Original Article

Songklanagarind Medical Journal

ผลของสารสกัดมังคุดต่อการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วยวาสคิวลาร์ เอนโดธีเลียลโกรทแฟคเตอร์

The Inhibitory Effect of Mangosteen Extract on Vascular Endothelial Growth Factor Induced Retinal Endothelial Cell Migration

กาญจนา จิตติพร, ปร.ด.[1]*, วิสุดา สุวิทยาวัฒน์, ปร.ด.[2], ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี, ปร.ด.[3], Ruth B. Caldwell, ปร.ด.[4]

Kanjana Jittiporn, Ph.D.[1]*, Wisuda Suvitayavat, Ph.D.[2], Primchanien Moongkarndi, Dr.rer.nat.[3], Ruth B. Caldwell, Ph.D.[4]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีหัวใจและทรวงอก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000 ประเทศไทย
[2]ภาควิชาสรีรวิทยา [3]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400 ประเทศไทย
[4]Vascular Biology Center, Augusta University, Augusta, GA 30912, USA.

[1]Department of Cardio-Thoracic Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Mueang, Phitsanulok 65000, Thailand.
[2]Department of Physiology [3]Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand.
[4]Vascular Biology Center, Augusta University, Augusta, GA 30912, USA.
*E-mail: kanjanaj@nu.ac.th
Songkla Med J 2017;35(1):65-74

บทคัดย่อ:

วัตถุประสงค์: งานวิจัยนี้ศึกษาผลของสารสกัดจากมังคุดต่ออนุมูลอิสระและการเคลื่อนที่ของเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียม

วัสดุและวิธีการ: งานวิจัยนี้ศึกษาในเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียม โดยทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดมังคุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสี trypan blue ทดสอบผลของสารสกัดมังคุดต่ออนุมูลอิสระจากภาวะพร่องออกซิเจนและการเคลื่อนที่ของเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย vascular endothelium growth factor (VEGF) ด้วย 2', 7'

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี พ.ศ. 2558 โครงการเลขที่ R2558C173
รับต้นฉบับวันที่ 7 ตุลาคม 2559 รับลงตีพิมพ์วันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2560

dichlorodihydrofluorescein (DCF-DA) และ scrape/wound ตามลำดับ ศึกษากลไกของสารสกัดมังคุดต่อ VEGF ด้วย western blot และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลด้วยสถิติ ANOVA

ผลการศึกษา: สารสกัดมังคุดความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นสารสกัดมังคุดความเข้มข้นนี้ใช้ศึกษาในการทดลอง ซึ่งพบว่าสารสกัดมังคุดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งอนุมูลอิสระภายในเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะพร่องออกซิเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดมังคุดความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย VEGF เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ VEGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ VEGF กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมผ่านการเติมฟอสเฟตให้กับ vascular endothelium growth factor receptor 2 (VEGFR2) ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารสกัดมังคุดไม่ผ่านการเติมฟอสเฟตให้กับ VEGFR2

สรุป: สารสกัดมังคุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียม

คำสำคัญ: การเคลื่อนที่ของเซลล์, เซลล์เรตินาเอนโดธีเลียม, สารสกัดมังคุด

Abstract:

Objective: This study aimed to determine the effect of mangosteen extract on hypoxia induced reactive oxygen species production and vascular endothelial growth factor (VEGF) induced retinal endothelial cell migration.

Material and Method: This research studied bovine retinal endothelial cells. The non-toxic concentration of mangosteen extract of water soluble part was verified using trypan blue staining. The effects of mangosteen extract on hypoxia induced reactive oxygen species production and retinal endothelial cells migration were determined using 2', 7' dichlorodihydrofluorescein diacetate and scrape/wound assay, respectively. The mechanism of mangosteen extract on retinal endothelial cell migration was determined using western blotting. The analysis of variance was used to determine the differences among group means.

Results: The concentrations of mangosteen extract at 25, 50 and 100 μg/ml were non-toxic and these concentrations were used in further experiments. Mangosteen extract at a dose of 100 μg/ml significantly attenuated hypoxia induced reactive oxygen species formation. At all doses, mangosteen extract also significantly inhibited retinal endothelial cell migration. However, the mechanism of mangosteen extract on VEGF signaling did not affect the phosphorylation of VEGF receptor 2 (VEGFR2).

Conclusion: Mangosteen extract has anti-oxidant and anti-migration effects.

Keywords: mangosteen extract, migration, retinal endothelial cell

บทนำ

การสร้างหลอดเลือดเรตินาใหม่จากหลอดเลือดเดิม (retinal neovascularization) เป็นสาเหตุที่สำคัญของการสูญเสียการมองเห็น เนื่องจากหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่นี้เปราะแตกง่ายและยอมให้สารน้ำผ่านได้เพิ่มขึ้น (increased permeability) ทำให้จอประสาทตาบวม ในที่สุดจอประสาทตาหลุดลอกได้[1,2] การสร้างหลอดเลือดเรตินาใหม่จากหลอดเลือดเดิมเกิดจากจอประสาทตาขาดเลือด ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) มีการกระตุ้น HIF-1α ทำให้เกิดการสร้าง growth factor ซึ่ง growth factor ที่สำคัญ คือ vascular endothelial growth

factor (VEGF) เป็นสารที่สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)[3] เมื่อ VEGF จับกับตัวรับ คือ vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) จะเกิด dimerization ของ VEGFR2 แล้วเกิด autophosphorylation และมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่[4] ซึ่งกระบวนการนี้ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ คือ เซลล์เอนโดธีเลียมเพิ่มจำนวน (proliferation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมไปยังบริเวณที่ขาดเลือด (migration) ในที่สุดเกิดการสร้างเป็นหลอดเลือดใหม่ (tube formation) ซึ่งการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมเป็นหนึ่งในกระบวนการที่สำคัญของการสร้างหลอดเลือดใหม่[5]

อนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) คือ โมเลกุลหรืออะตอมของออกซิเจนที่มีอิเลคตรอนอิสระ เช่น hydroxyl radical, superoxide, hydrogen peroxide เป็นต้น เกิดจากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ นอกจากนี้ภาวะต่างๆ เช่น ภาวะขาดเลือด (ischemia) และภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) จะกระตุ้นการเกิด ROS จาก nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidases; NOX), xanthine oxido-reductase, uncoupled eNOS และไมโตคอนเดรีย[6] ซึ่ง ROS ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่[7,8] ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจจะสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้

สารสกัดจากมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn) เป็นสาร polyphenol ซึ่งสารสกัดที่ได้จากมังคุดมีมากกว่า 50 สาร[9] และมีรายงานว่าสารสกัดมังคุดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ[10-12] และต้านอนุมูลอิสระ[13-15] ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี และคณะ[16] สกัดสารจากเปลือกมังคุด คือ แอลฟาแมงโกสทีน และสารสกัดมังคุดที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย และได้ทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดมังคุดที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดมังคุดนี้มีแอลฟาแมงโกสทีนน้อยกว่าร้อยละ 2 นอกจากนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิดในการต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยที่แอลฟาแมงโกสทีนมีพิษต่อเซลล์มากกว่า ในการศึกษาก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยพบว่าแอลฟาแมงโกสทีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอนโดธีเลียม (proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียม (migration) และการสร้างหลอดเลือด (tube formation) โดยยับยั้งการเติมฟอสเฟตให้กับ VEGFR2[17] อย่างไรก็ตามขั้นตอนที่สำคัญของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ คือ การเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียม ประกอบกับยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมังคุดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากมังคุดต่ออนุมูลอิสระและการเคลื่อนที่ของเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย VEGF ผ่าน phosphorylation ของ VEGFR2

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี M199 medium, fetal bovine serum (FBS) และ penicillin และ streptomycin ซื้อของบริษัท Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA) 2', 7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) ซื้อของบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) recombinant human VEGF165 (VEGF) ซื้อของบริษัท R&D systems (Minneapolis, MN, USA)

1. สารสกัดมังคุด

เปลือกมังคุดที่ล้างสะอาด ถูกหั่นและทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเปลือกมังคุดแห้ง 1 กิโลรัม ถูกบดด้วยเครื่องปั่นและสกัดด้วยเมทานอล 5 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) แล้วนำสารสกัดหยาบมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและน้ำ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และสารสกัดด้วยน้ำถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย thin layer chromatography และ high performance liquid chromatography[18] สารสกัดด้วยน้ำที่มีแอลฟาแมงโกสทีนน้อยกว่าร้อยละ 2 นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยสารสกัดมังคุดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ และละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่ -80 °ซ

2. เซลล์เรตินาเอนโดธีเลียม

Bovine retinal endothelial cells เลี้ยงใน M199 ประกอบด้วย 10% FBS 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin และเพาะเลี้ยงที่ 37 °ซ ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ passages 5-8

3. ทดสอบขนาดของสารสกัดมังคุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงใน 6-well plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เมื่อเซลล์เจริญได้ร้อยละ 70 ของพื้นที่ (70% confluence) อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็น M199 ประกอบด้วย 0.1% bovine serum albumin (BSA) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นเซลล์ได้รับ vehicle หรือสารสกัดมังคุดขนาด 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ถูกแยกและย้อมด้วย 0.25% trypan blue ซึ่งเซลล์ที่ตายจะย้อมติดสี trypan blue ดังนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติด trypan blue ด้วย hemocytometer เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

4. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมังคุดในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะพร่องออกซิเจน ด้วย DCF-DA

เซลล์เพาะเลี้ยงใน 24-well plate เมื่อเซลล์เจริญได้ร้อยละ 70 ของพื้นที่ อาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็น M199 ประกอบด้วย 0.1% BSA 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin เป็นเวลา 1 คืน และเซลล์ได้รับ vehicle หรือสารสกัดมังคุดขนาด 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นออกซิเจนร้อยละ 1 หรือร้อยละ 21 อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วบ่มด้วย 25 ไมโครโมล DCF-DA เป็นเวลา 15 นาที ที่ระดับความเข้มข้นออกซิเจนร้อยละ 21 อุณหภูมิ 37 °ซ วัดความเข้มของการเรืองแสงด้วย microplate reader ที่ excitation/emission 504/529 nm

5. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมังคุดในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย VEGF ด้วยวิธี scrape/wound

เซลล์เพาะเลี้ยงใน 6-well plate เมื่อเซลล์เจริญได้ร้อยละ 70 ของพื้นที่ อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็น M199 ประกอบด้วย 0.1% BSA 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร streptomycin เป็นเวลา 1 คืน เซลล์ถูกครูดด้วย sterile micropipette tip ขนาด 1,000 ไมโครลิตร เซลล์ได้รับ vehicle หรือสารสกัดมังคุดขนาด 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเซลล์ได้รับ VEGF 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายภาพก่อนและหลังได้รับสารสกัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณหาร้อยละการเคลื่อนของเซลล์ (percentage of invaded area) จากสูตร

$$\text{ร้อยละการเคลื่อนของเซลล์} = \frac{\text{พื้นที่ที่ไม่มีเซลล์ ณ จุดเริ่มต้น (T0)} - \text{พื้นที่ที่ไม่มีเซลล์ ณ 24 ชั่วโมง (T24)}}{\text{พื้นที่ที่ไม่มีเซลล์ ณ จุดเริ่มต้น (T0)}} \times 100$$

6. ทดสอบกลไกของสารสกัดมังคุดต่อ VEGF ด้วย western blot

เซลล์ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดมังคุดเป็นเวลา 30 นาที และได้รับ VEGF 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที โปรตีนถูกแยกด้วย RIPA buffer ที่มี protease inhibitor, cocktail inhibitor และ phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) โปรตีน 20 ไมโครกรัม ถูกแยกด้วย 8% SDS-PAGE และ transfer สู่ PVDF membrane หลังจากนั้น membrane ถูก block ด้วย 5% non-fat dry milk in TBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที membrane ถูกบ่มด้วย primary antibody ต่อ phospho-VEGFR2 (p-VEGFR2) และ β-tubulin ใน 2% BSA in TBST ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้น membrane ถูกบ่มด้วย horse-radish peroxidase-conjugated secondary antibody ใน 2% BSA in TBST ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แถบโปรตีน (protein band) ตรวจด้วย chemiluminescence และความเข้มของโปรตีน (protein band intensity) ที่ต้องการถูกวิเคราะห์ด้วย Image J software

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

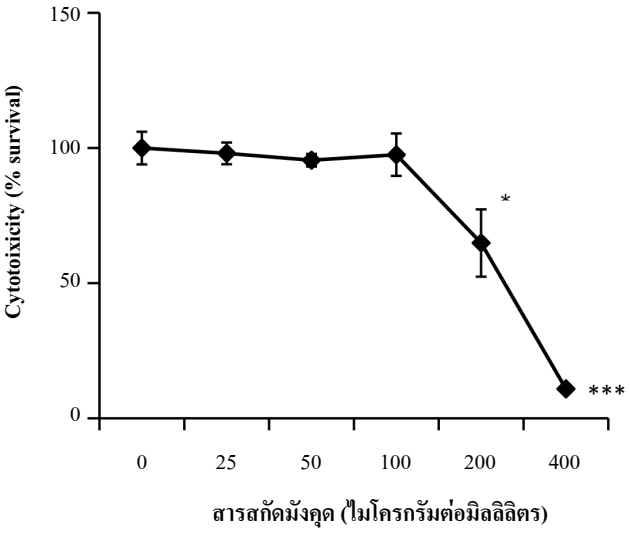
ข้อมูลแสดงเป็น mean±SEM ใช้สถิติ one way-analysis of variance (ANOVA) ในการทดสอบความแตกต่างของข้อมูล และใช้ Tukey Post Hoc test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยกำหนดค่านัยสำคัญที่ p-value<0.050 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

1. ขนาดของสารสกัดมังคุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

เพื่อหาขนาดของสารสกัดมังคุดที่ไม่ทำลายเซลล์ โดยย้อมเซลล์ด้วย trypan blue พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับสารสกัด

มังคุดขนาด 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 98.03±4.01, 95.49±2.35, 97.51±7.85, 64.86±12.45 และ 10.87±1.45 ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดมังคุดขนาด 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดจำนวนเซลล์รอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value< 0.050) ดังนั้นสารสกัดมังคุดขนาด 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำมาศึกษาในการทดลองต่อไป (รูปที่ 1)



n=3, *p-value<0.050, ***p-value<0.001 vs control

รูปที่ 1 แสดงผลของสารสกัดมังคุดต่อเซลล์รอดชีวิต เซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมถูกบ่มด้วยสารสกัดมังคุดขนาดต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย้อมเซลล์ด้วย trypan blue นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสีเพื่อประเมินอัตราเซลล์รอดชีวิต

2. สารสกัดมังคุดต้านอนุมูลอิสระที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะพร่องออกซิเจน

การศึกษานี้พบว่าเซลล์ในภาวะออกซิเจนปกติ (21% O_2) มีการสร้างอนุมูลอิสระเท่ากับ 366.00±20.87ในขณะที่ภาวะพร่องออกซิเจน (1% O_2) มีการกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระเท่ากับ 582.33±17.38 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value<0.001) เมื่อเทียบกับเซลล์ในภาวะออกซิเจนปกติ และสารสกัดมังคุดความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในภาวะพร่องออกซิเจนมีการเกิดอนุมูลอิสระเท่ากับ 584.83±28.42, 486.67±6.91 และ 426.17±12.43 ตามลำดับ และเซลล์ที่ได้รับ catalase ในภาวะพร่องออกซิเจนมีการเกิดอนุมูลอิสระเท่ากับ 452.67±14.19 ดังนั้นสารสกัดมังคุดขนาด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะพร่องออกซิเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value<0.001) เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ catalase (p-value<0.010) (รูปที่ 2)

3. สารสกัดมังคุดลดการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย VEGF

การเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ ซึ่งการศึกษานี้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมังคุดในการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมที่กระตุ้นด้วย VEGF ด้วยวิธี scrape/wound เมื่อครบ 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับ vehicle มีการเคลื่อนที่ของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 72.14±1.81 เซลล์ที่ได้รับ VEGF กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 83.41±2.87 ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับ VEGF ร่วมกับ vehicle กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 80.95±2.00 ส่วนเซลล์ที่ได้รับสารสกัดมังคุดขนาด 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ VEGF มีการเคลื่อนที่ของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 68.56±0.53, 65.44±0.71 และ 46.76±1.18 ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดมังคุดขนาด 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย VEGF เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ VEGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value<0.001) (รูปที่ 3)

4. สารสกัดมังคุดออกฤทธิ์โดยไม่ผ่าน VEGFR2 phosphorylation

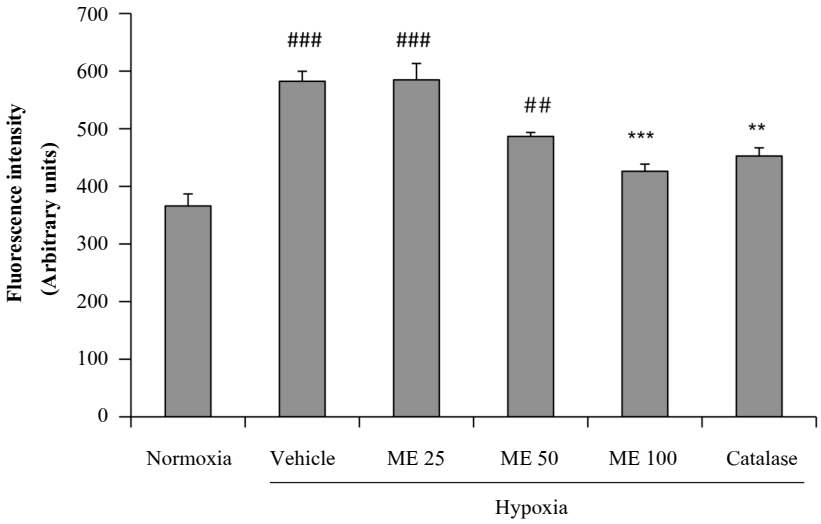
เมื่อ VEGF จับกับ VEGFR2 เกิด autophosphorylation เพื่อมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียม เพื่อทดสอบกลไกของสารสกัดมังคุดผ่าน p-VEGFR2 เซลล์ได้รับ vehicle หรือได้รับสารสกัดมังคุดความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที หลังจากนั้นได้รับ VEGF 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที พบว่า VEGF กระตุ้น p-VEGFR2 8.49±2.21 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ VEGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value<0.050) และเซลล์ที่ได้รับสารสกัดมังคุดความเข้มข้น

25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ VEGF มีการกระตุ้น p-VEGFR2 เท่ากับ 8.11±1.96, 7.74±2.00 และ 7.71±1.33 ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าสารสกัดมังคุดไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้น p-VEGFR2 ด้วย VEGF (รูปที่ 4)

วิจารณ์

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมเมื่อถูกกระตุ้นด้วยภาวะพร่องออกซิเจน และลดการเคลื่อนที่ของเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมเมื่อถูกกระตุ้นด้วย VEGF ซึ่ง VEGF กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมผ่านการเติมฟอสเฟตให้กับ VEGFR2 ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารสกัดมังคุดไม่ผ่านการเติมฟอสเฟตให้กับ VEGFR2

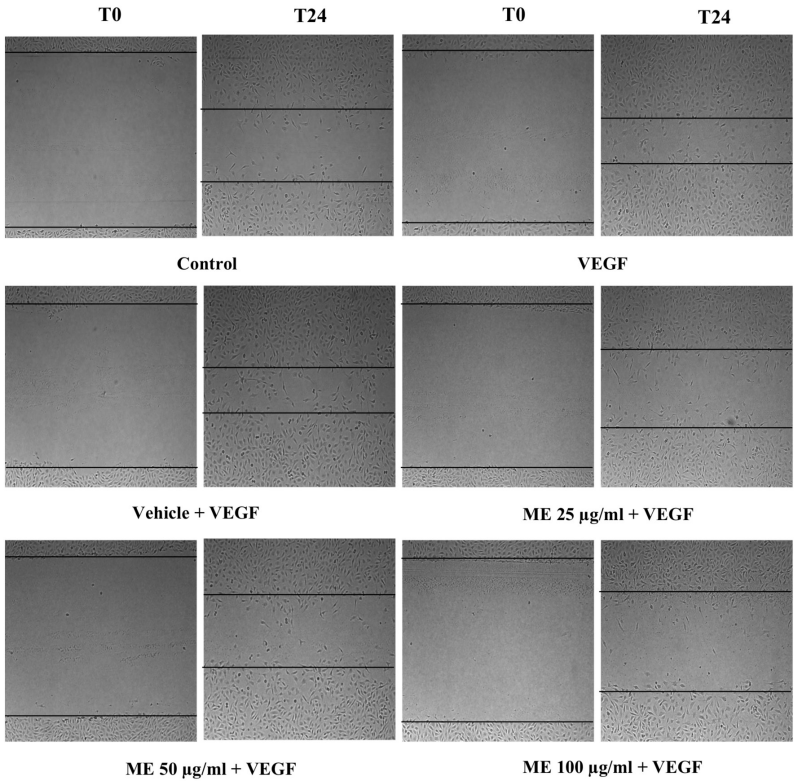
สารอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระของออกซิเจนมีบทบาทสำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ ภาวะต่างๆ เช่น ภาวะขาดเลือด และภาวะพร่องออกซิเจน เพิ่มการสร้าง ROS ซึ่ง ROS กระตุ้น VEGF, VEGFR และ downstream signaling[8,19-20] นอกจากนี้ภาวะขาดเลือด/ภาวะพร่องออกซิเจนกระตุ้น HIF-1α ส่งผลให้การสร้าง VEGF เพิ่มขึ้น VEGF จับกับตัวรับจำเพาะ คือ VEGFR2 และเกิด dimerization และ autophosphorylation ทำให้โปรตีนที่มี Src homology 2 (SH2) เข้ามาจับและมีการส่งต่อสัญญาณ ผ่าน Mitogen activated protein kinase (MAPK) คือ JNK, p38 และ ERK1/2 และ PI3K/Akt สุดท้ายทำให้เซลล์เอนโดธีเลียมเกิด proliferation[21,22], migration[23] และ tube formation[24-26]



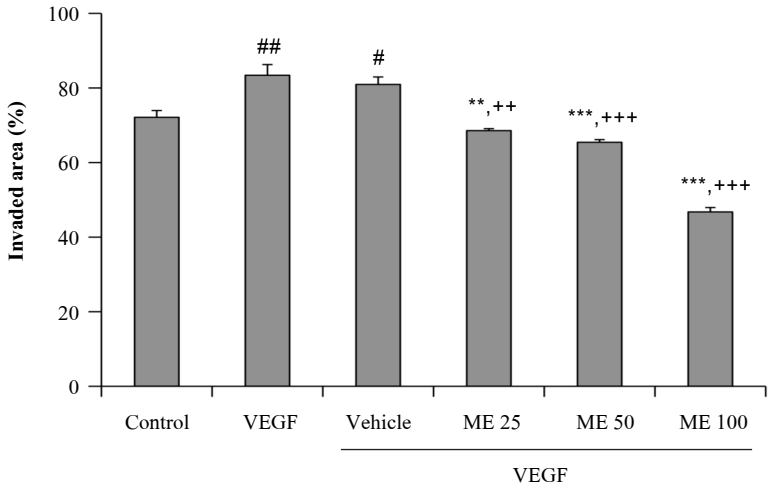
n=3, ##p-value<0.010, ###p-value<0.001 vs vehicle-normoxia, **p-value<0.010, ***p-value<0.001 vs vehicle-hypoxia

รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดมังคุดต่อระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะพร่องออกซิเจนด้วย DCF-DA เซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมได้รับสารสกัดมังคุดหรือ vehicle หรือ catalase และบ่มที่ระดับความเข้มข้นออกซิเจนร้อยละ 1 หรือร้อยละ 21 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทดสอบระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ด้วย DCF-DA วัดความเข้มของการเรืองแสงด้วย microplate reader ที่ excitation/emission 504/529 nm

ก

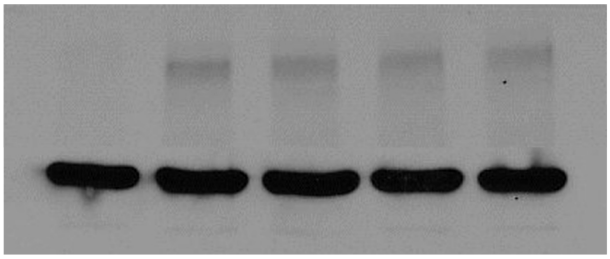


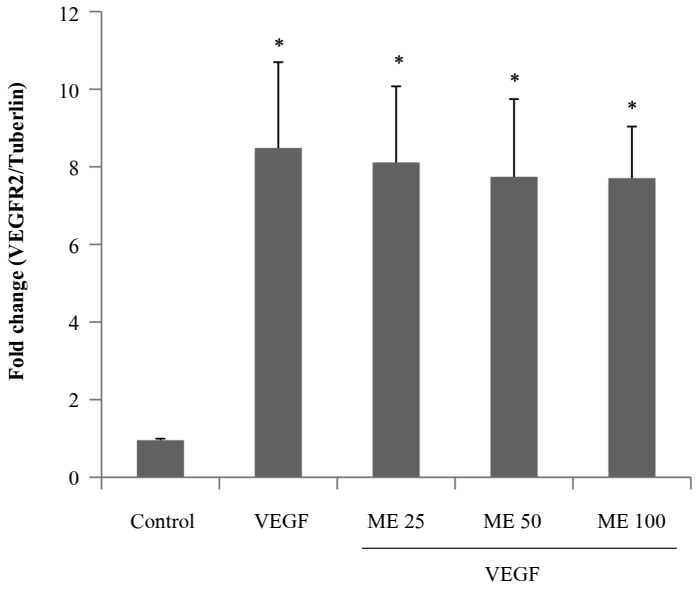
ข



n=3, #p-value<0.050, ##p-value<0.010 vs control, **p-value<0.010, ***p-value<0.010 vs VEGF, ++p-value<0.010, +++p-value<0.001 vs vehicle+VEGF

รูปที่ 3 แสดงผลของสารสกัดมังคุดต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย VEGF (ก) เซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมถูกครูดและได้รับ VEGF ร่วมกับได้รับหรือไม่ได้รับสารสกัดมังคุด เปรียบเทียบภาพถ่ายก่อนและหลังได้รับสารสกัด 24 ชั่วโมง (ข) วิเคราะห์การเคลื่อนของเซลล์ด้วย Image J software





n=3, *p-value<0.050 vs control

รูปที่ 4 แสดงผลของสารสกัดมังคุดต่อการส่งสัญญาณของ VEGF ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ เซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมได้รับสารสกัดมังคุดหรือ vehicle และบ่มด้วย VEGF เป็นเวลา 5 นาที แยกแถบโปรตีน phosphorylation of VEGFR2 ด้วย SDS-PAGE

สารสกัดมังคุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[14] โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเลคตรอนเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging)[13,27,28] การคีเลทไอออนของโลหะ (metal ions chelating)[13] การรีดิวซ์ (reducing activity)[13,29] และการกำจัดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (lipid oxidation productions scavenging)[13,30] การศึกษานี้พบว่าสารสกัดมังคุดลด ROS ในเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะพร่องออกซิเจน นอกจากนี้สารสกัดมังคุดยังต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ neuroblastoma[15,18] ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี และคณะ[16] ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแอลฟาแมงโกสทีนและสารสกัดมังคุด พบว่าแอลฟาแมงโกสทีนและสารสกัดมังคุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tjahjani และคณะ[31] นอกจากนี้ในการศึกษาก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยพบว่าแอลฟาแมงโกสทีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมเช่นกัน[17] วิชิต สุธรรมารักษ์ และคณะ[32] ศึกษาความปลอดภัยและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเม็ดเลือดแดง

ในอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีที่รับประทานสารสกัดมังคุดเป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าเม็ดเลือดแดงของอาสาสมัครที่รับประทานสารสกัดมังคุดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อรับประทานสารสกัดมังคุดอย่างน้อย 12 สัปดาห์

ROS เป็นตัวกลางที่สำคัญในการเกิด proliferation, migration และ tube formation มีรายงานว่าสารสกัดมังคุดมีผลยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของ vasa vasorum โดยลด H_2O_2, HIF-1α, NF-ΚB และ iNOS ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง[33] นอกจากนี้แอลฟาแมงโกสทีนยับยั้งการเกิด proliferation, migration และ tube formation ของเซลล์เอนโดธีเลียมของหลอดเลือดขนาดใหญ่ คือ human umbilical vein endothelial cells[34] และหลอดเลือดขนาดเล็ก คือ BRECs[17] โดยการยับยั้ง phosphorylation ของ VEGFR2 ซึ่งการศึกษานี้พบว่าสารสกัดมังคุดสามารถยับยั้งการเกิด migration ได้โดยไม่ผ่านการ phosphorylation ของ VEGFR2 แสดงว่าสารสกัดมังคุดที่มีแอลฟาแมงโกสทีนน้อยกว่าร้อยละ 2 และแอลฟาแมงโกสทีนสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เรตินาเอนโดธีเลียมซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของหลอดเลือดเลี้ยงจอประสาทตาโดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน นอกจากนี้มีรายงานว่าแอลฟาแมงโกสทีนยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง ผ่าน matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) และ NF-ΚB 35 และ MMP-936 อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงฤทธิ์และกลไกของสารสกัดมังคุดต่อการเกิด proliferation และ tube formation รวมถึงต้องศึกษาในสัตว์ทดลองร่วมด้วย

สรุป

สารสกัดมังคุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์เอนโดธีเลียมที่ถูกกระตุ้นด้วย VEGF ได้ โดยไม่ผ่าน phosphorylation ของ VEGFR2

เอกสารอ้างอิง

1. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. Nature 2004; 438: 960 – 6.
2. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. Prog in Retin and Eye Res 2003; 22: 1 – 29.
3. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med 2003; 9: 677 – 84.
4. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling in control of vascular function. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7: 359 – 71.
5. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis-a new target for future therapy. Vasc Pharmacol 2006; 44: 265 – 74.
6. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res 2000; 87: 840 – 4.
7. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res 2005; 68: 26 – 36.
8. Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. Cardiovasc Res 2006; 71: 226 – 35.
9. Yoshimura M, Ninomiya K, Tagashira Y, Maejima K, Yoshida T, Amakura Y. Polyphenolic constituents of the pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). J Agric Food Chem 2015; 63: 7670 – 4.
10. Nakatani K, Nakahata N, Arakawa T, Yasuda H, Ohizumi Y. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by γ-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. Biochem Pharmacol 2002; 63: 73 – 9.
11. Chen LG, Yang LL, Wang CC. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. Food Chem Toxicol 2008; 46: 688 – 93.
12. Bumrungpert A, Kalpravidh RW, Chitchumroonchokchai C, Chuang CC, West T, Kennedy A, et al. Xanthones from mangosteen prevent lipopolysaccharide-mediated inflammation and insulin resistance in primary cultures of human adipocytes. J Nutr 2009; 139: 1185 – 91.
13. Kosem N, Han YH, Moongkarndi P. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* Hulls. Science Asia 2007; 33: 283 – 92.
14. Suttirak W, Manurakchinakorn S. In vitro antioxidant properties of mangosteen peel extract. Food Sci Technol 2014; 51: 3546-58.
15. Sattayasai J, Chaonapan P, Arkaravichie T, Soi-Ampornkul R, Junnu S, Charoensilp P, et al. Protective effects of mangosteen extract on H_2O_2-induced cytotoxicity in SK-N-SH cells and scopolamine-induced memory impairment in mice. PLoS One 2013; e85053.
16. Moongkarndi P, Jaisupa N, Samer J, Kosem N, Konlata J, Rodpai E, et al. Comparison of the biological activity of two different isolates from mangosteen. J Pharm Pharmacol 2014; 66: 1171 – 9.

17. Jittiporn K, Suwanpradid J, Patel C, Rojas M, Thirawarapan S, Moongkarndi P, et al. Anti-angiogenic actions of the mangosteen polyphenolic xanthone derivative α-mangostin. Microvas Res 2014; 93: 72 – 9.
18. Moongkarndi P, Srisawat C, Saetun P, Jantaravinid J, Peerapittayamongkol C, Soi-ampornkul R, et al. Protective effect of mangosteen extract against beta-amyloid-induced cytotoxicity, oxidative stress and altered proteome in SK-N-SH cells. J Proteome Res 2010; 9: 2076 – 86.
19. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. Mol Cell Biochem 2004; 264: 85 – 97.
20. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. Antioxid Redox Signal 2007; 9: 731 – 9.
21. Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. Endothelium 2002; 9: 231 – 8.
22. Luczak K, Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G. Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. Cell Biol Int 2004; 28: 483 – 6.
23. Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. FEBS Lett 2000; 486: 252 – 6.
24. Bullard LE, Qi X, Penn JS. Role for extracellular signal-responsive kinase-1 and -2 in retinal angiogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44: 1722 – 31.
25. Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K. Glycogen-synthase kinase3β/β-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. Circ Res 2005; 96: 308 – 18.
26. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. Circ Res 2002; 90: 1243 – 50.
27. Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem 2007; 100: 1409 – 18.
28. Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. Anti-oxidant xanthones from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). J Agric Food Chem 2006; 54: 2077 – 82.
29. Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chem 2007; 102: 938 – 53.
30. Yu L, Zhao M, Yang B, Zhao Q, Jiang Y. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. Food Chem 2007; 104: 176 – 81.
31. Tjahjani S, Widowati W, Khiong K, Suhendra A, Tjokropranoto R. Antioxidant properties of *Garcinia Mangostana* L (Mangosteen) Rind. Procedia Chem 2014; 13: 198 – 203.
32. Suthammarak W, Numpraphrut P, Charoensakdi R, Neungton N, Tunrungruangtavee V, Jaisupa N, et al. Antioxidant-enhancing property of the polar fraction of mangosteen pericarp extract and evaluation of its safety in humans. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 1 – 10.
33. Wihastuti TA, Sargowo D, Tjokroprawiro A, Permatasari N, Widodo MA, Soeharto S. Vasa vasorum anti-angiogenesis through H_2O_2, HIF-1α, NF-ΚB, and iNOS inhibition by mangosteen pericarp ethanolic extract (*Garcinia mangostana* Linn) in hypercholesterol-diet-given Rattus norvegicus Wistar strain. Vasc Health Risk Manag 2014; 10: 523 – 31.
34. Shiozaki T, Fukai M, Hermawati E, Juliawaty L, Syah Y, Hakim E, et al. Anti-angiogenic effect of α-mangostin. J Nat Med 2012; 67: 202 – 6.
35. Wang JJ, Sanderson BJ, Zhang W. Significant anti-invasive activities of alpha-mangostin from the mangosteen pericarp on two human skin cancer cell lines. Anticancer Res 2012; 32: 3805 – 16.
36. Beninati S, Oliverio S, Cordella M, Rossi S, Senatore C, Liguori I, et al. Inhibition of cell proliferation, migration and invasion of B16-F10 melanoma cells by α-mangostin. Biochem Biophys Res Commun 2014; 450: 1512 – 7.