รายงานฉบับสมบูรณ์
งวดที่ 2 (งวดสุดท้าย)

ผลของสารสกัดยาตำรับปถวี อาโป วาโย ที่มีต่อโฟมเซลล์ (โมเดลของภาวะหลอดเลือดแข็งในระดับหลอดทดลอง) ร่วมกับภาวะน้ำตาลสูง

Effect of Pathavi Apo Vayo formulary extract on foam cells (Atherosclerosis *in vitro* model) in combination with high glucose condition

โดย ดร. นิรามัย ฝางกระโทก

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

25 สิงหาคม 2563

ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย

กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดยาตำรับปถวี อาโป วาโย (PAV) ที่สกัดด้วย 50% เอทานอล ที่มีต่อการเกิดโฟมเซลล์ในสภาวะที่มีน้ำตาลสูงในเซลล์แมคโรฟาจ (RAW264.7) เปรียบเทียบกับยามาตรฐานในการลดไขมัน ซิมวาสตาติน (SVT) โดยศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดด้วยวิธี MTT assay ศึกษาฤทธิ์ต้านการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี Griess reaction ศึกษาการสร้างโฟมเซลล์โดยกระตุ้นให้เกิดโฟมเซลล์ด้วย oxLDL และวิเคราะห์การสะสมไขมันในเซลล์ด้วยการย้อมสี Oil Red O ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real-Time PCR ศึกษาการสร้างไซโตไคน์ด้วยวิธี ELISA และการศึกษาโปรตีโอมโดยใช้เครื่อง Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC/MS-MS) แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีน ความเชื่อมโยงของโปรตีนและเคมีด้วยเทคนิคชีวสารสนเทศ (Venn diagram และ STITCH) นอกจากนี้ ยังควบคุมคุณภาพสารสกัดด้วยวิธี TLC fingerprint และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัด PAV มีความเป็นพิษต่อเซลล์หากใช้ที่ความเข้มข้นสูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1,139.48 ± 36.22 และ 1,134.69 ± 13.55 μg/ml ในอาหารที่มีน้ำตาลปกติ (NGM) และน้ำตาลสูง (HGM) ตามลำดับ สารสกัด PAV สามารถลดการสร้างไนตริกออกไซด์ที่ถูกชักนำให้เกิดการสร้างโดย LPS ได้ชัดเจนและเป็นแบบ dose dependent manner ทั้งในสภาวะ NGM และ HGM โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 128.49 ± 4.68 และ 127.57 ± 14.02 μg/ml ตามลำดับ ส่วน SVT สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้น้อยกว่า PAV สำหรับการกระตุ้นให้เกิดโฟมเซลล์ด้วย oxLDL สารสกัด PAV สามารถลดการเกิดโฟมเซลล์ได้เล็กน้อย แต่เมื่อใช้ PAV ที่ความเข้มข้น 200-400 μg/ml พบว่า มีการสะสมไขมันในเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและกระจายไปในเซลล์ทั่วหลุมที่เพาะเลี้ยง ซึ่งสัมพันธ์กับผลของการศึกษาการแสดงออกของยีน พบว่า PAV สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวรับ oxLDL ได้แก่ LOX-1, SR-A1 และ CD-36 ในขณะที่ยา SVT ลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวและยังลดการเกิดโฟมเซลล์ลงด้วย แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัด PAV และ SVT สามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ TNF-α และ IL-1β และยังลดการสร้างไซโตไคน์ ในสภาวะที่มี oxLDL ร่วมกับ LPS ทั้งในอาหาร NGM และ HGM แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนและการสร้างไซโตไคน์ IFN-γ ในเซลล์ที่ทดสอบ ส่วนการศึกษาโปรตีนในเซลล์ RAW264.7 เปรียบเทียบหลายสภาวะ ได้แก่ 1) สภาวะที่ไม่มีน้ำตาล 2) สภาวะ HGM เพียงอย่างเดียว 3) สภาวะ HGM ร่วมกับ PAV 400 μg/ml 4) สภาวะ HGM ร่วมกับ oxLDL 5) สภาวะ HGM ร่วมกับ oxLDL และ PAV 400 μg/ml 6) สภาวะ HGM ร่วมกับ oxLDL และ LPS 7) สภาวะ HGM ร่วมกับ oxLDL LPS และ PAV 400 μg/ml พบว่ามีโปรตีน 42 ชนิดที่แสดงออกจำเพาะในสภาวะ HGM เพียงอย่างเดียว และสภาวะ HGM ร่วมกับ PAV 400 μg/ml โดยมีโปรตีน 11 ชนิดที่มีความเชื่อมโยงกับ gallic acid และ caffeic acid

ซึ่งเป็นสารที่พบในสารสกัด PAV และพืชเครื่องยาหลายชนิดซึ่งใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพได้ และยังมีโปรตีน 24 ชนิดที่จัดเป็นโปรตีนตัวใหม่ นอกจากนี้ ยังพบโปรตีน 2 ชนิดที่มีความจำเพาะในสภาวะ HGM เพียงอย่างเดียว และสภาวะ HGM ร่วมกับ oxLDL ได้แก่ Uncharacterized protein และ 28S ribosomal protein S31, mitochondrial (MRP-S31) (S31mt) (Imogen 38) ซึ่งจัดเป็นโปรตีนตัวใหม่โดยที่ไม่มีความเชื่อมโยงกับ gallic acid และ caffeic acid อีกด้วย ผลการศึกษาครั้งนี้อาจกล่าวโดยสรุปว่า สารสกัด PAV มีผลในการลดการเกิดโฟมเซลล์เพียงเล็กน้อย แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงอาจทำให้เกิดการสะสมของไขมันในเซลล์ได้มากขึ้น ดังนั้น การใช้ยาตำรับนี้ควรใช้อย่างระมัดระวังหากผู้ป่วยมีภาวะไขมันในเลือดสูงร่วมกับภาวะเบาหวาน แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดของยาชนิดนี้มีผลในการลดการอักเสบได้

คำสำคัญ: ยาตำรับปถวี อาโป วาโย ภาวะน้ำตาลสูง โฟมเซลล์ การอักเสบ oxLDL

กองทุนวิจัยภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย
Thai Traditional Medical Knowledge Fund

Abstract

An objective of present study was to investigate the effect of Pathavi Apo Vayo formulary extract (PAV) that was extracted by 50% ethanol on foam cell formation in high glucose medium condition in macrophages (RAW264.7) compared with standard medicine for hyperlipidemia treatment, Simvastatin (SVT). The extract cytotoxicity by using MTT assay, anti-nitric oxide production by using Griess raction, foam cell formation and lipid accumulation by using Oil Red O staining, gene expression by using Real-Time PCR, cytokine production by using ELISA, proteomic analysis by using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC/MS-MS), protein difference and protein-chemical correlation by using bioinformatics (Venn diagram and STITCH) were studied. In addition, the chemical composition analysis for quality control was also performed by using TLC fingerprint and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that PAW showed cytotoxic effect when using in high concentrations with IC_{50} of 1,139.48 ± 36.22 and 1,134.69 ± 13.55 μg/ml in normal glucose medium (NGM) and high glucose medium (HGM), respectively. PAV could strongly reduce nitric oxide production that was induced by using LPS, in dose dependent manner, in both NGM and HGM with IC_{50} of 128.49 ± 4.68 and 127.57 ± 14.02 μg/ml, respectively. Whereas SVT could suppression of nitric oxide production but was lower than those of PAV. For oxLDL-induced foam cell formation, PAV slightly suppressed lipid accumulation in foam cells. But when increasing of PAV concentration (200-400 μg/ml) the lipid accumulation in cells were found slightly increasing and spreading in the cells all over the culture wells. These results correlated with gene expression results. PAV could up-regulate gene expressions of oxLDL receptors including LOX-1, SR-A1 and CD-36, whereas, SVT could reduce those gene expressions and lipid accumulation in foam cells. However, PAV and SVT down-regulated pro-inflammatory cytokine genes including TNF-α and IL-1β, in addition, they also decreased the cytokine production in the condition of oxLDL combination with LPS in both NGM and HGM. IFN-γ gene expression and cytokine production were not found in this study. For proteomic study, there were 7 conditions were divided including 1) no glucose condition, 2) HGM condition, 3) HGM combination with PAV 400 μg/ml, 4) HGM combination with oxLDL, 5) HGM combination with oxLDL and PAV 400 μg/ml, 6) HGM combination with oxLDL and LPS, and 7) HGM combination with oxLDL, LPS, and with PAV 400 μg/ml. Forty-two proteins were found as a specific protein of HGM condition and HGM combination with PAV 400 μg/ml. Eleven proteins from those 42 proteins showed a network with gallic acid and caffeic acid. These 2 compounds were found in PAV and several plants composited in PAV that can be used as a marker

compound for quality control. The 24 proteins were found as a new marker protein. Moreover, 2 proteins (Uncharacterized protein and 28S ribosomal protein S31, mitochondrial (MRP-S31) (S31mt) (Imogen 38)) were found as a specific protein of HGM condition and HGM combination with oxLDL which were a new marker protein and did not connect with gallic acid and caffeic acid. In conclusion, PAV could slightly decrease foam cell formation but when using higher concentrations, the extract might increase lipid accumulation in foam cells. Therefore, in using of this medicine should be careful when using in hyperlipidemia and diabetes patients. However, the extract could reduce inflammation.

Keywords: Pathavi Apo Vayo formulary, hyperlipidemia, foam cells, inflammation, oxLDL

กองทุนวิจัยภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย
Thai Traditional Medical Knowledge Fund