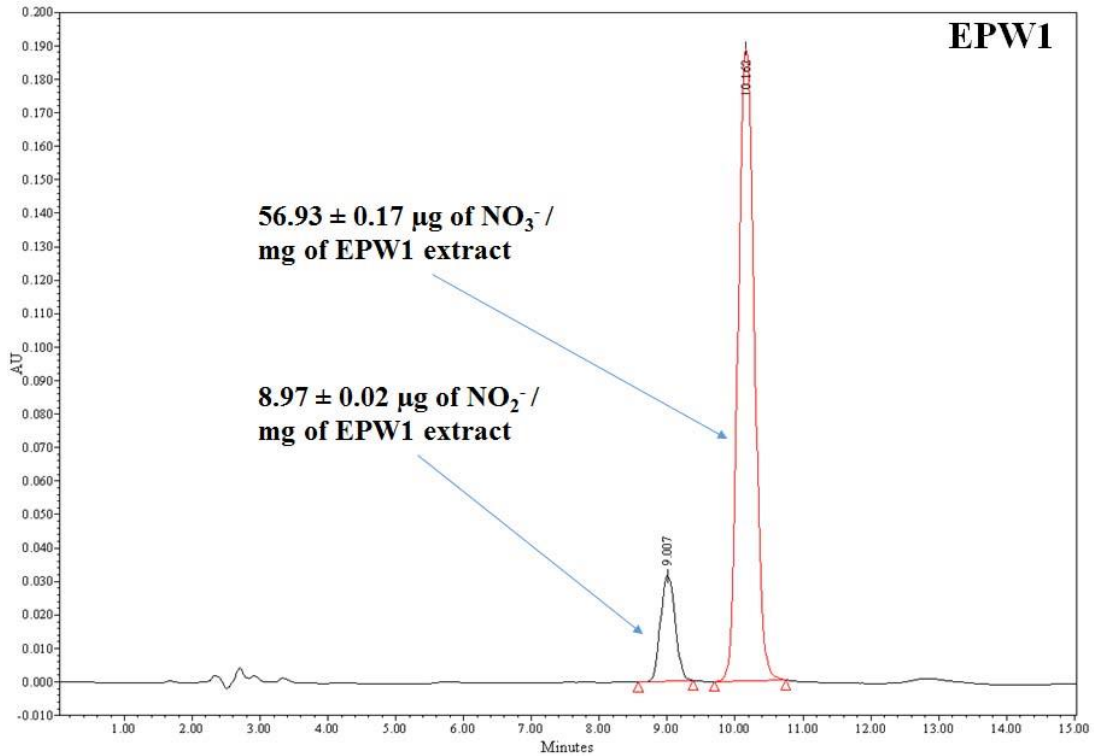
ที่พบอยู่ในช่วงระหว่าง 1.46 ± 0.08 ถึง $41.77 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{mg}$ ของส่วนสกัด และปริมาณไนเตรทที่พบอยู่ในช่วงระหว่าง 0.84 ± 0.02 ถึง $99.65 \pm 2.05 \mu\text{g}/\text{mg}$ ของส่วนสกัด แสดงในภาพที่ 4-4 ถึง 4-7 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าไนไตรท์และไนเตรทที่พบในส่วนสกัดน้ำและเอทานอลจากเหง้าเร่วหอมเอง เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อหุ้ลตลอดเลือดมนุษย์มีปริมาณสูงขึ้น



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของไนไตรท์ (NO₂⁻) ที่ปริมาณต่างๆ กับพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

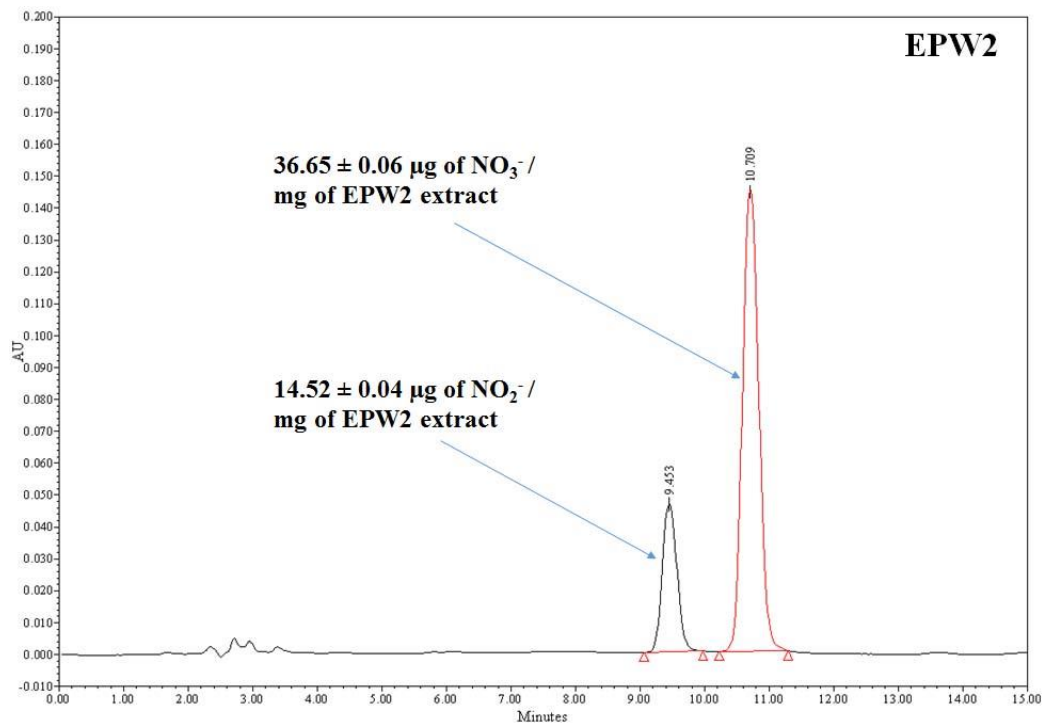


ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานของไนเตรท (NO₃⁻) ที่ปริมาณต่างๆ กับพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

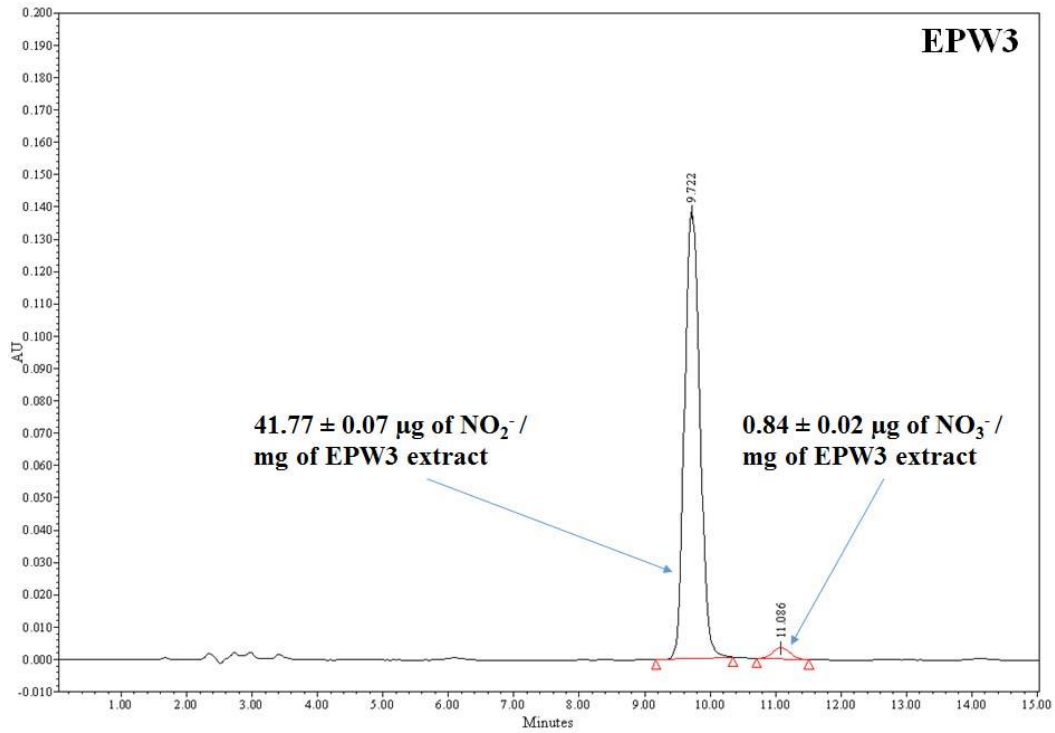


ภาพที่

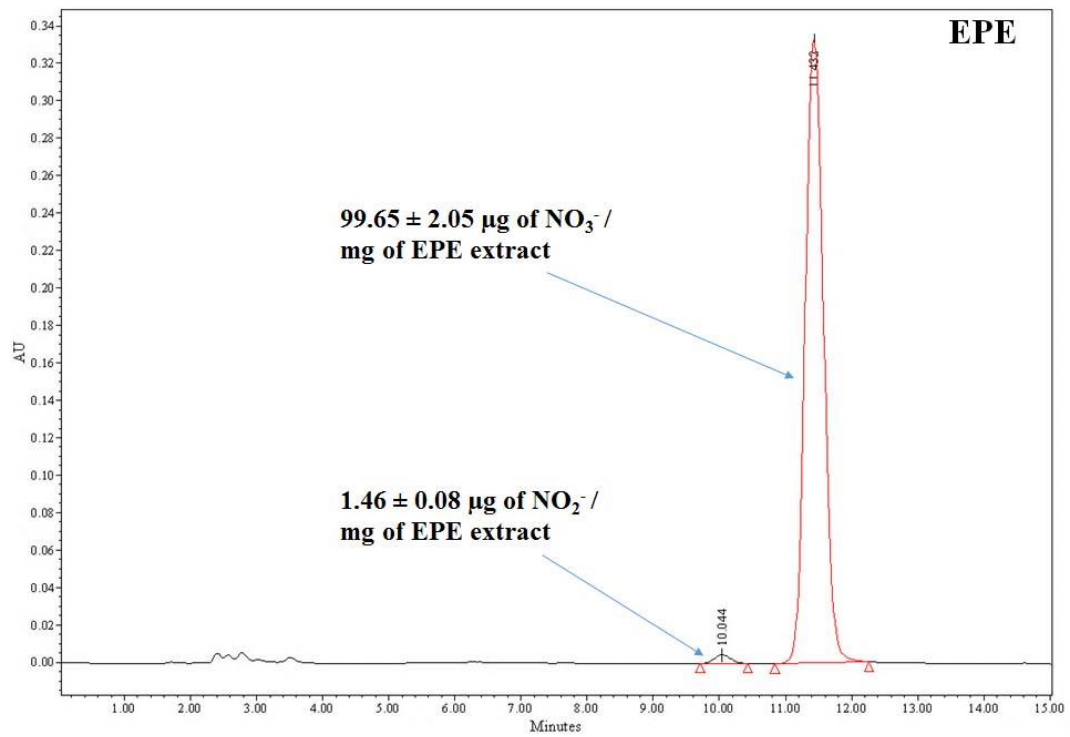
4-4 โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์ และไนเตรทในส่วนสกัด EPW1



ภาพที่ 4-5 โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์ และไนเตรทในส่วนสกัด EPW2



ภาพที่ 4-6 โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์ และไนเตรทในส่วนสกัด EPW3



ภาพที่ 4-7 โครมาโตแกรมของ HPLC ในการวิเคราะห์ไนไตรท์ และไนเตรทในส่วนสกัด EPE

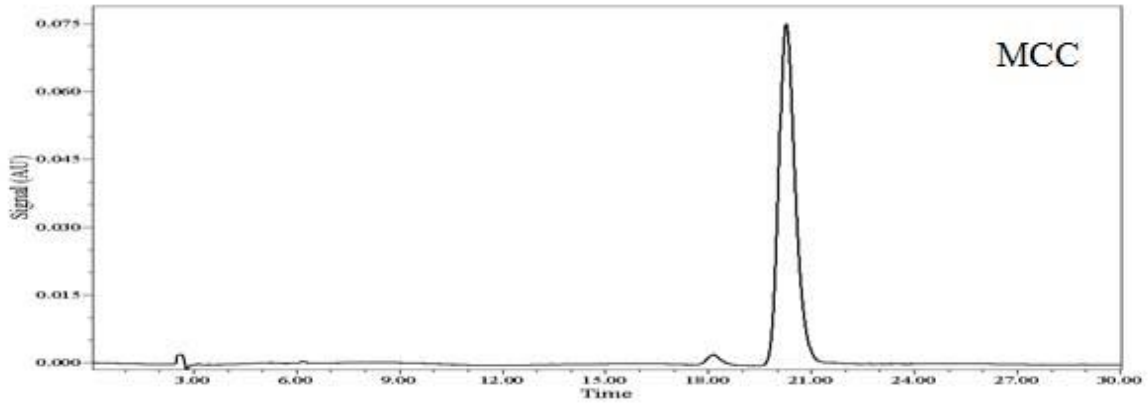
4.2 ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ MCC และ MCD ในส่วนสกัดจากเร่วหอม

จากผลการศึกษาในปีที่ 1 พบว่าส่วนสกัดเอทานอล EPE สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS และลดการอักเสบของหลอดเลือดโดยลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ของเซลล์เยื่อหลอดเลือด และจากการแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบจากส่วนสกัดเอทานอล EPE โดยวิธี bioassay-guided isolation พบสาร 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) และ trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD) ที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร MCC และ MCD ในส่วนสกัดเอทานอล EPE โดยเทคนิค HPLC สภาวะของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร MCC แสดงในตารางที่ 4-1 ส่วนโครมาโตแกรม HPLC ของ MCC และ EPE แสดงในภาพที่ 4-8 และพบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ MCC ในส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าเร่วหอม EPE มีค่าเท่ากับ 3.67 ± 0.07 mg/kg

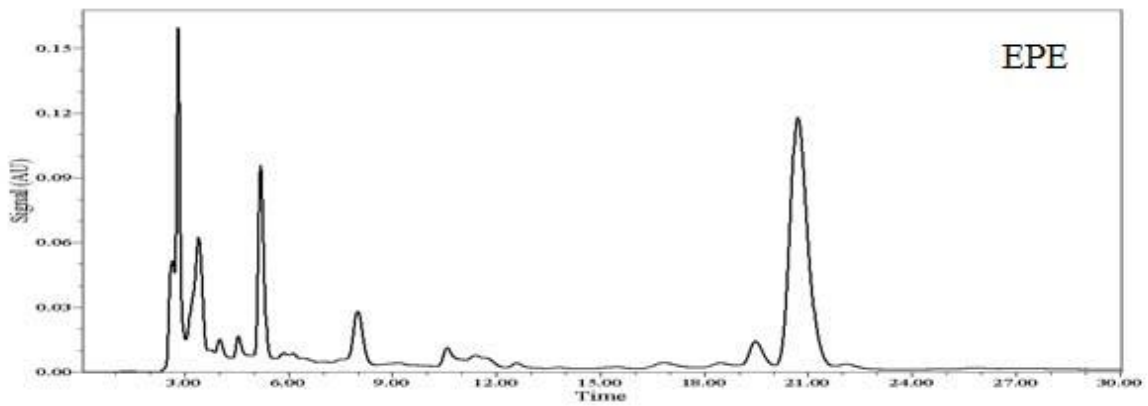
ตารางที่ 4-1 แสดงสภาวะของ HPLC ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ MCC

Model	Agilent 1260
Sample type	Crude extract
Number of repeating	3
Column	C18 (5 μ x 250 mm x 4.6 mm, 100A)
Mobile phase	MeOH : water (70:30)
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	20 μ L
Detector	DAD 190-400 nm (λ = 310 nm)
Run time	30 min

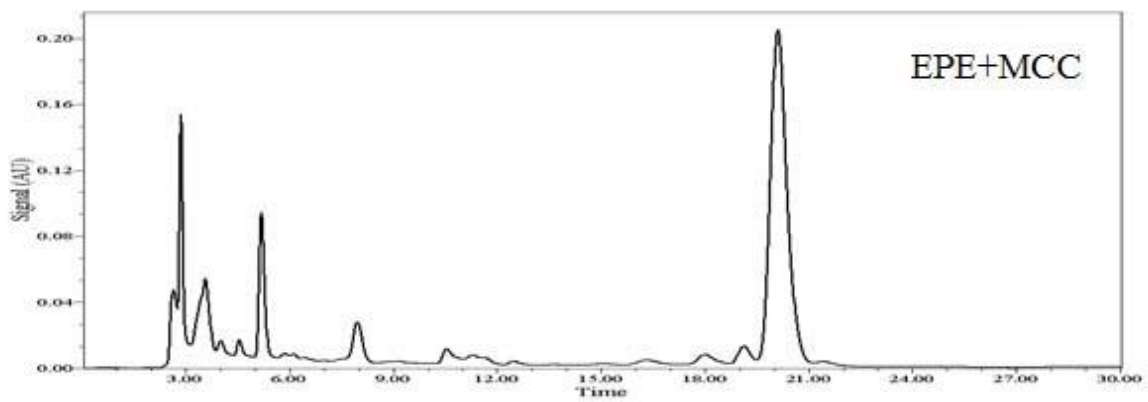
(A)



(B)



(C)



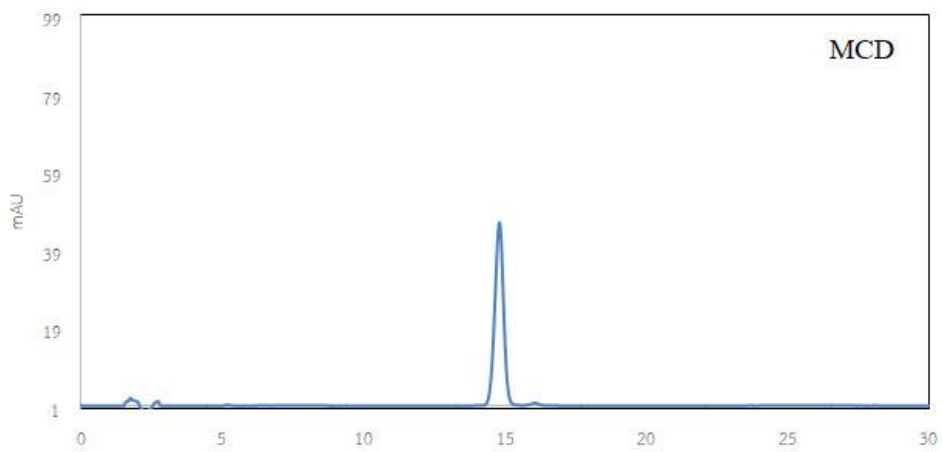
ภาพที่ 4-8 โครมาโตแกรม HPLC ของสาร MCC (A) ของส่วนสกัดเอทานอล EPE (B) และสารผสมระหว่างส่วนสกัดเอทานอล EPE กับสาร MCC (C)

เทคนิค HPLC สภาวะของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร MCC แสดงในตารางที่ 4-2 ส่วนโครมาโตแกรม HPLC ของ MCD และ EPE แสดงในภาพที่ 4-9 และพบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ MCD ในส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าเร่วหอม EPE มีค่าเท่ากับ 0.47 ± 0.04 mg/kg

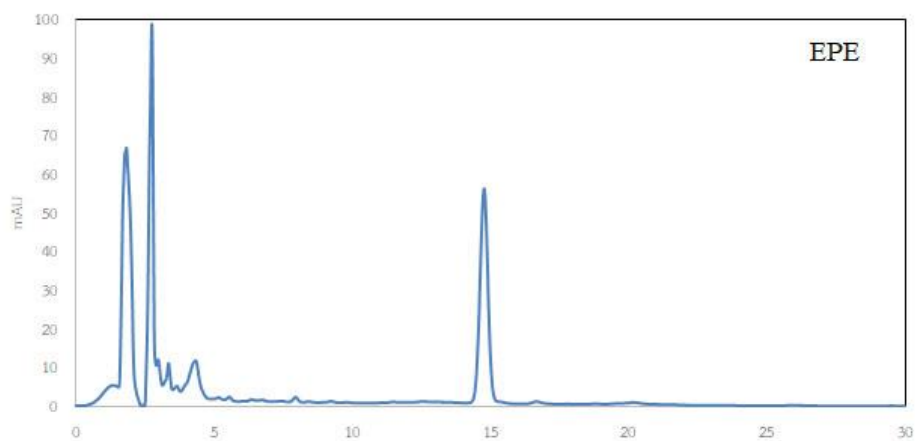
ตารางที่ 4-2 แสดงสภาวะของ HPLC ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ MCD

Model	Agilent 1260
Sample type	Crude extract
Number of repeating	3
Column	C18 (5 μ x 250 mm x 4.6 mm, 100A)
Mobile phase	ACN : Water (35:65)
Flow rate	1.2 mL/min
Injection volume	20 μ L
Detector	DAD 190-400 nm (λ = 320 nm)
Run time	30 min

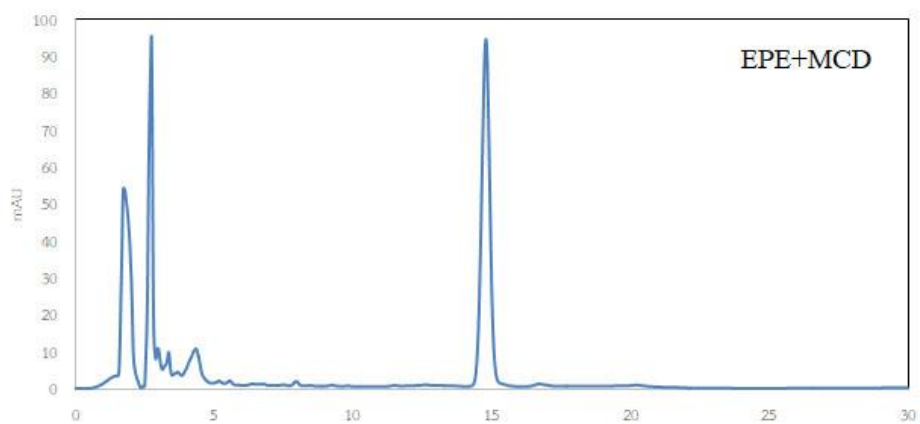
(A)



(B)



(C)

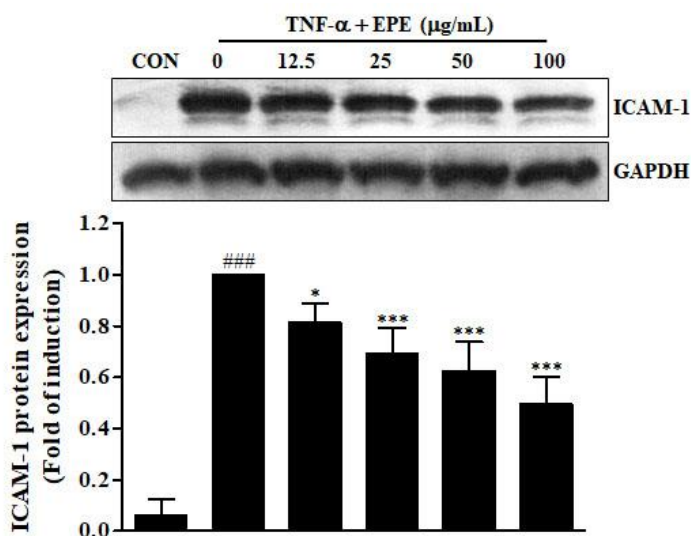


ภาพที่ 4-9 โครมาโตแกรม HPLC ของสาร MCD (A) ของส่วนสกัดเอทานอล EPE (B) และสารผสมระหว่าง ส่วนสกัดเอทานอล EPE กับสาร MCD (C)

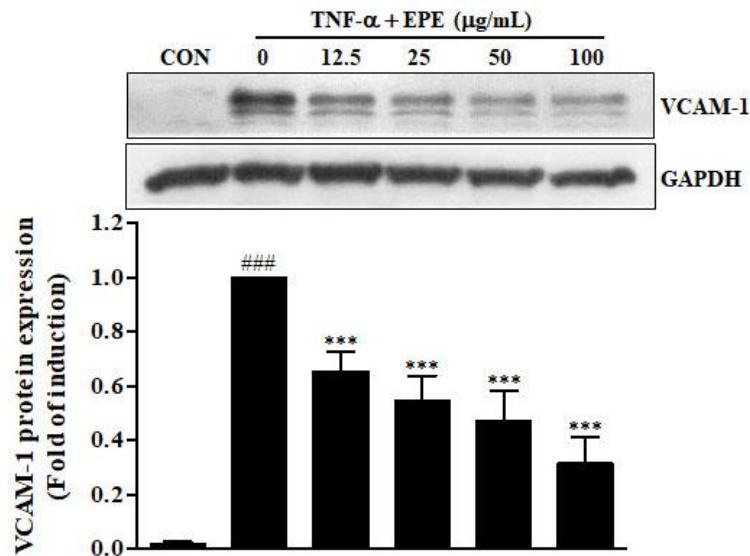
4.3 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อการแสดงออกของโปรตีน VCAM และ ICAM ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด

ปัจจัยที่ทำให้เกิด atherosclerosis ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรค CVD นอกจากเป็นผลมาจาก endothelial dysfunction ที่ให้มีปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ต่ำลง เนื่องจากมีการแสดงออกของยีน eNOS ลดลง (Li and Förstermann, 2013). อีกสาเหตุหนึ่งคือการเกิดการอักเสบภายในหลอดเลือด (Stoner et al., 2013) คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของส่วนสกัดเอทานอล EPE ต่อการแสดงออกของโปรตีน vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) และ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกบนเซลล์เยื่อหลอดเลือดในขณะที่มีการอักเสบถูกกระตุ้นการแสดงออกของโดย inflammatory 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 4-10A และ 4-10B พบว่า TNF- α สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอล EPE ที่ความเข้มข้น 12.5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่าปริมาณโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส TNF- α เพียงอย่างเดียว โดยที่ส่วนสกัดเอทานอล EPE สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 ได้มากกว่าโปรตีน ICAM-1

(A)



(B)

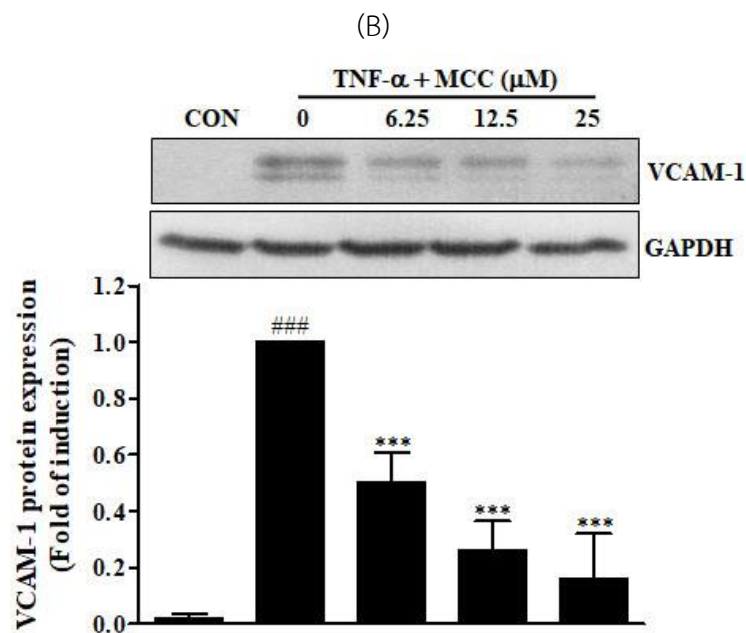
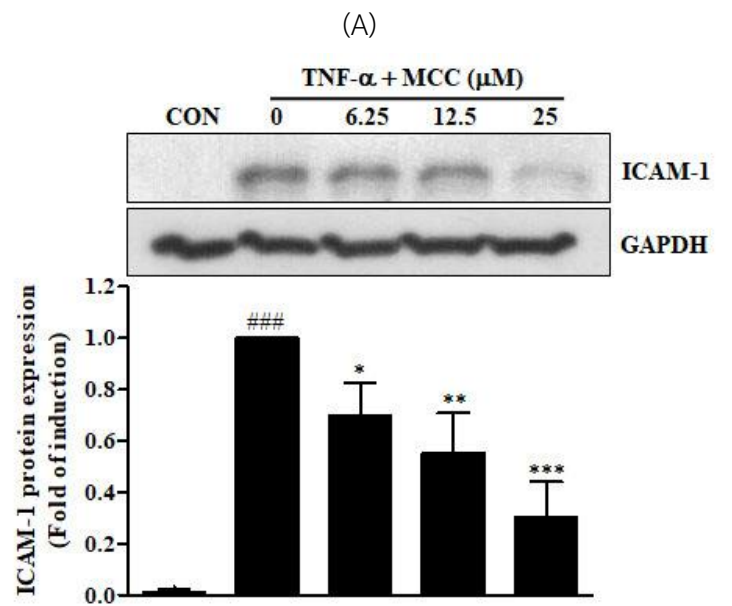


ภาพที่ 4-10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 โดยวิธี Western blot ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเหนี่ยวนำโดย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ภาพที่แสดงเป็นตัวแทนของการทำ Western blot จำนวน 3 ครั้ง กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำ (Fold of induction) ของโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) หลังจาก normalized ด้วย GAPDH ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน ####p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม *p < 0.05, ***p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α เพียงอย่างเดียว

4.4 ผลของสาร MCC และ MCD ต่อการแสดงออกของโปรตีน VCAM และ ICAM ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด

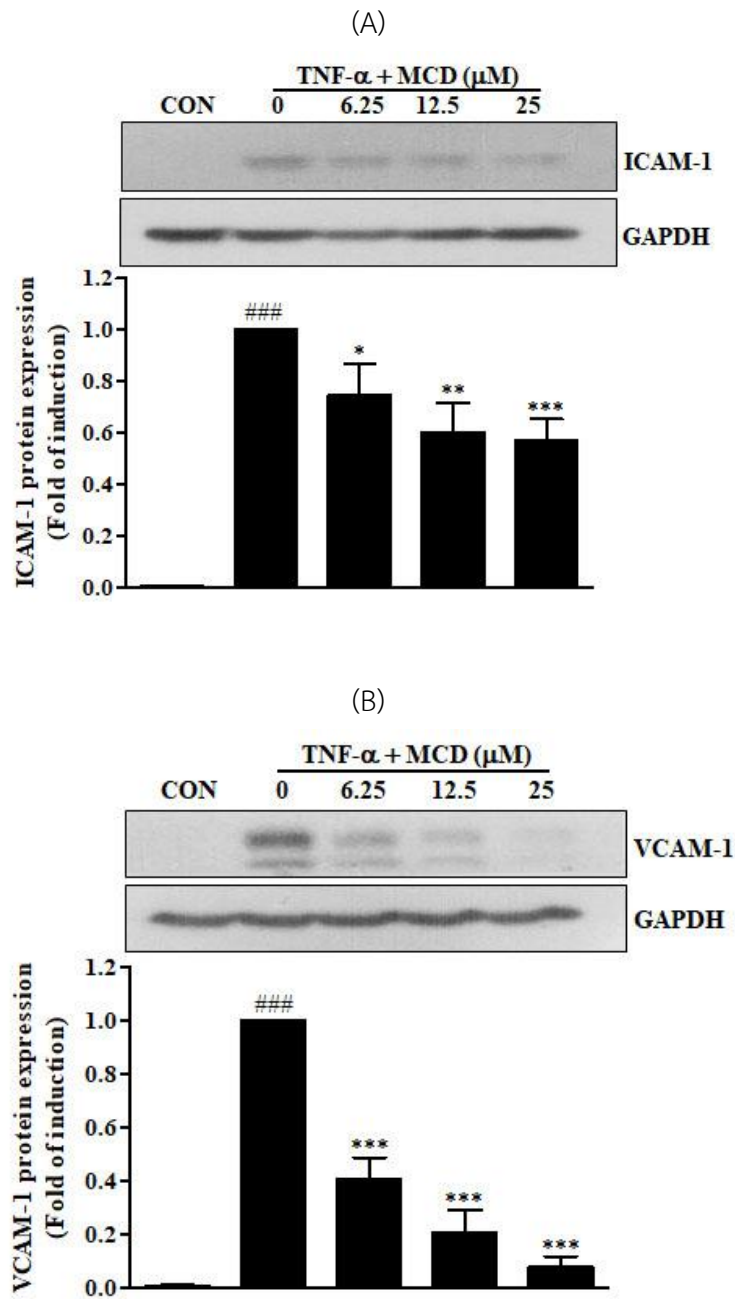
ทำการศึกษาผลของสาร MCC และ MCD ต่อการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 พบว่าสาร MCC และ MCD สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส TNF- α เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-11 และ 4-12) โดยสาร MCC และ MCD นี้เป็นสารที่พบในเหง้าเร่งหอมจากการยืนยันโดยเทคนิค HPLC ดังภาพที่ 4-8 และ 4-9 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาโดย Srisook et al. (2017) ที่พบว่าส่วนสกัดเอทานอล EPE มีฤทธิ์ยับยั้งการ

อักเสบในแมโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS และยังพบว่าสารออกฤทธิ์ต้านอักเสบที่แยกได้จาก EPE คือ สาร MCC และ MCD



ภาพที่ 4-11 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ MCC และ TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำของโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน ###p <

0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม *p < 0.05, **p < 0.01 และ ***p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α เพียงอย่างเดียว

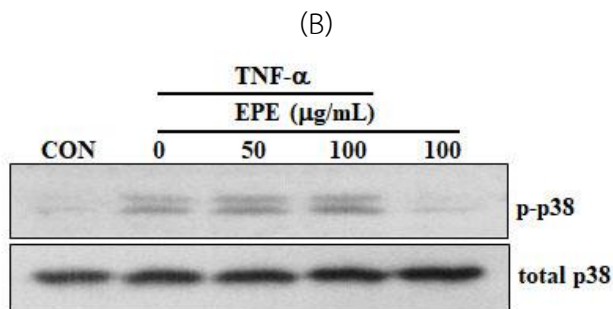
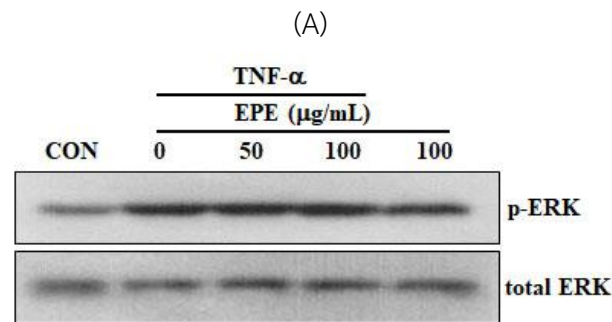


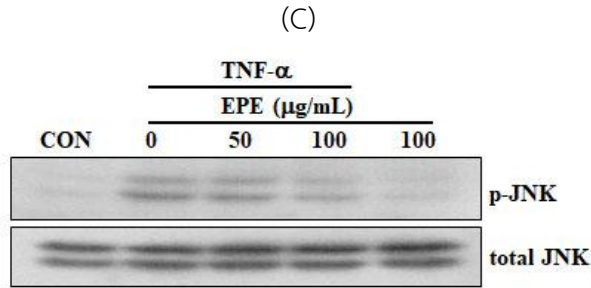
ภาพที่ 4-12 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ MCD และ TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กราฟแสดงจำนวนเท่าของการเหนี่ยวนำของโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน ###p <

0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม *p < 0.05, **p < 0.01 และ ***p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α เพียงอย่างเดียว

4.5 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อการกระตุ้นวิถี MAPKs ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

ในการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 โดยการกระตุ้นด้วย TNF- α เกิดผ่านวิถีสัญญาณ MAPKs ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากเร่วหอม EPE สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัส TNF- α เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4-11 และ 4-12) TNF- α ทำให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ ERK, p38 และ JNK โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ทั้งสาม ทำให้มีปริมาณ p-ERK, p-p38 และ p-JNK เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด ส่วนสกัด EPE ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ไม่สามารถลดปริมาณ p-ERK และ p-p38 ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α แต่ส่วนสกัด EPE ลดปริมาณ p-JNK ได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ TNF- α (ภาพที่ 4-13)

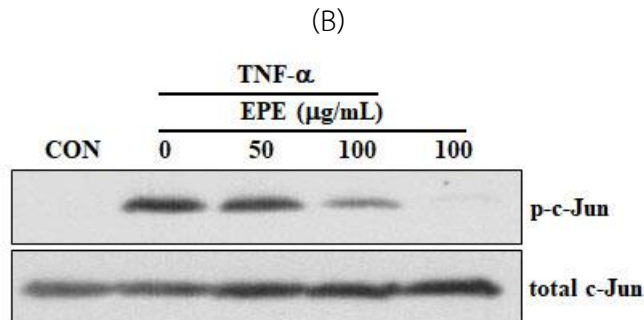
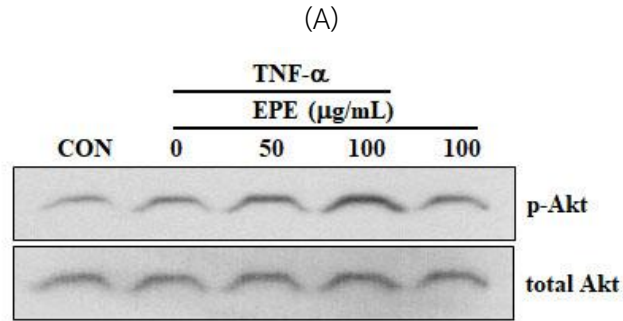




ภาพที่ 4-13 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-ERK (A), p-p38 (B) และ p-JNK (C) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เป็นเวลา 30 นาที

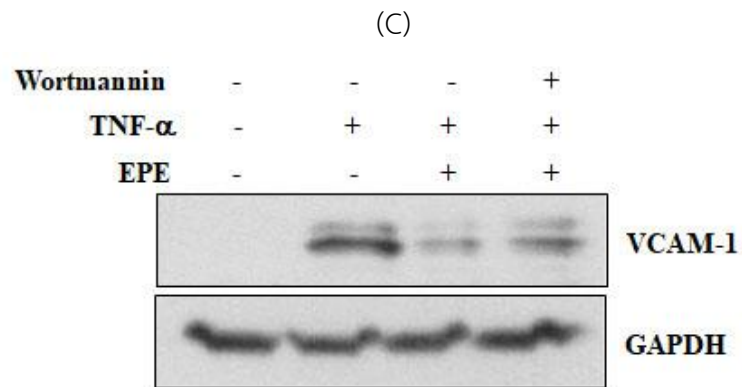
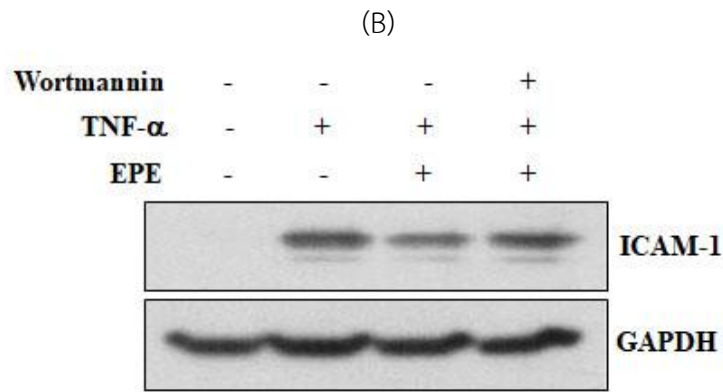
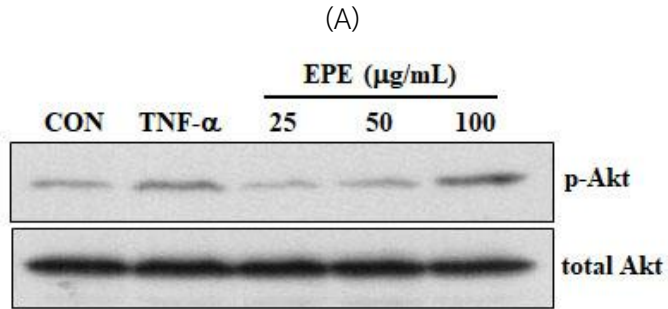
4.6 ผลของส่วนสกัดจากเร่วหอมต่อปริมาณโปรตีน p-Akt และ p-c-Jun ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

ในการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 นอกจากเกิดผ่านวิถีสัญญาณ MAPKs ยังเกิดผ่านวิถี Akt โดยเอนไซม์ Akt กระตุ้นให้เกิดการฟอสโฟรีเลชันบน c-Jun ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ transcription factor AP-1 (Manning and Cantley, 2007) จากการศึกษาพบว่า TNF- α ทำให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ Akt โดยเพิ่มการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ Akt ทำให้มีปริมาณ p-Akt เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด ส่วนสกัด EPE ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ สามารถเพิ่มปริมาณ p-Akt ได้เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ TNF- α (ภาพที่ 4-14A) แต่ในขณะที่ส่วนสกัด EPE ลดการฟอสโฟรีเลชันบน c-Jun (p-c-Jun) (ภาพที่ 4-14B)



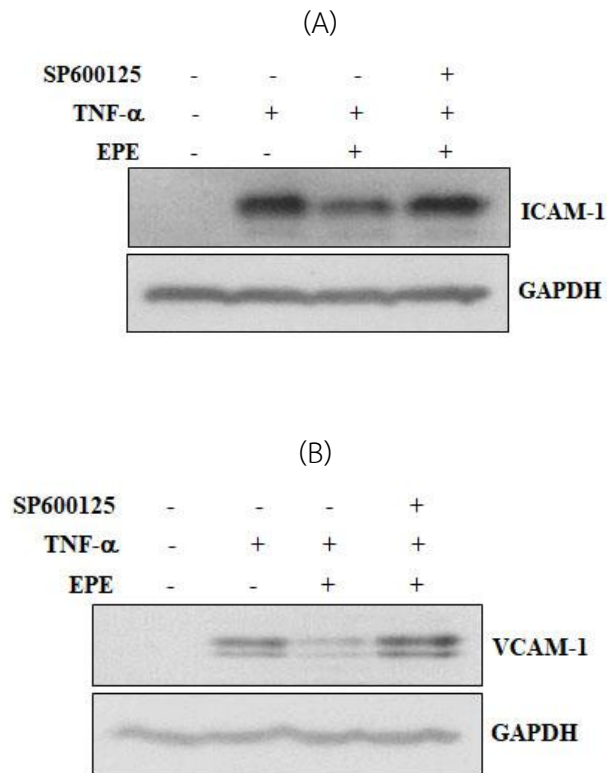
ภาพที่ 4-14 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-Akt (A) และ p-c-Jun (B) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ที่สัมผัสกับ EPE เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เป็นเวลา 30 นาที

มีการรายงานถึงความเกี่ยวข้องของ Akt กับการอักเสบที่เกิดขึ้นในสองลักษณะ คือ ทั้งลดและกระตุ้นปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการอักเสบ (Guha and Mackman, 2001; Zong et al., 2012) เราจึงลองให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัด EPE เพียงอย่างเดียว พบว่ามีปริมาณ p-Akt เพิ่มขึ้นในลักษณะที่แปรผันตามความเข้มข้นของส่วนสกัด EPE แสดงถึงว่าส่วนสกัด EPE กระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไทม์ Akt แต่ลดปริมาณ p-c-Jun ดังนั้นเราจึงลองทดสอบโดยการยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันบน Akt โดยใช้ Wortmannin ซึ่งเป็นสาร Akt/PI3K inhibitor พบว่าส่วนสกัด EPE ทำให้ปริมาณ ICAM-1 และ VCAM-1 ลดลง แต่การยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันบน Akt โดย Wortmannin ทำให้ปริมาณ ICAM-1 และ VCAM-1 เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 4-15)



ภาพที่ 4-15 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน p-Akt ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE เป็นเวลา 30 นาที (A) และปริมาณโปรตีน ICAM-1 (B) และ VCAM-1 (C) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE และ Wortmannin

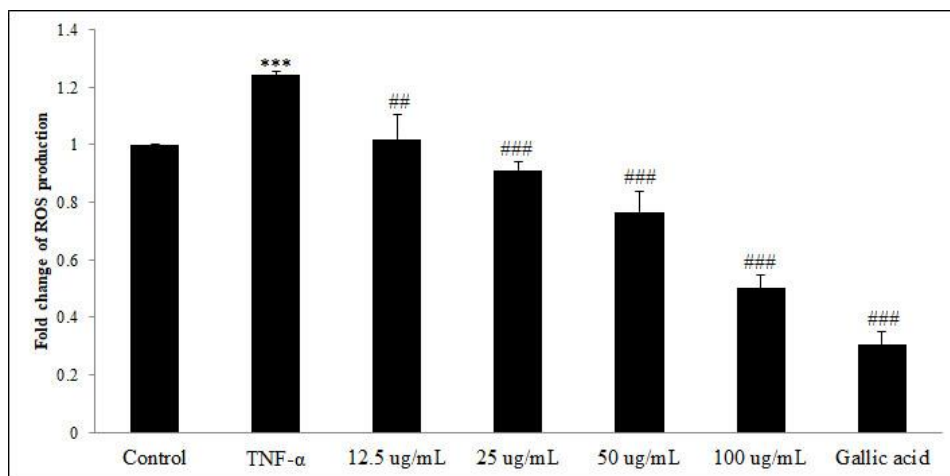
นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบยับยั้งการฟอสโฟริเลชันบนเอนไซม์ JNK โดยเซลล์ที่สัมผัสกับสาร EPE ร่วมกับ SP600125 (JNK inhibitor) พบว่าปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α และ EPE



ภาพที่ 4-16 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (A) และ VCAM-1 (B) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่สัมผัสกับ EPE และ SP600125

4.7 ผลการกำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด EA.hy 926 ของส่วนสกัดจากเร่วหอม

จากผลการศึกษาในปีที่ 1 ส่วนสกัด EPE สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ดังนั้นเราจึงทำการศึกษาผลของส่วนสกัด EPE ต่อปริมาณ intracellular ROS จากผลในภาพที่ 4-17 พบว่า TNF- α เพิ่มการสังเคราะห์ intracellular ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ส่วนสกัด EPE สามารถลดปริมาณ intracellular ROS ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด EPE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 4-17 การยับยั้งปริมาณ intracellular ROS โดย EPE เซลล์เยื่อหลอดเลือดสัมผัสกับ EPE (12.5-100 $\mu\text{g/mL}$) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเหนี่ยวนำโดย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณ intracellular ROS โดย H₂DCF-DA probe ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TNF- α เพียงอย่างเดียว

จากผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลไกอีกทางหนึ่งที่ส่วนสกัดเอทานอล EPE มีบทบาทในการช่วยป้องกันการเกิด atherosclerosis โดยเกิดผ่านการลดการอักเสบของเซลล์เยื่อหลอดเลือดโดยลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ทำให้ลดการจับกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวกับเซลล์เยื่อหลอดเลือด นำไปสู่การลดการเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบ นอกจากนี้ส่วนสกัดเอทานอล EPE ยังสามารถลดปริมาณ intracellular ROS ได้ซึ่งเป็นอีกปัจจัยที่ทำให้ NO bioavailability เพิ่มขึ้น สารชนิดที่แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อหลอดเลือดนี้ คือ สาร MCC และ MCD ดังนั้นข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัด EPE อาจป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง โดยการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ และโดยการยับยั้งการเกิดการอักเสบของหลอดเลือด ดังนั้นส่วนสกัดของเร่วหอมนี้อาจถูกนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อใช้รักษา และป้องกันโรค CVDs

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE และส่วนสกัดน้ำ EPW1, EPW2 และ EPW3 มีไนโตรทและไนเตรทในปริมาณที่แปรผันตามความเข้มข้นของส่วนสกัด
2. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น
3. สารในส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อหลอดเลือด คือ 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) และ trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD)
4. สาร MCC และ MCD สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น
5. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถลดการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ JNK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่ลดการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ ERK และ p-38 MAPKs ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α
6. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันบนเอนไซม์ pAkt แต่ลดการฟอสโฟรีเลชันบน c-Jun ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
7. ส่วนสกัดเอทานอลของเร่วหอม EPE สามารถลดปริมาณ intracellular ROS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดเอทานอล EPE มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์เยื่อหลอดเลือด การเพิ่มปริมาณไนโตรทในเซลล์เยื่อหลอดเลือด EA.hy 926 ของส่วนสกัดเอทานอล EPE ซึ่งอาจเกิดจากกลไกอย่างน้อยสองทาง คือ ส่วนสกัด EPE เพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์ โดยอาจเกิดจากส่วนสกัด EPE ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ eNOS และลดปริมาณ intracellular ROS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด อีกกลไกหนึ่งอาจเป็นผลจากการที่ส่วนสกัด EPE สามารถลดการอักเสบของหลอดเลือดโดยลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 ของเซลล์เยื่อหลอดเลือด ผ่านการยับยั้งวิถีสัญญาณ JNK และ Akt/AP-1 สารที่เป็นองค์ประกอบในส่วนสกัดเอทานอล EPE และเป็นสารออกฤทธิ์ในการลดการอักเสบ คือ 4-methoxycinnamyl p-coumarate (MCC) และ trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD)

นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาที่ส่วนสกัดน้ำของเร่วหอมสามารถเพิ่มปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อหลอดเลือดที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำ แต่ส่วนสกัดกลับไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ eNOS และแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดน้ำจากเร่วหอมมีไนไตรท์ในส่วนสกัดเอง ผลที่ได้ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดของเร่วหอมโดยเฉพาะส่วนสกัดเอทานอล EPE มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ป้องกันการเกิด atherosclerosis และช่วยลดความดันโลหิต เป็นการประหยัดงบประมาณและนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหง้าเร่วหอมอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นพิษของส่วนสกัดของเร่วหอมในสัตว์ทดลองต่อไป

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: บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. 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.kehakaset.com/index.php?option=com_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38. สืบค้นวันที่ 26 กันยายน 2554.
- ศกวรรณ แก้วกลิ่น และ นิตยา พันธุ์เวทย์. (มปป) ประเด็นรณรงค์วันหัวใจโลก ปี พ.ศ. ๒๕๕๔. สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออกเฉียงใต้. 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. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284: R1-R12.

- Forstermann U, and Sessa W. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33, 829–837
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. (1986). 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*. 237:893–900.
- Koltermann A, Hartkorn A, Koch E, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. (2007). Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 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. (2002). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 7: 132–147.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15:323-350.
- Manning, B.D., Cantley, C.L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129, 1261-1274.
- 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.
- Srisook, E., Palachot, M., Mankhong, S., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacogn. Mag*. 13, s230-s235.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Völler N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Förstermann U, Li H. (2007). Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.)

- upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 195: 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. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 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. (2007). *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 559–562.
- Xia, N., Förstermann, U., Li, H. (2014). Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 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. (2002). Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 109: 817–826.
- Zong, Y., Sun, L., Liu, B., Deng, Y-S., Zhan, D., Chen, Y-L., He, Y., Liu, J., Zhang, Z-J., Sun, J., Lu, D. (2012). Resveratrol Inhibits LPS-Induced MAPKs Activation via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Murine RAW 264.7 Macrophage Cells. *PLoS One*. 7, 1-13.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ผลงานวิจัยบางส่วนกำลังอยู่ในขั้นตอนเตรียมบทความเพื่อเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
ดังนี้ Klaokwan Srisook, Ekaruth Srisook, Kamonporn Potiprasat and Titiporn Thongyen.
Protective effect of rhizome extract from *Etlingera pavieana* in TNF- α induced human endothelial cells. Molecular Nutrition & Food Research (Manuscript in preparation).
2. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่าของเร่วหอมที่เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของภาคตะวันออก นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของชุมชนในภาคตะวันออกของไทย

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย :

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

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

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเคมีของอนุมูลอิสระ อณูชีววิทยา 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

Surisa Tuengpanya, Chantana, C., Uthaiwan Sirion, Wipada Siritanyong, **Klaokwan Srisook**, Jaray Jaratjaroonphong. (2018). One-pot solvent-free synthesis of triaryl- and triheteroarylmethanes by Bi(OTf)₃-catalyzed Friedel-Crafts reaction of arenes/heteroarenes with trialkyl orthoformates. *Tetrahedron*, (In Press).

- Klaokwan Srisook***, Sarinporn Udompong, Petchrat Sawai, Thitiporn Thongyen. (2018). *Etlingera pavieana* rhizome extract decreases oxidative stress and activates eNOS activity via stimulation of Akt phosphorylation in human endothelial cells. *Naresuan Phayao Journal*, 11(1), 23-28.
- Athit Pipattanawarothai, Chomchai Suksai, **Klaokwan Srisook**, Thanida Trakulsujaritchok. (2017). Non-cytotoxic hybrid bioscaffolds of chitosan-silica: Sol-gel synthesis, characterization and proposed application. *Carbohydrate Polymers*, 178, 190-199.
- Ekaruth Srisook, Mullika Palachot, Sakulrat Mankhong, **Klaokwan Srisook*** (2017). Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacognosy Magazine*, 13, 50, s230-235.
- Sarinporn Udompong, Sakulrat Mankhong, Jaray Jaratjaroonphong, **Klaokwan Srisook*** (2017). Involvement of p38 MAPK and ATF-2 signaling pathway in anti-inflammatory effect of a novel compound bis[(5 -methyl)2 -furyl](4 -nitrophenyl)methane on lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology*, 50, 6-13.
- Sakulrat Mankhong, Ekaruth Srisook, **Klaokwan Srisook***. (2017). Anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes in lipopolysaccharide-induced macrophages. *NU. International Journal of Science*, 14(2), 58-66.
- 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 isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves *Journal of Ethnopharmacology*. 165; 94-102
- Jaray Jaratjaroonphong, Surisa Tuengpanya, Rungnapha Saeeng, Sarinporn Udompong, **Klaokwan Srisook**. (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.

Doungnapa Buapool, Nadtaya Mongkol, Jirapa Chantimal, Sittiruk Roytrakul, Ekaruth Srisook, **Klaokwan Srisook*** (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.

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.

Klaokwan Srisook*, Mullika Palachot, Nadtaya Mongkol, Ekaruth Srisook and Songklod Sarapusit. (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.
- สุพิศตรา ทองทา, เพชรรัตน์ ไสว, **กล่าวขวัญ ศรีสุข***. (2560). การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของแตงโมบางสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22: 14-22.
- ชมพูนุช อุทัยรัตน์, เอกรัฐ ศรีสุข, **กล่าวขวัญ ศรีสุข**. (2560). ผลของสภาวะต่างๆ ของการอบแห้งและการสกัดต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลปอกกะบิต. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 151-165.
- ชมัยพร รอดกลิ่น, เอกรัฐ ศรีสุข, **กล่าวขวัญ ศรีสุข**. (2560). ผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 211-225.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข**, สาวินีย์ สีมานันท์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา ทริมเพ็ง และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19: 304-311.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข***, ปรีดาวรรณ สาลี, เขียวลักษณ์ เจริญสุข และ เอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2 :143-150.
- Klaokwan Srisook***, Nopporn Sarataphan., Kosum Chansiri. (2005). Detection of *Babesia bovis* in cow blood by PCR-ELISA. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 10: 49-57.

Proceedings

- Titiporn Thongyena, **Klaokwan Srisook***, Petcharat Sawaia, Ekaruth Srisook. (2017). Antioxidant and eNOS activating activities of ED-BUU-BF4, new Thai herbal formulation, in endothelial EA.hy926 cells. The proceedings in the 2nd International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM2017). pp. 173-179., January 25-27, 2017.
- Wipada Siritanyong, Jaray Jaratjaroonphong and **Klaokwan Srisook***. (2017). Nitric oxide inhibitory activity of selected fluorinated triarylmethane derivatives in LPS-activated RAW 264.7 macrophage. The proceedings in the Pure and Applied Chemistry International Conference 2017 (PACCON 2017). pp. 944-949., February 2-3, 2017
- 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 ICSCS Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok:The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCS) 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 9^h 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 :

1. ชื่อ นายเอกรัฐ ศรีสุข
Mr. Ekaruth Srisook
2. ตำแหน่ง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. 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

Srisook, E.*, Palachot, M., Mankhong, S., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacognosy Magazine*, 13(50), 230-235.

Boonruang S, Prakobsri K, Pouyfung P, **Srisook E**, Prasopthum A, Rongnoparut P, Sarapusit S. (2017). Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Pluchea indica* and *Vernonia cinerea*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 1136-1142.

Sakulrat Mankhong, **Ekaruth Srisook**, Klaokwan Srisook. (2017). Anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes in lipopolysaccharide-induced macrophages. *NU. International Journal of Science*, 14(2), 58-66.

Jang, KS., Shin, DS., **Srisook, E.**, Song, HC., Chi, DY. (2017) Versatile functionalization of electron rich-fused heterocyclic arenes via electrophilic aromatic addition reaction and their applications. *Tetrahedron*, 72(33), 5106-5114.

- 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
- 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, **Ekarath 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.
- ชมพูช อุทัยรัตน์, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2560). ผลของสภาวะต่างๆ ของการอบแห้งและการสกัดต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลปอกกะปิต. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 151-165.
- ชัยพร รอดกลิ่น, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2560). ผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 211-225.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กาญจนา ทริมเพ็ง และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19: 304-311.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ **เอกรัฐ ศรีสุข**. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2 :143-150.
- Ninted, S.; Pulasaka, W.; Duangkaew, P.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2017) Inhibition of pig (*Sus domesticus*) brain monoamine oxidase enzymes by some Thai herbal extracts. *Burapha Science Journal*, 22(2), 153-162.

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

Proceedings

Titiporn Thongyena, Klaokwan Srisook, Petcharat Sawaia, **Ekaruth Srisook**. (2017). Antioxidant and eNOS activating activities of ED-BUU-BF4, new Thai herbal formulation, in endothelial EA.hy926 cells. The proceedings in the 2nd International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM2017). pp. 173-179., January 25-27, 2017.

lawsipo, P.; **Srisook, E.**; Ponglikitmongkolc, M; Somwang, T; Singaed, O. (2016) Anti-cancer effect of *Etingera pavieana* rhizome extracts. The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6), 274-278.

Prakobsri, K.; Puangdee, T.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2016) Inhibition Effect of the Ethyl Acetate fraction from *Aidia wallichina* sensu Trivong Root Extract on Cytochrome P4502A6 Enzyme Proceedings of The 8th Thailand-Japan International Academic Conference 2016, 137-141.

Boonruang, S.; Khamman, J.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2016) Inhibition Effect of the Hexane fraction from *Aidia wallichina* sensu Trivong Root Extract on Cytochrome P4502A6 Enzyme. Proceedings of The 8th Thailand-Japan International Academic Conference 2016, 142-146.

Wongsri, T.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2016) Inhibitory activity of some medicinal folk plants from Chantaburi Province on the cytochrome P450 3A4 enzyme. Proceedings of The 8th Thailand-Japan International Academic Conference 2016, 131-136.

Wilailuck Leamklang; **Srisook, E.**; Petchlert, C. (2015) Total Phenolic Content and Antioxidant Activities from *Barrington augusta* Kurz. Leaf Extracts 7th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 34-42.

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).

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. (2011). Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxideproduction 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.

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*.

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.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2559A10802161 สัญญาเลขที่ 76/2559
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

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

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 13 กรกฎาคม 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 10 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	297,000	บาท	เมื่อวันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2559
งวดที่ 2 (40%)	237,600	บาท	เมื่อวันที่ 4 กรกฎาคม 2559
งวดที่ 3 (10%)	59,400	บาท	เมื่อวันที่ ยังไม่ได้รับ
รวม	594,000	บาท	

รายรับ

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1 ค่าตอบแทน			
- นักวิจัย	59,400.-	0.-	59,400.-
- นิสิตผู้ช่วยวิจัย	83,700.-	64,260.-	19,440.-
2 ค่าจ้างเหมา	30,000.-	53,800.-	-23,800.-
3 ค่าวัสดุ	344,400.-	417,801.5	-73,401.5
4 ค่าใช้สอย	76,500.-	0.-	76,500.-
5 ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6 ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	-	-	-

รวม	594,000.-	535,861.5	58,138.5
-----	-----------	-----------	----------

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาส่วนสกัดน้ำจากเหง้าเร่วหอมเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพ (Development of *Etlingera pavieana* water extract as health care products) รหัสโครงการ 181713 / สัญญาเลขที่ 76/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 660,000 บาท (หกแสนหกหมื่นบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 10 เดือน (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 13 กรกฎาคม 2561)

บทคัดย่อ: ความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (CVDs) ภาวะหลอดเลือดแข็งเกี่ยวข้องกับ endothelial dysfunction ที่เป็นผลให้มีชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์น้อยลง และจัดเป็นโรคของการอักเสบเรื้อรัง ในปัจจุบันพบว่าส่วนสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถป้องกันภาวะหลอดเลือดแข็งได้โดยการเพิ่มชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์ รวมทั้งลดภาวะเครียดออกซิเดชัน และการอักเสบ ผลการศึกษาของเราก่อนหน้านี้พบว่าไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำ (EPW1 EPW2 and EPW3) และส่วนสกัดเอทานอลจากเหง้าเร่วหอม (EPE) มีปริมาณเพิ่มขึ้นในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ส่วนสกัด EPE สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด ในขณะที่ส่วนสกัดน้ำทั้งหมดไม่ของเร่วหอมไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ในการศึกษาวิเคราะห์ส่วนสกัดทั้งหมดจากเร่วหอม ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าส่วนสกัดเองมีไนไตรท์และไนเตรทเป็นองค์ประกอบ

ส่วนสกัดเอทานอล EPE ยังสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนที่ตอบสนองต่อการอักเสบ ได้แก่ vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) และ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น นอกจากนี้ส่วนสกัด EPE สามารถยับยั้งการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ JNK แต่ไม่มีผลต่อ ERK และ p38 MAPK ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด ส่วนสกัด EPE ยังเพิ่มระดับ phosphorylated Akt (Ser473) การแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่บ่มกับสาร wortmannin ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ Akt/PI3K และสาร SP600125 ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ JNK และส่วนสกัด EPE เรายังพบว่าสารในส่วนสกัด EPE ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดเลือด คือ สาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate (MCC) และ trans-4-methoxycinnamaldehyde (MCD) สาร MCC และ MCD ลดการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 และ ICAM-1 นอกจากนี้ยังทำการทดสอบผลของส่วนสกัด EPE ต่อการผลิต ROS ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดที่ถูก

เหนี่ยวนำด้วย TNF- α โดย H₂DCF-DA probe ส่วนสกัด EPE ยับยั้งการผลิต ROS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอมสามารถเพิ่มชีวปริมาณของไนตริกออกไซด์ โดยผ่านการยับยั้งการเกิดความเครียดจากออกซิเดชัน และการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS รวมทั้งลดการอักเสบในหลอดเลือดผ่านวิถีสัญญาณ JNK และ Akt ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด ดังนั้นส่วนสกัดของเร่วหอมนี้อาจถูกนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อใช้ป้องกันภาวะหลอดเลือดแข็ง

ผลผลิตของโครงการ: ผลของการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้คือ กลไกการลดการอักเสบในหลอดเลือดของส่วนสกัดจากเหง้าเร่วหอม และสารในเร่วหอมที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดเลือด คือ สาร 4-methoxycinnamyl 4-coumarate และ trans-4-methoxycinnamaldehyde ซึ่งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้นี้เป็นข้อมูลที่จะนำส่วนสกัดของเร่วหอมไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพที่มีอาจช่วยป้องกันการเกิด atherosclerosis และช่วยลดความดันโลหิต นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้เตรียมบทความเพื่อเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้ Klaokwan Srisook, Ekaruth Srisook, Kamonporn Potiprasat and Titiporn Thongyen. Protective effect of rhizome extract from *Etilingera pavieana* in TNF- α induced human endothelial cells. Molecular Nutrition & Food Research (Manuscript in preparation).