



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์
ของสารสำคัญสมุนไพรพรมมิในหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้หนูขาว
Vasorelaxant effect and mechanisms of action
of *Bacopa monnieri* active compounds in rat isolated mesenteric arteries

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.กรรณกาญจน์ ชูทิพย์ และคณะ
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันที่รับเข้า 11 มิ.ย. 2564
เลขหนังสือ 1038338
เลขเรียกหนังสือ ๖ 04
581

มิถุนายน 2562

.2
๗๑๕๙
2562

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีงบประมาณ 2561

คำนำ

พรมมิ หรือ *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. เป็นสมุนไพรที่ใช้บำรุงความจำในการแพทย์อายุรเวทของอินเดีย เป็นยาบำรุงประสาทและบำรุงหัวใจ สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ กลุ่ม saponins ได้แก่ bacopaside I และ saponins mixtures เรียกว่า bacoside A ประกอบด้วย bacoside A₃, bacopaside II, bacopaside X และ bacosaponin C นอกจากนี้พรมมียังมีสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ได้แก่ luteolin และ apigenin ผลการศึกษาที่ก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่า สารสกัดพรมมิ (Brahmi extract) มีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนู ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดแดงของหนู และเพิ่มการไหลของเลือด (Kamkaew et al., 2011; 2013) การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อยอด โดยทำการเปรียบเทียบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องของสารสำคัญในสารสกัดพรมมิระหว่างสารกลุ่ม saponins และสารกลุ่ม flavonoids ที่มีต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

ความใหม่ (novelty) ของงานวิจัยนี้ ได้แก่ (1) คณะผู้วิจัยเปรียบเทียบฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดในลักษณะ side-by-side comparison ของสารสำคัญของสารสกัดพรมมิ ได้แก่ flavonoids (luteolin and apigenin) และ saponins (bacoside A and bacopaside I) (2) ศึกษากลไกการคลายตัวของหลอดเลือดภายใต้วิธีการวิจัยหรือเงื่อนไขเดียวกัน ซึ่งได้รายงานเป็นครั้งแรกในกลไกการคลายตัวของ bacoside A และ bacopaside I (3) ศึกษาในหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ อันเป็นหลอดเลือดแดงชนิดต้านทาน (resistance vessel type) ควบคุมการไหลของเลือดและความดันโลหิต และหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้มีความไวสูงต่อสารสกัดพรมมิ และ (4) ผลการวิจัยนี้เป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นชัดในผลของสารสำคัญของพรมมิต่อการคลายตัวของหลอดเลือดและกลไกที่เกี่ยวข้อง สามารถเชื่อมโยงกับฤทธิ์การเพิ่มการไหลของเลือดหรือฤทธิ์การเพิ่มความจำได้

งานวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารงานวิจัยระดับนานาชาติ ชื่อ Molecules ปี 2019, 24 (12) มี impact factors 3.098 หัวข้อ "Vasodilatory Effects and Mechanisms of Action of *Bacopa monnieri* Active Compounds on Rat Mesenteric Arteries" งานวิจัยนี้จึงสามารถยืนยันพิสูจน์ผลของสารสำคัญของสมุนไพรพรมมิในการคลายตัวของหลอดเลือด เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญของสมุนไพรพรมมิในการคลายตัวของหลอดเลือด ซึ่งมีประโยชน์ในการส่งเสริมการผลิตเชิงพาณิชย์ของสมุนไพรพรมมิ และมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยขั้นสูงต่อไป

คณะผู้วิจัย

16 มิถุนายน 2562

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Graphical Abstract	3
บทที่ 1 บทนำ	4
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
3. ขอบเขตของการวิจัย	5
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	12
1. สัตว์ทดลอง	12
2. สารสำคัญของสารสกัดพรมมิ	12
3. วิธีการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	15
1. ผลของสารสำคัญสารสกัดพรมมิต่อการคลายตัวของหลอดเลือด	15
2. กลไกของสารสำคัญสารสกัดพรมมิต่อการคลายตัวของหลอดเลือด	16
3. กลไกของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าเซลล์	19
4. กลไกของสารสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมออกจาก sarcoplasmic reticulum	21
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
บรรณานุกรม	24
ภาคผนวก	29

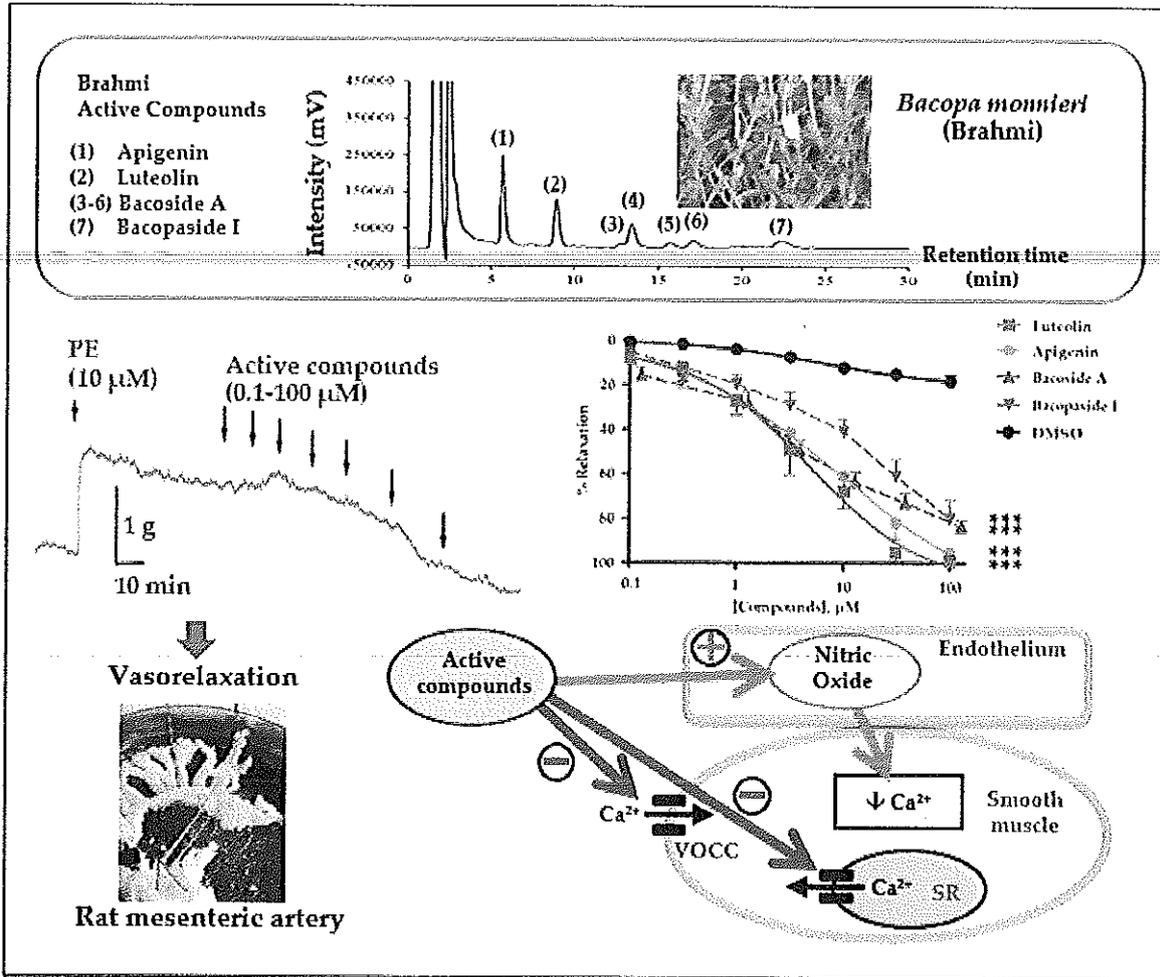
บทคัดย่อ

สารสกัดพรมมิ (*B. monnieri* extract; BME) เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) มากมาย ได้แก่ สารกลุ่ม saponins และ flavonoids ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัว อย่างไรก็ตามยังไม่ชัดเจนว่าสารสำคัญของสารสกัดพรมมิชนิดใดมีประสิทธิภาพมากกว่ากันในเชิงเปรียบเทียบฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของสารสำคัญกลุ่ม saponins และ flavonoids ในหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ของหนู โดยใช้เทคนิค organ bath และศึกษากลไกการคลายตัวของหลอดเลือด ได้แก่ กลไกผ่าน endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway และกลไกการไหลของแคลเซียม โดยพบว่าสารกลุ่ม saponins (bacoside และ bacopaside I) และกลุ่ม flavonoids (luteolin และ apigenin) ที่ความเข้มข้น 0.1-100 μM ทำให้หลอดเลือดคลายตัว แบบ concentration-dependent manner โดย luteolin และ apigenin ทำให้เกิดการคลายตัวในหลอดเลือดปกติที่มีเอนโดทีเลียม (endothelial intact vessels) โดย luteolin และ apigenin มีประสิทธิผลหรือ efficacy (E_{max} 99.4 \pm 0.7 และ 95.3 \pm 2.6%) และมีความแรงหรือ potency (EC_{50} 4.35 \pm 1.31 และ 8.93 \pm 3.33 μM) มากกว่า bacoside A และ bacopaside I (E_{max} 83.6 \pm 2.9 และ 79.9 \pm 8.2%; EC_{50} 10.8 \pm 5.9 และ 14.6 \pm 5.4 μM) ตามลำดับ การทำ pretreatment ในหลอดเลือดปกติที่มีเอนโดทีเลียมด้วยสารยับยั้ง eNOS (100 μM L-NAME) หรือการนำเอนโดทีเลียมออกนำไปสู่การลดลงของผลการคลายตัวของหลอดเลือดในสารสำคัญทั้งหมด ในหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยสภาวะโพแทสเซียมสูง (K^+ -depolarised vessels) ซึ่งแขวนในสารละลายปราศจากแคลเซียม (Ca^{2+} -free solution) พบว่าสารสำคัญยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย CaCl_2 ในหลอดเลือดที่ปราศจากเอนโดทีเลียม นอกจากนี้สารสำคัญยังทำให้เกิดการลดลงของการหดตัวชั่วคราว (transient contraction) ที่เหนี่ยวนำโดย 10 μM phenylephrine ในสารละลาย Ca^{2+} -free medium ที่มี EGTA (1 mM) ดังนั้น ฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดเกิดขึ้นทั้งในหลอดเลือดที่มีเอนโดทีเลียมและปราศจากเอนโดทีเลียม บ่งชี้ถึงฤทธิ์ที่ผ่านเซลล์เอนโดทีเลียมและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ จึงสรุปได้ว่าสารกลุ่ม flavonoids ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด โดยมีความแรง (potency) มากกว่าสารกลุ่ม saponins แต่ปริมาณสาร saponins ในสารสกัดพรมมิมีมากกว่าถึง 20 เท่า จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารสำคัญในสารสกัดพรมมิต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

Abstract

B. monnieri extract (BME) is an abundant source of bioactive compounds, including saponins and flavonoids known to produce vasodilation. However, it is unclear which components are the more effective vasodilators. The aim of this research was to investigate the vasorelaxant effects and mechanisms of action of saponins and flavonoids on rat isolated mesenteric arteries using the organ bath technique. The vasorelaxant mechanisms, including endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway and calcium flux were examined. Saponins (bacoside A and bacopaside I), and flavonoids (luteolin and apigenin) at 0.1-100 μM caused vasorelaxation in a concentration-dependent manner. Luteolin and apigenin produced vasorelaxation in endothelial intact vessels with more efficacy (E_{max} 99.4 \pm 0.7 and 95.3 \pm 2.6%) and potency (EC_{50} 4.35 \pm 1.31 and 8.93 \pm 3.33 μM) than bacoside A and bacopaside I (E_{max} 83.6 \pm 2.9 and 79.9 \pm 8.2%; EC_{50} 10.8 \pm 5.9 and 14.6 \pm 5.4 μM). Pretreatment of endothelial intact rings, with L-NAME (100 μM); an eNOS inhibitor, or removal of the endothelium reduced the relaxant effects of all compounds. In K^+ -depolarised vessels suspended in Ca^{2+} -free solution, these active compounds inhibited $CaCl_2$ -induced contraction in endothelial denuded arterial rings. Moreover, the active compounds attenuated transient contractions induced by 10 μM phenylephrine in Ca^{2+} -free medium containing EGTA (1 mM). Thus, relaxant effects occurred in both endothelial intact and denuded vessels which signify actions through both endothelium and vascular smooth muscle cells. In conclusion, the flavonoids have about twice the potency of saponins as vasodilators. However, in the BME, there is $\sim 20 \times$ the amount of vaso-reactive saponins and thus are more effective.

Graphical Abstract



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคทางระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด (cardiovascular disease) เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประชากรทั่วโลก ประมาณร้อยละ 31 (World Health Organization, 2017) และเป็นปัญหาสุขภาพในอันดับต้น ๆ ของประเทศไทย หนึ่งในปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ คือ ภาวะความดันโลหิตสูง ซึ่งอาจเกิดการเพิ่มขึ้นของความดันทานของหลอดเลือดส่วนปลาย (Aaronson and Ward, 2008) ดังนั้น ยาที่สามารถขยายหลอดเลือดขนาดเล็ก จึงสามารถลดความดันทานของหลอดเลือดส่วนปลายและควบคุมความดันเลือดได้ สมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำและมีประสิทธิภาพในการรักษาสูง (Zhang et al., 2015)

พรมมิ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. ปัจจุบันจัดอยู่ในวงศ์ Plantaginaceae เป็นสมุนไพรที่เป็นทั้งอาหารและยาในตำราอายุรเวทของอินเดีย ระบุว่าช่วยเรื่องเพิ่มความจำ บำรุงสมอง รวมทั้งมีสรรพคุณทางยาอื่น ๆ อีกมากมาย พรมมิแพร่กระจายและขยายพันธุ์ได้ง่าย โดยพบอยู่ทั่วไปในประเทศไทย จึงเหมาะจะนำมาพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (กรรณก อิงคินันท์, 2561)

พรมมิมีสารสำคัญหลัก ๆ คือ สารกลุ่ม saponins เช่น bacoside A₃, bacopaside II, bacopasaponin C isomer, bacopasaponin C, bacopaside I และสารกลุ่ม flavonoids ได้แก่ luteolin และ apigenin (Phrompittayarat, et al., 2007; Limpeanchob et al., 2008; Nuengchamnonng et al., 2016) มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดพรมมิต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด พบว่าสารสกัดพรมมิมีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนู (Kamkaew et al., 2011) และทำให้หลอดเลือดแดงทปอด เออร์ตาของกระต่ายคลายตัว (Dar and Channa, 1997; 1999) สารสกัดพรมมิทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดแดงขนาดเล็กหลายชนิด และพบว่าสารสกัดออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ (mesenteric artery) เมื่อทดสอบสารสำคัญของพรมมิ bacoside A₃ และ bacopaside II ก็พบว่าสามารถทำให้หลอดเลือด mesenteric artery คลายตัว (Kamkaew et al., 2011) แต่ยังไม่ทราบว่ามีกลไกใด นอกจากนี้ยังพบว่า luteolin ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่เออร์ตา (Si et al., 2014) อย่างไรก็ตาม สารสกัดพรมมิประกอบด้วยสารสำคัญในปริมาณแตกต่างกัน (ดังเอกสาร supplementary data ในภาคผนวก; Sumathi et al., 2011) แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า สารใดเป็น

สารสำคัญหลักในการทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็ก งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องของสารสำคัญในสารสกัดพรมมิระหว่างสารกลุ่ม saponins และสารกลุ่ม flavonoids ที่มีต่อการคลายตัวของหลอดเลือด mesenteric artery

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- (1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญสารสกัดพรมมิกลุ่ม saponins และกลุ่ม flavonoids ที่มีต่อการคลายตัวของหลอดเลือด mesenteric artery
- (2) เพื่อศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือดของสารสำคัญสารสกัดพรมมิกลุ่ม saponins และกลุ่ม flavonoids

3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro study*) ศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ (mesenteric arteries) ของหนูแรท โดยทดสอบฤทธิ์สารสำคัญกลุ่ม saponins ได้แก่ bacoside A และ bacopaside I และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ได้แก่ luteolin และ apigenin รวมทั้งศึกษา กลไกที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือด ได้แก่ บทบาทของ endothelial nitric oxide (eNOS) และ กลไกที่เกี่ยวข้องกับการไหลของแคลเซียมอินของเซลล์หลอดเลือด

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) การพิสูจน์สรรพคุณของสารสำคัญของสมุนไพรพรมมิในการคลายตัวของหลอดเลือด โดยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อส่งเสริมการผลิตเชิงพาณิชย์ของสมุนไพรไทย
- (2) เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญของสมุนไพรพรมมิในการคลายตัวของหลอดเลือด เพื่อการศึกษาวิจัยขั้นสูงต่อไป

บทที่ 2

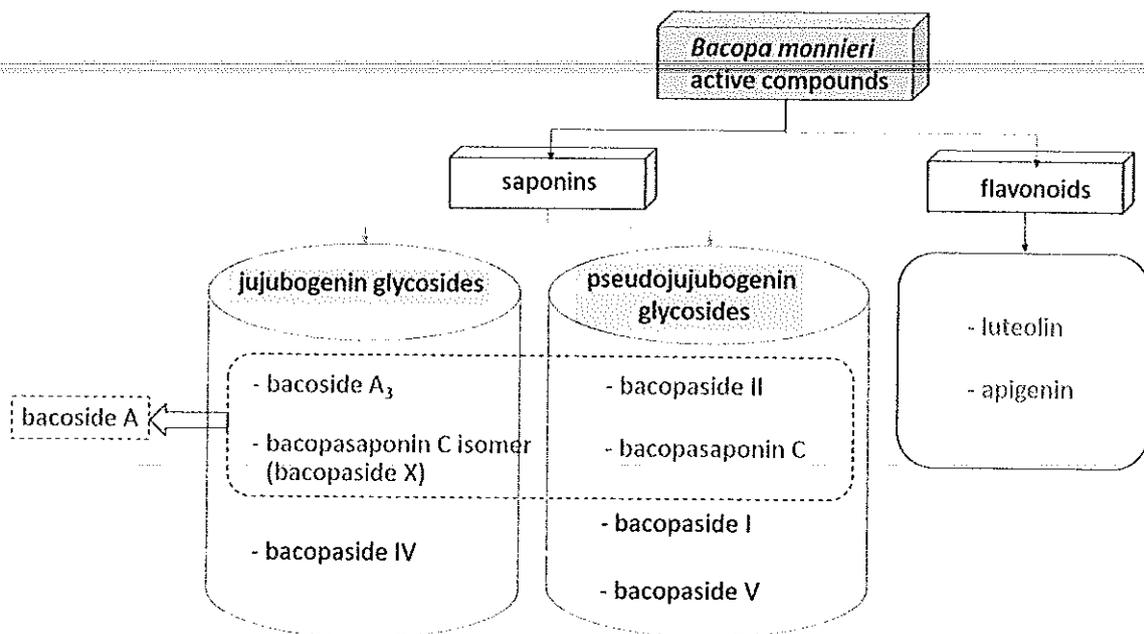
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตสูงสุดของประชากรทั่วโลก (World Health Organization, 2017; Roth et al., 2017; Mc Namara et al., 2019) โดยพบว่าภาวะความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่นำไปสู่โรคหัวใจและหลอดเลือด (Kjeldsen, 2018) ดังนั้นการควบคุมภาวะความดันโลหิตสูงจึงสามารถลดอัตราการเสียชีวิตได้ โดยปกติร่างกายมีกลไกการรักษาสมดุลร่างกาย มีการคลายตัวของหลอดเลือดเพื่อตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นการไหลของเลือดในร่างกาย

หลอดเลือดส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบซึ่งถูกควบคุมโดยระบบประสาทซิมพาเทติก (sympathetic) และสารที่หลั่งออกมาแบบเฉพาะที่ ทั้งจากเนื้อเยื่อและจากเซลล์เยื่อบุเรียกว่าเอนโดทีเลียม (endothelium) เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหดตัวหรือคลายตัวจะทำให้ขนาดของหลอดเลือดเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด ได้แก่ ความสามารถในการจุเลือด (compliance), ความต้านทานรวม (total peripheral resistance), ความดันเลือด (blood pressure) และอัตราการไหลของเลือด (blood flow) (กรองกาญจน์ สุทธิพันธ์, 2560)

เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดมีหน้าที่ควบคุมการคลายตัวของหลอดเลือด เพื่อควบคุมความดันโลหิตให้อยู่ในภาวะปกติ การสูญเสียการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือด (endothelial dysfunction) และ/หรือ การสะสมของไขมันที่ผนังหลอดเลือด จึงนำไปสู่การสูญเสียหน้าที่ในการคลายตัวของหลอดเลือดเพื่อตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของการไหลของเลือด ท้ายที่สุดจึงทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงได้ (Giles et al., 2012) ร่างกายควบคุมความดันโลหิตสูงหรือควบคุมการไหลของเลือดในหลอดเลือดที่เพิ่มขึ้นด้วยกลไกการคลายตัวของหลอดเลือด ซึ่งมีกลไกเชิงลึกที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือดจากการทำหน้าที่ของเซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือดเป็นหลัก มีการหลั่งสาร endothelial relaxing factor ที่สำคัญ คือ สารไนตริกออกไซด์ (nitric oxide), โปรสตาไซคลิน (prostacyclin) และ endothelial derived hyperpolarizing factors (EDHFs) (Brozovich et al., 2016) นอกจากนี้ กลไกการคลายตัวของหลอดเลือดยังเกี่ยวข้องกับการลดปริมาณแคลเซียมในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ผ่านกลไกการยับยั้งการไหลของอิออนผ่าน ion channels เช่น Ca^{2+} channels และ/หรือ K^+ channels (Brozovich et al., 2016)

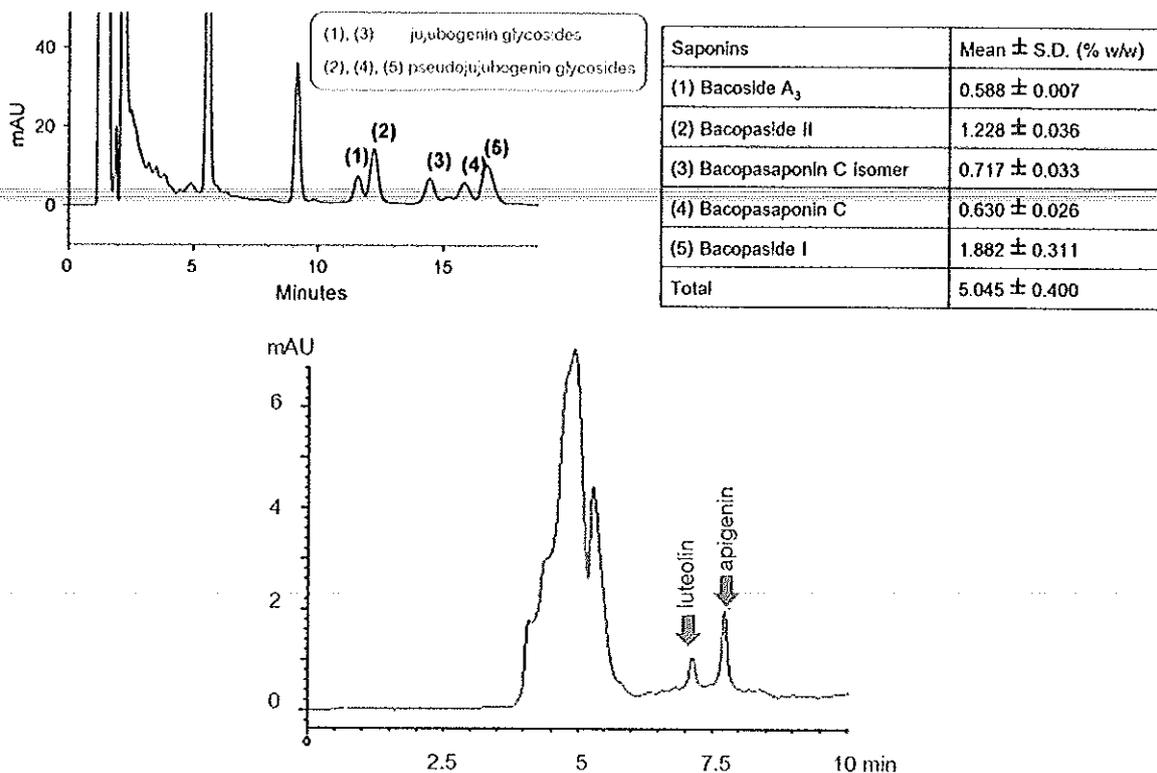
พรมมิ หรือ *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Scrophulariaceae) เป็นพืชที่ใช้บำรุงความจำในการแพทย์อายุรเวทของอินเดีย โดยใช้เป็นยาบำรุงประสาทและบำรุงหัวใจ (Thorne Research, 2004; Russo and Borrelli, 2005; Prasad, et al., 2008; Gohil and Patel, 2010) พรมมิมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบแสดงในรูปที่ 1 ดังต่อไปนี้



รูปที่ 1 สรุปสารสำคัญในสารสกัดพรมมิ

สารสำคัญของสารสกัดพรมมิ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม saponins และกลุ่ม flavonoids โดยสารกลุ่ม saponins แบ่งย่อยเป็นกลุ่ม juzubogenin glycosides ได้แก่ bacoside A₃, Bacopasaponin C isomer (bacopaside X) และ bacopaside IV และกลุ่ม pseudojuzubogenin glycosides ได้แก่ bacopasaponin C, bacopaside I, bacopaside II และ bacopaside V โดยสาร saponins ผสม (mixture saponins) เรียกว่า bacoside A ประกอบด้วย bacoside A₃, bacopaside II, bacopaside X และ bacopasaponin C นอกจากนี้ ยังพบว่าพรมมิมีสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ได้แก่

luteolin และ apigenin ดังแสดงในรูปที่ 2 (Deepak et al., 2005; Phrompittayarat, et al., 2007; Limpeanchob et al., 2008; Rajasekaran et al., 2014; Nuengchamnonng et al., 2016)



รูปที่ 2 HPLC chromatogram ของสารสกัดพรมมิ แสดงปริมาณของ saponins ที่พบในสารสกัดพรมมิ (ดัดแปลงจาก Phrompittayarat et al., 2007 และ Limpeanchob et al., 2008)

และ chromatogram ของสารสกัดพรมมิ (20 μ g/ml) แสดงสารสำคัญ flavonoids ได้แก่ luteolin และ apigenin (ดัดแปลงจาก Rajasekaran et al., 2014)

หลายงานวิจัยในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญ saponins มีประสิทธิภาพบำรุงความจำและปกป้องสมอง (neuroprotective effects) (Das et al., 2002; Dhanasekaran et al., 2007; Limpeanchob et al., 2008; Zhou et al., 2009; Uabundit et al., 2010; Vollala et al., 2010) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของพรมมิ ได้แก่ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation และลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากการลดปริมาณสารอนุมูลอิสระ

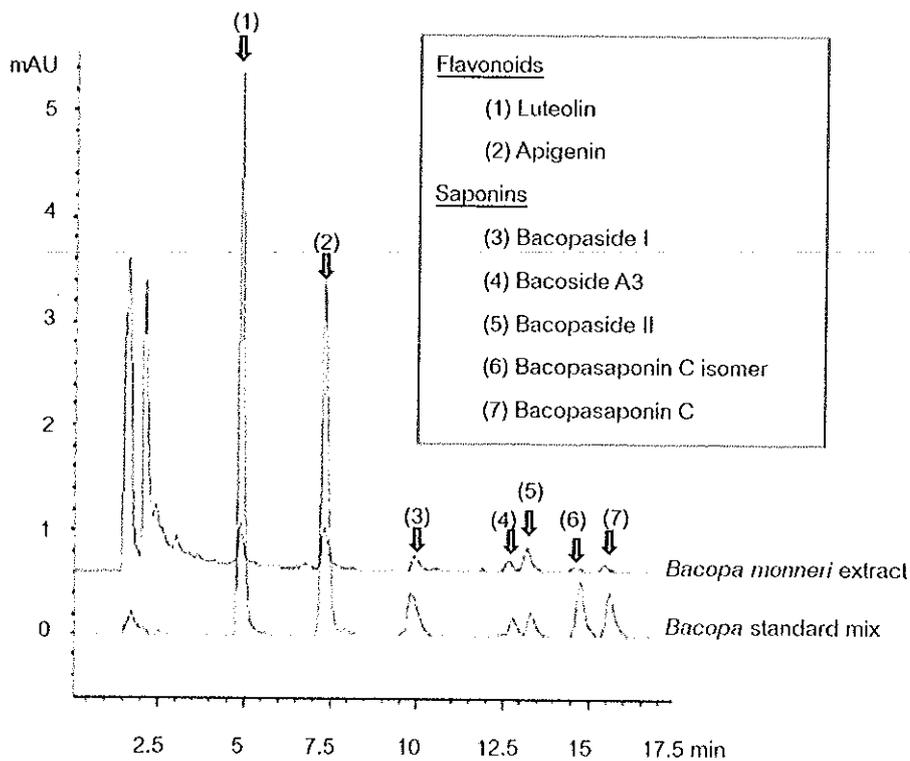
(intracellular ROS) ในเซลล์สมองหนู (Das et al., 2002; Limpeanchob et al., 2008) สารสกัดพรมมียังสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูกลุ่ม Alzheimer's disease โดยผ่านกลไกการลดสารอนุมูลอิสระและลดการสะสมของ beta-amyloid ในสมอง (Dhanasekaran et al., 2007; Uabundit et al., 2010; Kunte and Kuna 2013)

นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดพรมมีต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด พบว่าสารสกัดพรมมีมีฤทธิ์ปกป้องหัวใจ (cardioprotection) (Nandave et al., 2007) เพิ่มการไหลของเลือดที่หลอดเลือดหัวใจ (coronary blood flow) ที่ฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังขาดเลือด (ischemia/reperfusion injury) (Srimachai et al., 2016) ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพรมมีต่อหลอดเลือดในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารสกัดพรมมีทำให้หลอดเลือดแดงปอด (pulmonary arteries) และหลอดเลือดเอออร์ตา (aorta) ของกระต่ายคลายตัว ด้วยกลไกผ่านการกระตุ้น cyclooxygenase และการลดการไหลของแคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Dar and Channa 1997; 1999)

Kamkaew et al. (2011) ได้รายงานผลการวิจัย เมื่อฉีดสารสกัดพรมมี (20-60 mg/kg) เข้าหลอดเลือดดำโดยตรง พบว่าสามารถลดความดันเลือดในหนูได้ และยังคงแสดงผลของสารสกัดพรมมี (50-1000 µg/ml) ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงขนาดเล็กหลายชนิด โดยเฉพาะหลอดเลือดแดงที่ลำไส้ (mesenteric artery) พบว่ามีความไว (sensitive) ต่อสารสกัดพรมมี กล่าวคือพบว่ามี $IC_{50} = 171 \pm 31 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งสารสกัดพรมมีความเข้มข้น 500 µg/ml ทำให้เกิดการคลายตัวอย่างสมบูรณ์ 100% ขณะที่ความเข้มข้นนี้ในหลอดเลือด renal artery และ tail artery ทำให้เกิดการคลายตัวที่ 70% และ 50% ตามลำดับ และผู้วิจัยได้ศึกษาตัวอย่างสารสำคัญของพรมมี bacoside A₃ และ bacoside II ที่ความเข้มข้น 0.05-50 µM พบว่าทำให้หลอดเลือด mesenteric artery คลายตัว ($IC_{50} = 8.3 \pm 1.7 \mu\text{M}$ และ $19.5 \pm 6.3 \mu\text{M}$ ตามลำดับ) นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้แสดงฤทธิ์ของสารสกัดพรมมีที่มีต่อการคลายตัวของหลอดเลือด aorta พบว่าผ่านกลไกการหลั่งสาร nitric oxide จากเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด aorta และยังคงพบว่าสารสกัดพรมมียังทำให้หลอดเลือดแดงหาง (tail artery) คลายตัวผ่านกลไกการยับยั้งการไหลของแคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์และการหลั่งแคลเซียมไอออนจาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด tail artery (Kamkaew et al., 2011) นอกจากนี้ มีรายงานว่า flavonoids ได้แก่ luteolin (10-100 µM) ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด

เลออร์ตา (PE- or potassium contracted aorta) ด้วยกลไกการยับยั้ง endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Si et al., 2014)

เมื่อเร็วๆ นี้ Sumathi et al. (2011) ได้แสดง HPLC chromatogram ของสารสำคัญของสารสกัดพรมมิ ดังแสดงในรูปที่ 3 อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าสารสำคัญใด เป็นสารสำคัญหลักในการทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด งานวิจัยนี้จึงต้องการเปรียบเทียบผลของสารสำคัญกลุ่ม saponins และกลุ่ม flavonoids ที่มีต่อฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือด mesenteric artery และหากกลไกที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือดดังกล่าว



รูปที่ 3 HPLC chromatogram ที่วางซ้อนกันของ *Bacopa monnieri* extract และ *Bacopa* standard mix แสดงสารสำคัญกลุ่ม saponins และสารสำคัญกลุ่ม flavonoids (ดัดแปลงจาก Sumathi et al., 2011)

งานวิจัยนี้ มีขอบเขตของการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* study) แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ (mesenteric arteries) ของหนูขาว (rats) โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสำคัญกลุ่ม saponins ได้แก่ bacopaside I และ bacoside A เปรียบเทียบกับสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ได้แก่ luteolin และ apigenin รวมทั้งศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือด ได้แก่ บทบาทของ endothelial nitric oxide (eNOS) และ กลไกที่เกี่ยวข้องกับการไหลของแคลเซียมอิออนของเซลล์หลอดเลือด

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ได้รับอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยภาพรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลขอนุมัติโครงการ 600710 (ตั้งเอกสารแนบภาคผนวก) สัตว์ทดลองที่จะใช้สำหรับงานวิจัยนี้ใช้หนูขาว (Sprague Dawley rats) เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 200-250 กรัม โดยสั่งซื้อจากบริษัท สยามโนมูระ จำกัด หนูทั้งหมดถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยมาตรฐาน ในการเลี้ยงเป็นไปตามเกณฑ์ที่สถานสัตว์ทดลองกำหนด

2. สารสำคัญของสารสกัดพรมมิ

สารสำคัญกลุ่ม saponins ได้แก่ bacoside A, bacopaside I และ flavonoids ได้แก่ luteolin, apigenin ซึ่งซื้อจากบริษัท ดังนี้ Luteolin (lot 126M4061V) และ apigenin (lot WE445301/1) จาก Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) ส่วน Bacoside A (lot 00002005-003) และ bacopaside I (lot 00002002-T17H) จาก ChromaDex, Inc. (Irvine, CA, USA).

3. วิธีการวิจัย

3.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญสารสกัดพรมมิที่มีต่อหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้

สัตว์ทดลองเสียชีวิตอย่างสงบโดยการฉีดยาสลบ thiopental sodium (100 mg/kg BW) ทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) หลังจากสัตว์ทดลองสลบ (ทดสอบโดยการใช้ forceps หนีบที่อุ้งเท้าแล้วหนูไม่รู้สึก) จึงเปิดช่องอกแล้วตัดชั่วหัวใจโดยทันทีแล้วจึงแยกหลอดเลือดแดงในส่วนลำไส้ (mesenteric artery) ตัดเป็นชิ้นเล็ก (2-5 mm) แล้วนำไปแขวนใน chambers ของ organ bath ที่มีสารละลาย Krebs solution มีส่วนประกอบคือ NaCl 122 mM; KCl 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES) 10 mM; KH_2PO_4 0.5 mM; NaH_2PO_4 0.5 mM; MgCl_2 1 mM; glucose 11 mM and CaCl_2 1.8 mM และ ปรับ pH = 7.3 ด้วย NaOH ตลอดการทดลองจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส หลอดเลือดที่แยกได้แล้วจะถูกแขวนด้วยแรงดึงที่ระดับ optimal tension (1 กรัม) และ ทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงก่อนทำการ

ทดลองโดยเปลี่ยน Krebs solution ทุกๆ 10-15 นาที การตอบสนองของหลอดเลือดจะถูกวัดในรูปการเปลี่ยนแปลงของแรงดึงตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการหยดสารสำคัญที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแดงแขวนอยู่ โดยแรงที่เกิดขึ้นถูกแปลงสัญญาณโดย force transducer เชื่อมกับ MacLab (ADInstrument, Sydney, Australia) และแสดงผลทางคอมพิวเตอร์ การศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญ สารสกัดพรมที่มีต่อหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ มีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 ศึกษากลไกของสารสำคัญสารสกัดพรมต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

ทำให้หลอดเลือดหดตัวด้วยสาร 10 μM phenylephrine (α_1 -receptor agonist) เมื่อหลอดเลือดหดตัวในระดับที่คงที่แล้ว จึงหยดสารสำคัญความเข้มข้น 0.1-100 μM ลงใน organ bath บันทึกค่าแรงหดตัวที่เปลี่ยนแปลงไป การทดลองนี้แบ่งเป็น

- (1) กลุ่มที่ให้สารสำคัญที่หลอดเลือดปกติ (endothelium-intact vessel)
- (2) กลุ่มที่ให้สารสำคัญที่หลอดเลือดที่ปราศจากเอนโดทีเลียม (endothelium-denuded vessel)
- (3) กลุ่มที่ให้สารสำคัญที่หลอดเลือดปกติซึ่งหยดก่อนด้วยสาร L-NAME (eNOS inhibitor)

3.1.2. ศึกษากลไกของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าเซลล์

หลอดเลือดที่ปราศจากเอนโดทีเลียม (endothelium-denuded vessel) ถูกแขวนใน Ca^{2+} -free Krebs solution เป็นเวลา 30 นาที จึงเปลี่ยนเป็น Ca^{2+} free 80 mM K^+ solution เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเปิดของ voltage-dependent Ca^{2+} channels จากนั้นจึงทำให้หลอดเลือดหดตัวด้วยการหยดสารละลาย 0.01-10 mM CaCl_2 เพิ่มความเข้มข้นตามลำดับ เมื่อหลอดเลือดหดตัวจนถึงจุดสูงสุดจึงล้างด้วย Krebs solution และใส่ Ca^{2+} -free Krebs solution เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย Ca^{2+} free 80 mM K^+ solution ซ้ำอีกครั้ง และ pre-incubate เป็นเวลา 10 นาที ด้วย Ca^{2+} -free Krebs solution (control) หรือ สารสำคัญสารสกัดพรมที่มีความเข้มข้น 10 μM หรือ nifedipine (antagonist of voltage-dependent Ca^{2+} channels) ที่ความเข้มข้น 1 μM

3.1.3 ศึกษากลไกของสารสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมออกจาก sarcoplasmic reticulum

แขวนหลอดเลือดใน 80 mM K^+ Krebs solution เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วย Ca^{2+} -free Krebs solution (Ca^{2+} free + 1 mM EGTA) เป็นเวลา 10 นาที ต่อมาทำให้หลอดเลือดหดตัวด้วย 10 μ M PE จากนั้นจึงล้างด้วย Krebs solution และทำซ้ำในขั้นตอนข้างต้น โดยเปลี่ยนจาก Ca^{2+} -free Krebs solution เป็น Ca^{2+} -free Krebs solution ที่มีสารสำคัญสารสกัดพรมมิ เปรียบเทียบความแรงในการหดตัวของหลอดเลือด

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SEM) ข้อมูลการทดลองเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่ม โดยใช้สถิติในการวิเคราะห์ ANOVA และ post-hoc Tukey test ส่วน EC_{50} และ E_{max} ใช้ unpaired Student's *t* test โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p -value < 0.05 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 5.00 for Windows, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

บทที่ 4
ผลการวิจัย

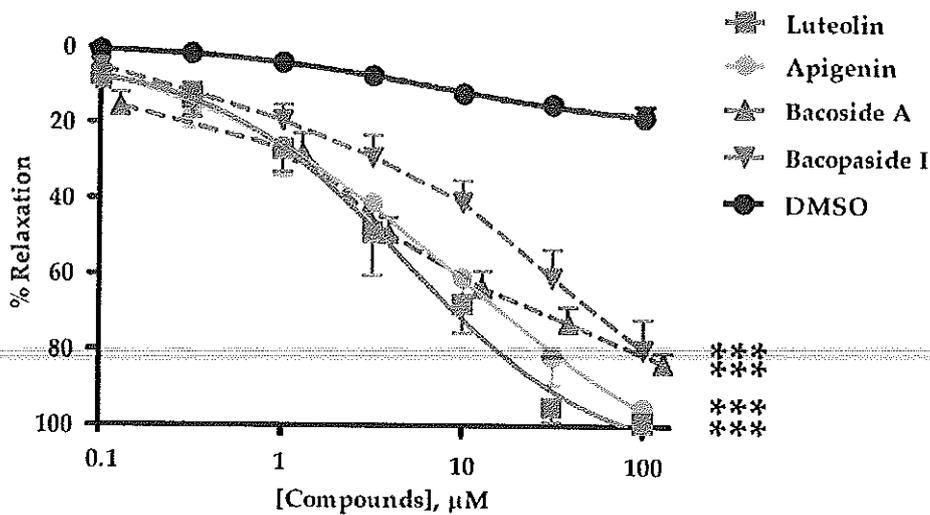
1 ผลของสารสำคัญสารสกัดพรมมีต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

เมื่อแยกหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ (mesenteric artery) ของหนูออกมา แล้วนำหลอดเลือดแขวนใน organ bath ทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อนด้วยสาร 10 μM phenylephrine แล้วหยดสารสำคัญของพรมมี กลุ่ม saponins ได้แก่ bacopaside I และ bacoside A และกลุ่ม flavonoids ได้แก่ luteolin และ apigenin ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 100 μM พบว่าสารสำคัญของพรมมีทั้งสองกลุ่มทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดที่มี เอนโดทีเลียม (endothelial intact artery; +EC) ซึ่งการคลายตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสาร (concentration-dependent manner) โดยมีค่า IC_{50} และ E_{max} แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผล IC_{50} และ E_{max} ของสารสำคัญสารสกัดพรมมีต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ปกติ

Active compounds		EC_{50} (μM)	E_{max} (%)	n	p-value whole graph curves
Flavonoids	Luteolin	4.35 \pm 1.31	99.4 \pm 0.7	6	-
	Apigenin	8.93 \pm 3.33	95.3 \pm 2.6	9	NS
Saponins	Bacoside A	10.8 \pm 5.9	83.6 \pm 2.9 ††	7	< 0.05 †
	Bacopaside I	14.6 \pm 5.4	79.9 \pm 8.2 †	7	< 0.01 ††
Vehicle	DMSO	-	17.4 \pm 3.1 ††	7	< 0.01 ††

Significantly different compared with luteolin † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$
using unpaired Student's *t*-test (n = 6-9).

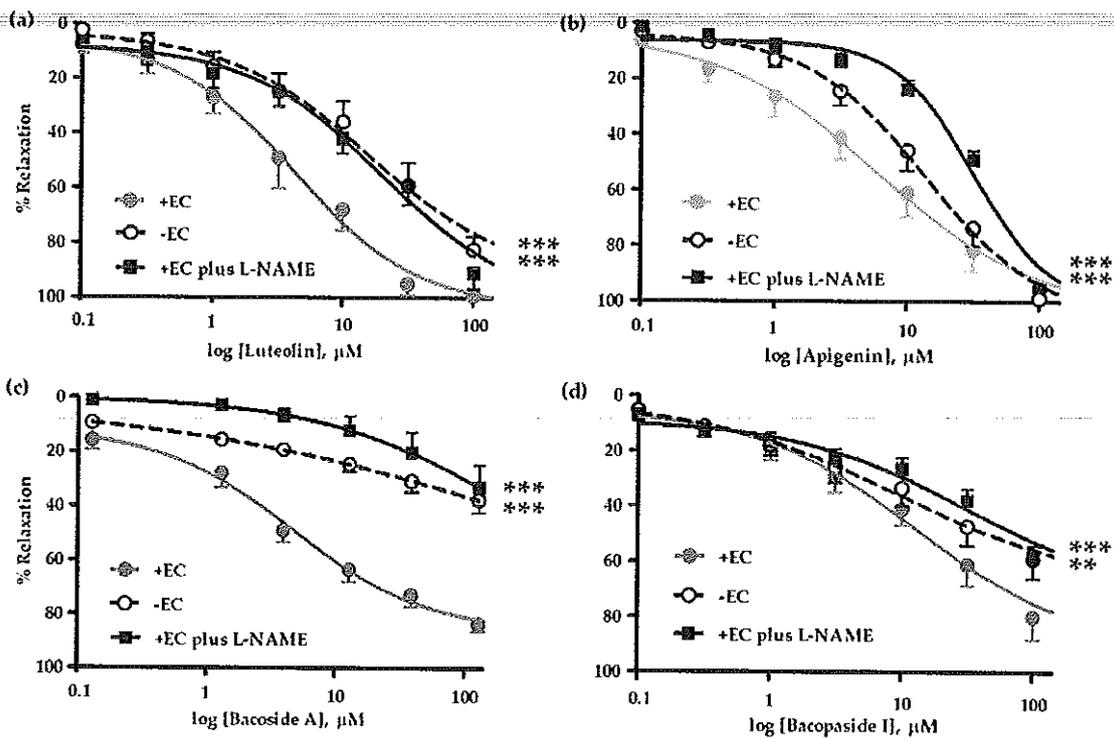


รูปที่ 4 ผลของสารสำคัญของสารสกัดพรมมิ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 100 μM ที่มีต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดงส่วนลำไส้ที่มีเอ็นโดทีเลียม แสดงเป็น % Relaxation ต่อสารสำคัญของพรมมิ ได้แก่ apigenin, luteolin, bacoside A, bacopaside I และ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 100 μM และมี DMSO เป็นตัวทำละลาย (negative control) แสดงค่าเป็น mean \pm SEM of 6-9 individual arteries $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ each compound compared with intact vessels (+EC) โดยใช้สถิติ two-way ANOVA (n = 6-9)

2 กลไกของสารสำคัญสารสกัดพรมมิต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

สารสำคัญของพรมมิทำให้หลอดเลือดคลายตัวทั้งในหลอดเลือดที่มีเอ็นโดทีเลียม (endothelium) หรือ intact และหลอดเลือดที่ปราศจาก endothelium หรือ denuded แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของสารสำคัญทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดน้อยลง ในหลอดเลือด denuded จึงบ่งบอกได้ว่าสารสำคัญของพรมมิทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับ endothelium หรือ vasodilators ที่หลังจาก endothelium และสารสำคัญยังสามารถทำให้หลอดเลือดที่ปราศจาก endothelium คลายตัวได้ ซึ่งการคลายตัวดังกล่าวเป็นกลไกของสารสำคัญที่มีต่อ smooth muscle cell ของหลอดเลือดโดยตรง

กลุ่มที่ให้สารสำคัญที่หลอดเลือดปกติ ซึ่งหยดก่อนด้วยสาร L-NAME (eNOS inhibitor) พบการคลายตัวของหลอดเลือดลดลงน้อยลง ซึ่งการคลายตัวของหลอดเลือดลดลงมาเท่ากับหลอดเลือดที่ปราศจาก endothelium ดังนั้น การคลายตัวของหลอดเลือดของสารสำคัญจึงมีกลไกผ่านการกระตุ้น nitric oxide pathway เป็นหลักสำคัญ แสดงในรูปที่ 5 ค่า EC_{50} และ E_{max} ของสารสำคัญแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 5 ผลการคลายตัวของหลอดเลือด mesenteric artery แสดงเป็น % Relaxation ต่อสาร (a) luteolin, (b) apigenin, (c) bacoside A และ (d) bacopaside I ในช่วงความเข้มข้น 0.1-100 μ M โดยเปรียบเทียบการคลายตัวของหลอดเลือดระหว่างหลอดเลือด intact (+EC) หลอดเลือด denuded (-EC) และหลอดเลือด intact ที่ pre-incubate ด้วยสาร L-NAME ในแต่ละความเข้มข้นของสาร แสดงค่าเป็น mean \pm SEM of 6-9 individual arteries $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ each compound compared with intact vessels (+EC) โดยใช้สถิติ two-way ANOVA (n = 6-9)

ตารางที่ 2 EC_{50} และ E_{max} ของสารสำคัญของสารสกัดพรมมิต่อ relaxations of endothelial intact (+EC), denuded (-EC) ในหลอดเลือด mesenteric arterial rings หรือ endothelial intact arteries with L-NAME

Active compounds	EC_{50} (μ M)	E_{max} (%)	n
Luteolin			
+EC	4.35 \pm 1.31	99.35 \pm 0.66	6
-EC	21.90 \pm 5.86 †	82.42 \pm 4.65 ††	6
+EC plus L-NAME	14.99 \pm 3.56 †	90.85 \pm 5.85	6
Apigenin			
+EC	8.93 \pm 3.33	95.27 \pm 2.61	9
-EC	12.80 \pm 2.54	98.81 \pm 1.19	8
+EC plus L-NAME	25.62 \pm 3.38 ††	94.40 \pm 2.10	7
Bacoside A			
+EC	10.81 \pm 5.95	83.60 \pm 2.86	7
-EC	14.50 \pm 6.30	37.90 \pm 4.72 ††	6
+EC plus L-NAME	33.81 \pm 6.25 †	33.16 \pm 8.41 ††	5
Bacopaside I			
+EC	14.63 \pm 5.36	79.94 \pm 8.17	7
-EC	17.29 \pm 4.75	58.97 \pm 7.05 †	7
+EC plus L-NAME	25.38 \pm 4.33	58.45 \pm 4.21 †	7

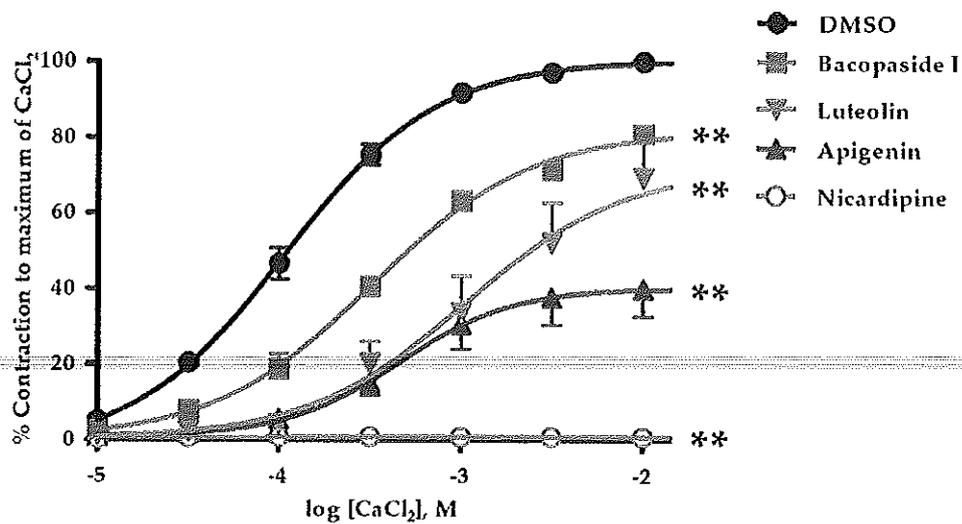
เปรียบเทียบ EC_{50} or E_{max} of each component +EC vs. -EC or +EC plus L-NAME.

† $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ โดยใช้สถิติ unpaired Student's *t*-test.

3 กลไกของสารสกัดต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าเซลล์

การหดตัวของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น เมื่อเหนี่ยวนำโดยการหยด CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.01-10 mM ใน Krebs solution ที่ปราศจาก Ca^{2+} ซึ่งเกิดจากกลไกการกระตุ้นการเปิดของ voltage-operated Ca^{2+} channel (VOCC) ด้วย 80mM K^+ Ca^{2+} free Krebs solution และเมื่อหยด CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.01-10 mM ทำให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าเซลล์และท้ายที่สุดทำให้หลอดเลือดหดตัว

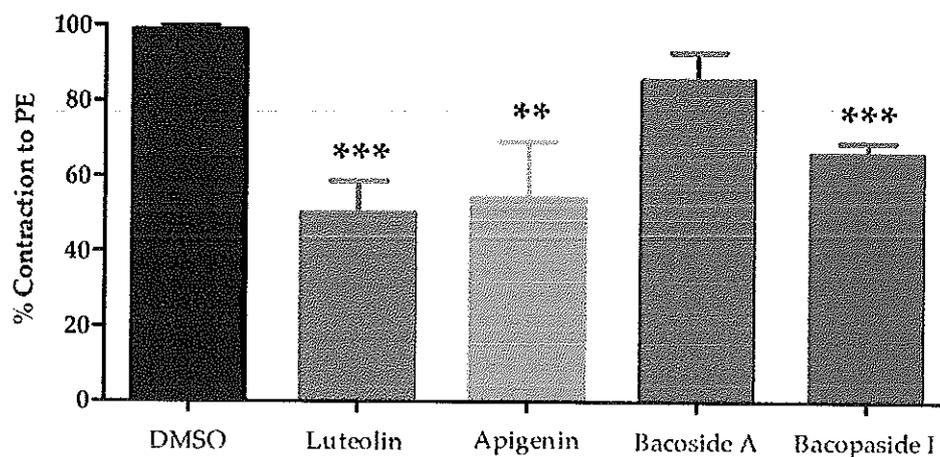
เมื่อ pre-incubation ด้วยสารสำคัญของสมุนไพรพรมมิ ได้แก่ Bacopaside I, Luteolin และ Apigenin ที่ความเข้มข้น 10 μM เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ลดการหดตัวของหลอดเลือด denuded mesenteric เมื่อหยด CaCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.01-10 mM ซึ่งทำให้กราฟมี rightward shift จากกราฟ control และลดการหดตัวสูงสุด (maximum contraction; E_{max}) ของ control, bacopaside I, luteolin และ apigenin ได้แก่ 100 ± 1.3 , 81.9 ± 1.7 , 72.0 ± 6.7 และ $40.2 \pm 3.5\%$ ตามลำดับ ขณะที่ Nicardipine (1 μM) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเปิดของ VOCC ลดการหดตัวของหลอดเลือด denuded mesenteric artery ได้โดยสมบูรณ์



รูปที่ 6 กราฟแสดงการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อเหนี่ยวนำโดย CaCl_2 (CaCl_2 induced contraction) ซึ่งแสดง control และกราฟที่ pre-incubate ด้วยสารสำคัญของสมุนไพร ได้แก่ Bacopaside I, Luteolin และ Apigenin ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ และสารที่ยับยั้งการไหลเข้าของ Ca^{2+} (Nicardipine; ความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$) ต่อการไหลเข้าของ Ca^{2+} เข้าเซลล์ (Ca^{2+} influx) ในหลอดเลือด denuded mesenteric artery แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การหดตัวของหลอดเลือด (% contraction to maximum contraction) จำนวนเทียบกับผลการหดตัวสูงสุดเมื่อหยด Ca^{2+} ในครั้งแรก (first Ca^{2+} applications) แสดงค่าเป็น Mean \pm SEM of 4-6 individual arteries $**p < 0.01$ each of the active compounds compared to DMSO โดยใช้สถิติ two-way ANOVA ($n = 4-6$).

4. กลไกของสารสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของแคลเซียมออกจาก sarcoplasmic reticulum

เมื่อเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดหดตัว ด้วยกลไกการกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่หรือหลั่งของ Ca^{2+} ออกจาก sarcoplasmic reticulum (SR) ซึ่งเหนี่ยวนำด้วยการหยด PE (10 μ M) ทำให้เกิดการหดตัวแบบ transient contraction แสดงเป็น % contraction to PE ในครั้งที่สองที่ pre-incubate ด้วยสารสำคัญเปรียบเทียบกับ การหยดครั้งแรกที่ปราศจากสารสำคัญ ดังนี้ control, apigenin, luteolin, bacoside A และ bacopaside I ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด contractions 98.8 ± 1.2 , 50.1 ± 8.5 , 54.3 ± 14.9 , 85.8 ± 7.2 และ $66.2 \pm 2.9\%$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ % contraction กับ control แสดงการลดลงของการหดตัวของหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง luteolin, apigenin และ bacopaside I มี *p*-value ดังนี้ $p < 0.001$, < 0.01 และ < 0.001 ตามลำดับ



รูปที่ 7 กราฟแสดงการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อเหนี่ยวนำโดย phenylephrine (PE-induced contraction) ซึ่งแสดงใน control และผลการยับยั้งการหดตัวเมื่อ pre-incubate ด้วยสารสำคัญของสมุนไพร ได้แก่ luteolin, apigenin, bacoside A และ bacopaside I ที่ความเข้มข้น 10 μ M ต่อการหลั่งของ Ca^{2+} (Ca^{2+} release) จาก Ca^{2+} store หรือ sarcoplasmic reticulum ในหลอดเลือด denuded mesenteric artery กราฟแสดงเป็น % contraction to PE แสดงค่าเป็น mean \pm SEM of 5-6 individual arteries ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 each of the active compounds compared with control โดยใช้สถิติ unpaired Student's *t*-test (*n* = 5-6)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ศึกษาเชิงเปรียบเทียบในกลไกการคลายตัวของสารกลุ่ม saponins (โดยเฉพาะ bacoside A และ bacopaside I) และสารกลุ่ม flavonoids ที่สำคัญ ได้แก่ luteolin และ apigenin ซึ่งมีความแรง (potency) มากที่สุด (EC_{50} 4.4 และ 8.9 μ M ตามลำดับ) (รูปที่ 1) แต่สารกลุ่ม flavonoids นี้พบในสารสกัดพรมมีเพียง 1 ใน 20 เท่าของสารกลุ่ม saponins ได้แก่ bacoside A และ bacopaside I (Saesong et al., 2019; ภาคผนวก HPLC chromatogram) ดังนั้น ในแง่ของฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดโดยรวมของสารสกัดพรมมีจึงน่าจะมาจากสารกลุ่ม saponins เป็นส่วนใหญ่ มากกว่าสารกลุ่ม flavonoids

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความแรง (potency) ของกลุ่ม aglycone flavonoids มีมากกว่า saponins glycosides ขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างโมเลกุลที่มีหมู่น้ำตาล (sugar moieties) อาจจะไปขัดขวางปฏิกิริยากับตำแหน่ง (binding site) ของโมเลกุลที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการคลายตัวของหลอดเลือด ดังเช่นรายงานว่าสารกลุ่ม lipophilic groups ในโครงสร้างวงแหวนของ flavonoids ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการคลายตัวของหลอดเลือด (Wu et al., 2006) นำไปสู่พื้นฐานสำหรับการศึกษากลไกระดับโมเลกุลของการคลายตัวของหลอดเลือดของสารกลุ่ม flavonoids คณะผู้วิจัยจึงศึกษากลไกการการคลายตัวของหลอดเลือดของสารกลุ่ม flavonoids และกลุ่ม saponins ในหลอดเลือดส่วนลำไส้ที่ปราศจากเอนโดทีเลียม ซึ่งลดการคลายตัวของหลอดเลือด (รูปที่ 2) ส่วนกลไกการคลายตัวของสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ nitric oxide (NO) โดยใช้ eNOS inhibitor (L-NAME) พบว่า L-NAME เพิ่ม EC_{50} และลด E_{max} ซึ่งเหมือนกับผลของการนำเอนโดทีเลียมออก (denudation) จึงบ่งชี้ว่าการคลายตัวของหลอดเลือดเกี่ยวข้องกับ NO เป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jin et al. (2009) ที่แสดงว่า cyclooxygenase (COX) inhibitor ไม่มีผลต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย apigenin และยังคงสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในสารสกัดพรมมีของคณะผู้วิจัย ที่พบว่า indomethacin ไม่มีผลกระทบต่อการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารสกัดพรมมี (Kamkaew et al., 2011)

ในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดมี L-type Ca^{2+} channels ซึ่งตอบสนองต่อ depolarisation จึงทำให้ Ca^{2+} ไหลเข้าเซลล์ และนำไปสู่การหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ผลการศึกษาพบว่าสารสำคัญ ได้แก่ luteolin

apigenin และ bacopaside I ใน denuded vessels ทำให้การหดตัวที่กลไกที่เกี่ยวข้อง Ca^{2+} ไหลเข้าลดลง ซึ่ง effective ของ apigenin มีมากกว่า luteolin แต่ขณะที่ apigenin ทำให้เกิดการคลายตัวน้อยกว่า จึงบอกเป็นนัยถึง heterogeneity ในกลไกของ flavonoids

กลไกการหลั่งของ Ca^{2+} (Ca^{2+} release) ออกจาก intracellular stores ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด สารสำคัญ ได้แก่ luteolin apigenin และ bacopaside I สามารถยับยั้งกลไกการหลั่งของ Ca^{2+} อย่างไรก็ตาม bacopaside A ไม่มีผลดังกล่าว ซึ่งน่าจะเกิดจาก heterogeneity ของสารที่แตกต่างกัน

K^+ channels มีบทบาทต่อการควบคุมการหดตัวคลายตัวของหลอดเลือด ซึ่ง Jiang et al. (2005) รายงานว่า luteolin สามารถยับยั้ง Ca^{2+} channels และยับยั้งการหลั่งของ stored Ca^{2+} ขณะที่กระตุ้น K^+ channels ดังนั้น กลไกของ apigenin, bacopaside A และ bacopaside I ที่เกี่ยวข้องกับ K^+ channels สามารถต่อยอดการศึกษาในอนาคต

การศึกษานี้เป็นการยืนยันผลของ Si et al. (2014) ว่า luteolin มีผลโดยตรงต่อ vascular endothelial cells โดยเหนี่ยวนำ eNOS phosphorylation ที่ตำแหน่ง Ser1177 และนำไปสู่ NO production นอกจากนี้ ยังยืนยันผลของ flavonoids ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดและปกป้องการคลายตัวของหลอดเลือดที่สูญเสียไปจาก oxidative stress (Ma et al., 2008; Jin et al. 2009; Qian et al., 2010) และ diabetes (El-Bassossy et al., 2018) อย่างไรก็ตาม ผลการปกป้องหลอดเลือดของ saponins ยังต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

โดยสรุป การศึกษานี้แสดงผลของสารสำคัญของสารสกัดพรมมิ ได้แก่ สารสำคัญกลุ่ม saponins และ flavonoids ที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดส่วนลำไส้ที่แยกจากหนู ด้วยกลไกบางส่วนผ่านเอนโดทีเลียม หลังสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว และกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยตรง ด้วยกลไกยับยั้ง Ca^{2+} influx และ Ca^{2+} release จาก SR การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่แสดงการคลายตัวของหลอดเลือดในเชิงเปรียบเทียบผลของ saponins และ flavonoids ที่พบในสารสกัดพรมมิ ซึ่ง flavonoids ได้แก่ luteolin และ apigenin แสดง potency หรือความแรงในการคลายตัวมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม saponins มีผลต่อการคลายตัวโดยสุทธิของสารสกัดมากกว่าเนื่องจากปริมาณที่พบมากกว่าในสารสกัดพรมมิ การศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์ในเชิงคลินิกต่อผลการเพิ่มการไหลของเลือด หรือเพิ่มความจำซึ่งเกิดจากการรวมฤทธิ์ (combination) ของ flavonoids และ saponins

บรรณานุกรม

- Aaronson, P.I. & Ward, J.P.T. (2008). *The cardiovascular system at a glance* (3rd ed.). Singapore: Blackwell Publishing.
- Brozovich, F. V., Nicholson, C. J., Degen, C. V., Gao, Y. Z., Aggarwal, M. and Morgan, K. G. (2016). Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. *Pharmacological Reviews*, 2(68), 476. doi:10.1124/pr.115.010652
- Dar, A. & Channa, S. (1997). Relaxant effect of ethanol extract of *Bacopa monniera* on trachea, pulmonary artery and aorta from rabbit and guinea-pig. *Phytotherapy Research*, 11, 323-325.
- Dar, A. & Channa, S. (1999). Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 167-174.
- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S. & Singh, H.K. (2002). A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, 893-900.
- Deepak, M., Sangli, G. K., Arun, P. C. & Amit, A. (2005). Quantitative determination of the major saponin mixture bacoside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 16, 24-29.
- Dhanasekaran, M., Tharakan, B., Holcomb, L.A., Hitt, A.R., Young, K.A. & Manyam, B.V. (2007). Neuroprotective mechanisms of Ayurvedic antidementia botanical *Bacopa monniera*. *Phytotherapy Research*, 21, 965-969.
- El-Bassossy, H. M., Abo-Warda, S. M. and Fahmy, A. (2013). Chrysin and luteolin attenuate diabetes-induced impairment in endothelial-dependent relaxation: Effect on lipid profile, AGEs and NO generation. *Phytother Res*, 11(27), 1678-1684. doi:10.1002/ptr.4917
- Giles, T. D., Sander, G. E., Nossaman, B. D. and Kadowitz, P. J. (2012). Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing

2 04
581
-2.
01853
2562
1038538



factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 4(14), 198-205. doi:10.1111/j.1751-7176.2012.00606.x

11 2 2564

- Gohil, K.J. & Patel, J.A. (2010). A review on *Bacopa monniera*: Current research and future prospects. *International Journal of Green Pharmacy*, 4 (Suppl. 1), 1-9.
- Jiang, H., Xia, Q., Wang, X., Song, J. and Bruce, I. C. (2005). Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Pharmazie*, 6(60), 444-447.
- Jin, B.H.; Qian, L.B.; Chen, S.; Li, J.; Wang, H.P.; Bruce, I.C.; Lin, J.; Xia, Q. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* 2009, 616, 200-205.
- Kamkaew, N., Scholfield, C. N., Ingkaninan, K., Maneesai, P., Parkington, H. C., Tare, M., et al. (2011). *Bacopa monnieri* and its constituents is hypotensive in anaesthetized rats and vasodilator in various artery types. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (Suppl. 1), 790-795.
- Kunte, K.B. & Kuna, Y. (2013). Neuroprotective effect of *Bacopa monniera* on memory deficits and ATPase system in Alzheimer's disease (AD) induced mice. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 2, 719-735.
- Kjeldsen, S. E. (2018). Hypertension and cardiovascular risk: General aspects. *Pharmacol Res.* 129, 95-99. doi:10.1016/j.phrs.2017.11.003
- Limpeanchob, N., Jaipan, S., Rattanakaruna, S., Phrompittayarat, W. & Ingkaninan, K. (2008). Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 112-117.
- Ma, X., Li, Y. F., Gao, Q., Ye, Z. G., Lu, X. J., Wang, H. P., et al. (2008). Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life Sci*, 3-4(83), 110-117. doi:10.1016/j.lfs.2008.05.010

- Mc Namara, K., Alzubaidi, H. and Jackson, J. K. (2019). Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integrated pharmacy research & practice*, 8, 1-11. doi:10.2147/IPRP.S133088
- Nuengchamnong, N., Sookying, S. & Ingkaninan, K. (2016). LC-ESI-QTOF-MS based screening and identification of isomeric jujubogenin and pseudojujubogenin aglycones in *Bacopa monnieri* extract. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29 (Suppl. 129), 121-134, doi: 10.1016/j.jpba.2016.06.052
- Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K. & Ingkaninan, K. (2007). An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Analytica Chimica Acta*. 584, 1-6.
- Prasad, R., Bagde, U.S., Puspangadan, P. & Varma, A. (2008). *Bacopa monniera* L.: Pharmacological aspects and case study involving *Piriformospora indica*. *International Journal of Integrative Biology*, 3(Suppl. 2), 100-110.
- Qian, L.B.; Wang, H.P.; Chen, Y.; Chen, F.X.; Ma, Y.Y.; Bruce, I.C.; Xia, Q. Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress. *Pharmacol. Res.* 2010, 61, 281-287.
- Rajasekaran, A., Saralithikumar, N., Kalaiselvan, V. & Kalaivani, M. (2014). Simultaneous estimation of Luteolin and Apigenin in methanol leaf extract of *Bacopa monnieri* Linn by HPLC. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(Suppl. 13), 1629-1637.
- Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abyu, G., et al. (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology*, 1(70), 1-25. doi:10.1016/j.jacc.2017.04.052
- Russo, A. & Borrelli, F. (2005). *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine*, 12, 305-317.

- Saesong, T., Temkithawon, P., Nangngam, P. and Ingkaninan, K. (2019). Pharmacognostic and physico-chemical investigations of the aerial part of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *SJST*, (41), 397-404.
- Si, H., Wyeth, R. P. & Liu, D. (2014). The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *European Journal of Nutrition*, 53 (Suppl. 1), 269–275.
- Sumathi, T., Nathiya, V. C., & Sakthikumar, M. (2011). Protective effect of Bacoside-A against morphine-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73(Suppl. 4), 409–415.
- Thome Research (2004). *Bacopa monniera*. *Alternative Medicine Review*, 9, 79-85.
- Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S. & Ingkaninan, K. (2010). Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 26-31.
- Vollala, V. R., Upadhyaya, S. & Nayak, S. (2010). Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on learning and memory in rats: A behavioral study. *Journal of Veterinary Behavior Clinical Applications and Research*. 5, 69-74.
- World Health Organization (2017). Fact sheet on cardiovascular diseases. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Accessed June 16, 2019.
- Wu, H., Jiang, H., Wang, L. and Hu, Y. (2006). Relationship between vasorelaxation of flavonoids and their retention index in RP-HPLC. *Pharmazie*, 8(61), 667-669.
- Zhou, Y., Peng, L., Zhang, W. & Kong, D. (2009). Effect of triterpenoid saponins from *Bacopa monniera* on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Planta Medica*, 75, 568-574.
- Zhang, J., Onakpoya, I. J., Posadzki, P., & Eddouks, M. (2015). The safety of herbal medicine: from prejudice to evidence. *Evid Based Complement Alternat Med*, 316706-316706. doi:10.1155/2015/316706

กรรณก อิงคินันท์ (2561). พรหมมี สมุนไพรรักษาความจำ. พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร; ISBN:

978-616-426-100-6, หน้า 2

กรองกาญจน์ ชูทิพย์ (2560). สรีรวิทยาระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดกับการประยุกต์ใช้ทางเภสัชวิทยา.

พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร; ISBN: 978-616-426-013-9, หน้า 219

ภาคผนวก

เอกสารรับรองโครงการ (Approval animal ethic)



เอกสารรับรองโครงการ

คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร (คกส.)

ชื่อโครงการ	ฤทธิ์ของสารสำคัญสมุนไพรมณีต่อการป้องกันหัวใจขาดเลือดและการคลายตัวของหลอดเลือดแดงในหนูขาว Effect of Bacopa monnieri active compounds on rat myocardial infarct protection and vasorelaxation of rat isolated arteries
เลขที่โครงการ	NU-AE600710
เลขที่เอกสารรับรอง	60 01 012
ประเภทการรับรอง	เต็มรูปแบบ
ชื่อหัวหน้าโครงการ/ผู้ยื่นขอฯ	ผศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูวิทย์
สังกัดหน่วยงาน /คณะ	วิทยาศาสตร์การแพทย์
วันที่รับรอง	27 กันยายน 2560
วันสิ้นสุดการรับรอง	27 กันยายน 2563

ขอรับรองว่าโครงการวิจัยนี้ ได้รับการรับรองด้านจรรยาบรรณการใช้สัตว์
จากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร (คกส.)

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตติมา จินนาหงษา)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (คกส.)
มหาวิทยาลัยนเรศวร



Article

Vasodilatory Effects and Mechanisms of Action of *Bacopa monnieri* Active Compounds on Rat Mesenteric Arteries

Natakorn Kamkaew^{1,2}, Tamkeen Urooj Paracha³, Kornkanok Ingkaninan⁴, Neti Waranuch⁵ and Krongkam Chootip^{1,*}

- ¹ Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; natakornk@gmail.com
 - ² Division of Physiology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand
 - ³ Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; ctamz@hotmail.com
 - ⁴ Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; kornkanoki@nu.ac.th
 - ⁵ Cosmetics and Natural Products Research Center, Department of Pharmaceutical Technology and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; netiw@nu.ac.th
- * Correspondence: krongkarn@nu.ac.th; Tel.: +66-55-964658

Academic Editor: H.P. Vasantha Rupasinghe

Received: 17 May 2019; Accepted: 11 June 2019; Published: 15 June 2019



Abstract: *B. monnieri* extract (BME) is an abundant source of bioactive compounds, including saponins and flavonoids known to produce vasodilation. However, it is unclear which components are the more effective vasodilators. The aim of this research was to investigate the vasorelaxant effects and mechanisms of action of saponins and flavonoids on rat isolated mesenteric arteries using the organ bath technique. The vasorelaxant mechanisms, including endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway and calcium flux were examined. Saponins (bacoside A and bacopaside I), and flavonoids (luteolin and apigenin) at 0.1–100 μM caused vasorelaxation in a concentration-dependent manner. Luteolin and apigenin produced vasorelaxation in endothelial intact vessels with more efficacy (E_{max} 99.4 \pm 0.7 and 95.3 \pm 2.6%) and potency (EC_{50} 4.35 \pm 1.31 and 8.93 \pm 3.33 μM) than bacoside A and bacopaside I (E_{max} 83.6 \pm 2.9 and 79.9 \pm 8.2%; EC_{50} 10.8 \pm 5.9 and 14.6 \pm 5.4 μM). Pretreatment of endothelial intact rings, with L-NAME (100 μM), an eNOS inhibitor, or removal of the endothelium reduced the relaxant effects of all compounds. In K^+ -depolarised vessels suspended in Ca^{2+} -free solution, these active compounds inhibited CaCl_2 -induced contraction in endothelial denuded arterial rings. Moreover, the active compounds attenuated transient contractions induced by 10 μM phenylephrine in Ca^{2+} -free medium containing EGTA (1 mM). Thus, relaxant effects occurred in both endothelial intact and denuded vessels which signify actions through both endothelium and vascular smooth muscle cells. In conclusion, the flavonoids have about twice the potency of saponins as vasodilators. However, in the BME, there is $\sim 20 \times$ the amount of vaso-reactive saponins and thus are more effective.

Keywords: luteolin; apigenin; bacoside A; bacopaside I; vasorelaxation

1. Introduction

Bacopa monnieri (L.) Wettst. or Brahmi, is an Ayurvedic medicine traditionally used as a memory enhancer. Along with memory improvement, it is known to promote mental health,

as a neurotonic and cardiotoxic agent. *B. monnieri* extract (BME) clearly has a cognitive enhancing potential and neuroprotective effects [1–16]. It has been shown to be antioxidant in rat brain [17,18] and to possess several pharmacological actions such as anti-depressant [19–21], anti-dementia [9], anti-cholinesterase [8,9], anti-hyperglycaemic [22] and anti-hyperlipidaemia [23]. *B. monnieri* appears to be non-toxic using haematological and blood biochemical diagnostics [24–26]. BME demonstrated cardioprotection, improved coronary blood flow, and protection against myocardial ischemia reperfusion injury [27,28]. Our recent work showed that BME acted as a vasodilator by releasing nitric oxide (NO) from endothelium and inhibiting Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR). These mechanisms mediated an acute decrease in blood pressure [29]. Also, daily oral BME (40 mg/kg) in rats for 8 weeks showed a significant increase in cerebral blood flow [30], which implies cerebrovascular dilation.

BME contains an abundance of bioactive compounds. They include dammarane-type triterpenoid saponins, jujubogenin and pseudojujubogenin glycosides. These saponins are predominantly bacoside I and bacoside A, a mixture of bacoside A₃, bacoside II, jujubogenin isomer of bacosaponin C, and bacosaponin C [31–33]. Other than saponins, flavonoids, essentially luteolin and apigenin are also present in *B. monnieri* [10,34–36]. Bacoside A₃ and bacoside II relax rat mesenteric arteries [29] but the mechanism(s) of their relaxation are presently unknown. The flavonoids found in *B. monnieri* also relax rat aortae [37–41] but these experiments used a variety of protocols and vascular preparations. Therefore, it is important to make a side-by-side comparison of these flavonoids with the *B. monnieri* saponins using a resistance vessel type. For this we choose the mesenteric artery which better exemplifies actions on regional blood flow and systemic blood pressure than the aorta. This work provides evidence to clarify the effective *B. monnieri* components for vasorelaxation which could be related to the improvement of blood flow or memory enhancement.

2. Results

2.1. Vasorelaxant Effects of the *B. monnieri* Active Compounds

Mesenteric arteries of rats were isolated and mounted in an organ bath via intraluminal wire hooks connected to a force transducer. The vessels were pre-contracted with 10 μ M phenylephrine (PE), before adding *B. monnieri* compounds including flavonoids (luteolin and apigenin), bacoside I, and the saponin mixture (bacoside A) at 0.1–100 μ M. *B. monnieri* compounds caused vasorelaxation of endothelial intact arteries (+EC) in a concentration-dependent manner (Figure 1) with EC₅₀ and E_{max} values shown in Table 1.

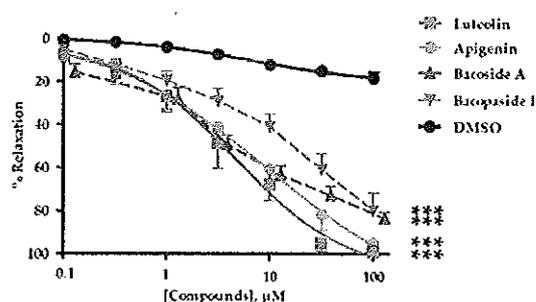


Figure 1. Relaxations induced by luteolin, apigenin, bacoside A, and bacoside I (0.1–100 μ M) and vehicle (DMSO) in endothelial intact mesenteric arteries precontracted with phenylephrine (10 μ M). Values are mean \pm SEM of 6–9 individual arterial rings. *** indicates $p < 0.001$ comparing relaxation for each compound with the control (DMSO) using two-way ANOVA ($n = 6–9$). Lines were fitted by non-linear regression.

Table 1. The EC₅₀ and E_{max} of *B. monnieri* active compounds on relaxation of endothelial intact rat mesenteric arteries.

Active Compounds		EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)	n	p-Value Whole Graph Curves
Flavonoids	Luteolin	4.35 ± 1.31	99.4 ± 0.7	6	-
	Apigenin	8.93 ± 3.33	95.3 ± 2.6	9	NS
Saponins	Bacoside A	10.8 ± 5.9	83.6 ± 2.9 ††	7	< 0.05 †
	Bacoside I	14.6 ± 5.4	79.9 ± 8.2 †	7	< 0.01 ††
Vehicle	DMSO	-	17.4 ± 3.1 ††	7	< 0.01 ††

Significantly different compared with luteolin † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ using unpaired Student's *t*-test ($n = 6-9$).

2.2. Mechanisms of Vasorelaxation by *B. monnieri* Compounds

All the *B. monnieri* compounds caused vasorelaxation in both endothelial intact (+EC) and endothelial denuded (-EC) mesenteric arterial rings. The relaxations were reduced by the removal of endothelium, implying that these compounds acted via an effect on endothelial vasodilators. However, the compounds still produced some vasorelaxations of the endothelial denuded arterial rings due to a direct action on vascular smooth muscle cells. For intact vessels, L-NAME (inhibitor of endothelial NO synthase; eNOS inhibitor), also reduced the vasorelaxations (Figure 2, Table 2). These reductions suggest that some or all the vasorelaxations were mediated through production and release of NO by endothelial cells.

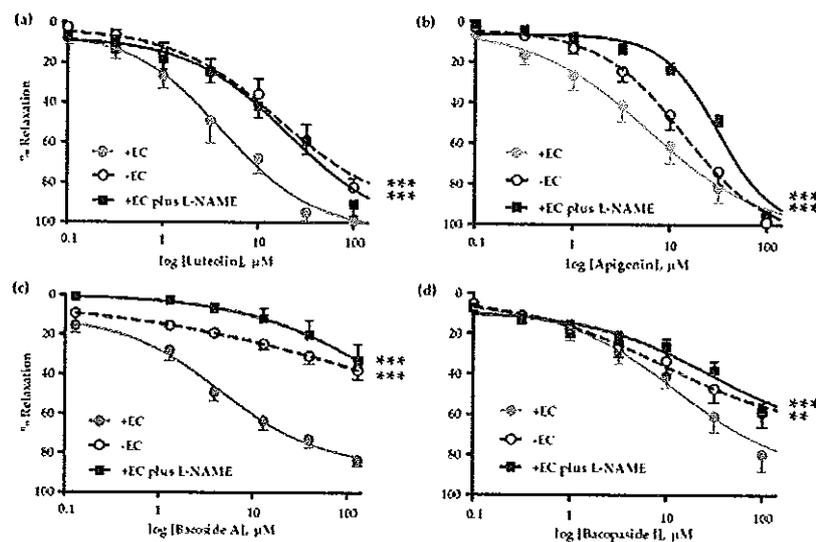


Figure 2. Cumulative concentration-response curves of (a) luteolin, (b) apigenin, (c) bacoside A and (d) bacoside I in concentrations (0.1–100 μM) in endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings and endothelial intact vessels pre-incubated in L-NAME (100 μM). The graphs are expressed as %relaxation of vessel pre-contracted with 10 μM PE. Values are mean ± SEM of 6–9 individual arteries. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ each compound compared with intact vessels (+EC) using two-way ANOVA ($n = 6-9$).

Table 2. The EC₅₀ and E_{max} of *B. monnieri* compounds on relaxations of endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings or endothelial intact arteries with L-NAME.

Active Compounds	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)	n
Luteolin			
+EC	4.35 ± 1.31	99.35 ± 0.66	6
-EC	21.90 ± 5.86 †	82.42 ± 4.65 ††	6
+EC plus L-NAME	14.99 ± 3.56 †	90.85 ± 5.85	6
Apigenin			
+EC	8.93 ± 3.33	95.27 ± 2.61	9
-EC	12.80 ± 2.54	98.81 ± 1.19	8
+EC plus L-NAME	25.62 ± 3.38 ††	94.40 ± 2.10	7
Bacoside A			
+EC	10.81 ± 5.95	83.60 ± 2.86	7
-EC	14.50 ± 6.30	37.90 ± 4.72 ††	6
+EC plus L-NAME	33.81 ± 6.25 †	33.16 ± 8.41 ††	5
Bacopaside J			
+EC	14.63 ± 5.36	79.94 ± 8.17	7
-EC	17.29 ± 4.75	58.97 ± 7.05 †	7
+EC plus L-NAME	25.38 ± 4.33	58.45 ± 4.21 †	7

Comparison of EC₅₀ or E_{max} of each component +EC vs. -EC or +EC plus L-NAME. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ using unpaired Student's *t*-test.

2.3. *B. monnieri* Compounds and Ca²⁺ Influx

Voltage-operated Ca²⁺ channels (VOCCs) were activated by depolarising denuded vessels with 80 mM K⁺ in Ca²⁺-free Krebs' solution. Then vascular contraction elicited by CaCl₂ accumulatively added at increasing concentrations (0.01–10 mM). In the same vessel, the protocol was repeated by pre-incubation with 10 μM *B. monnieri* compounds for 15 min and these CaCl₂-induced contractions were inhibited and seen as a rightward shift of the plots and reduced E_{max} from control (Figure 3).

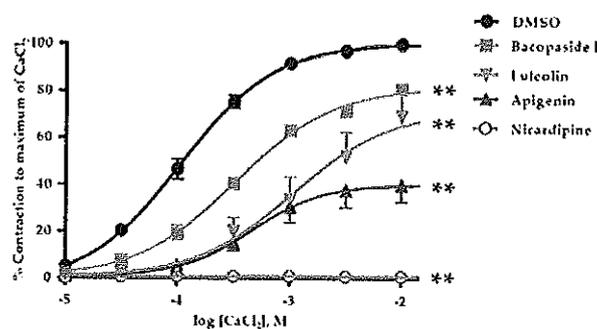


Figure 3. CaCl₂-induced contractions of denuded mesenteric arteries pre-incubated in high K⁺, Ca²⁺-free media in the conditions of pre-incubation with DMSO (negative control), 10 μM bacopaside J, 10 μM luteolin, 10 μM apigenin, and 1 μM nicardipine (positive control). Y-axis, % contraction compared to the contraction achieved with the highest Ca²⁺ concentration during the initial run without a *B. monnieri* compound in the same vessel. Values are mean ± SEM of 4–6 individual arteries. ** $p < 0.01$ each of the active compounds compared to DMSO using two-way ANOVA ($n = 4-6$).

The maximum contraction (E_{max}) of control, bacopaside J, luteolin and apigenin were 100 ± 1.3, 81.9 ± 1.7, 72.0 ± 6.7 and 40.2 ± 3.5%, respectively. Positive control, L-type Ca²⁺-channel blocker, nicardipine (1 μM) completely abolished this CaCl₂-induced vasoconstriction (Figure 3).

2.4. *B. monnieri* Compounds and Intracellular Ca^{2+} Release

The release of intracellular Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum is another important trigger of vascular contraction. Denuded arterial rings were pre-incubated in Ca^{2+} -free Krebs' solution for 10 min and then 10 μM PE added thereby eliciting a transient contraction. Then the protocol was repeated with the same arterial ring in the presence of the test compounds (control, apigenin, luteolin, bacoside A and bacoside I) producing reduced contractions (98.8 ± 1.2 , 50.1 ± 8.5 , 54.3 ± 14.9 , 85.8 ± 7.2 and $66.2 \pm 2.9\%$, respectively) (Figure 4). Luteolin, apigenin and bacoside I caused significant decrease in PE-induced contraction compared to the vehicle control ($p < 0.001$, <0.01 and <0.001 , respectively).

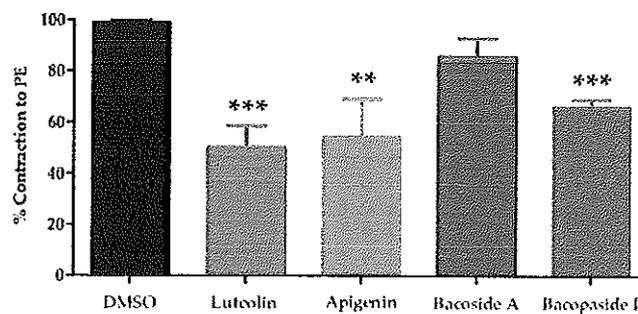


Figure 4. PE-induced contraction induced by Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of endothelial denuded mesenteric arteries in the presence of DMSO (control), 10 μM of luteolin, apigenin, bacoside A and bacoside I. The data is % contraction to 10 μM PE induced contraction compared to contractions produced by the initial protocol without test compound. Values are mean \pm SEM of 5–6 individual arteries. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ each of the active compounds compared with control using unpaired Student's *t*-test ($n = 5-6$).

3. Discussion

This is the first study comparing the vasodilatory mechanisms elicited by saponins (particularly bacoside A and bacoside I) and the principal flavonoids (luteolin and apigenin) were the most potent (EC_{50} 4.4 and 8.9 μM) (Figure 1). However, these are present in BME at only about 1/20th the contents of the bacoside A saponins and bacoside I (Figure S1 and Table S1) [42]. Thus in terms of the overall actions of the complete BME, the saponins would be expected to make a larger contribution to the vasorelaxation than the flavonoids.

However, higher potency of aglycone flavonoids compared to saponin glycosides may be due to sugar moieties interfering with the molecule interacting with the binding sites responsible for the vasorelaxation as suggested by previously, i.e., lipophilic groups in the ring skeleton of flavonoids increased their vasorelaxant activity [43]. This provides a basis for study of the molecular mechanisms of vasorelaxation of flavonoids.

We investigated the mechanisms of flavonoid- and saponin-induced relaxation by endothelial denudation in mesenteric arterial rings which impaired vasorelaxation (Figure 2). Role of NO was investigated using the eNOS inhibitor (L-NAME) with the test compounds. L-NAME increased EC_{50} and reduced E_{max} which imitated the effect of endothelial denudation, suggesting the relaxation was mainly mediated by NO. This accords with observations made by Jin et al. that a cyclooxygenase (COX) inhibitor did not affect the relaxation induced by apigenin [44], and consistent with our previous study of *B. monnieri* extract, where indomethacin had no effect on vasorelaxation [29]. There were some important concentration dependent differences between flavonoids and saponins. Firstly, denudation or blockade of eNOS reduced the effect of bacoside A more than bacoside I, luteolin and apigenin.

Perhaps this was a reflection of bacoside A being a mixture of saponins. However, curiously the responses of luteolin and apigenin to denudation and L-NAME where the latter had a greater effect.

Vascular smooth muscle express plasma membrane L-type Ca^{2+} channels that allow depolarisation dependent Ca^{2+} entry to trigger contraction. All three compounds (luteolin, apigenin and bacoside I) tested in denuded vessels depressed this mechanism of contraction that can also explain in part, the vasorelaxant effect. But here, apigenin appeared to be more effective than luteolin while it was less effective in relaxation studies suggesting some heterogeneity in the mechanism of flavonoid action.

Ca^{2+} release from intracellular stores also regulates contraction via inositol trisphosphate (IP_3) or ryanodine receptors (RyR) associated channels in the SR membranes. IP_3 associated channels are commonly activated by plasma membrane G-protein coupled receptors including α_1 -receptors which are activated by PE. RyR channels are activated by Ca^{2+} itself. The three pure compounds also inhibited Ca^{2+} released from stores which can account for at least some vasorelaxation of vessels precontracted by PE. However, the bacoside A was without clear effect again suggesting some heterogeneity between the four test substances. Other Ca^{2+} -channels may also be involved, for example T-channels and TRP channels, especially TRPC4 which is activated by α_1 -receptor activation.

K^+ channels also play a role in regulation of vascular tone, i.e., voltage-dependent K^+ (K_v) channels open upon depolarization of the plasma membrane in vascular smooth muscle cells, and thus inhibits Ca^{2+} influx through VOCCs, resulting in vasodilation [45]. Jiang et al. also reported that luteolin inhibited Ca^{2+} channels, inhibited release of stored Ca^{2+} while K^+ channels were activated, specifically via K_{ATP} , K_{Ca} , K_v and K_{IR} [40] therefore the effects of apigenin, bacoside A and bacoside I involving K^+ channels deserve further investigation. Our findings support those of Si et al. that luteolin can directly act on vascular endothelial cells, by inducing eNOS phosphorylation at Ser1177, leading to NO production [11]. The flavonoids evoke relaxations and also protect endothelial dependent vasorelaxation against oxidative stress [44,46,47] and diabetes [48], however vasoprotective effects of saponins needs further comprehensive investigation.

4. Materials and Methods

4.1. General Information

Tissues were from male Wistar rats (200–300 g) which were obtained from Nomura Siam International Co. Ltd. (Bangkok, Thailand). Experiments were approved by the Naresuan University Animal Care and Use Committee (NUACUC), protocol number NU-AE 600710. The rats were housed under the environmental conditions at 22 ± 1 °C, 12-h light and dark cycle, fed with standard rodent diet and tap water in Naresuan University Center for Animal Research (NUCAR) according to the guidelines for care and use of laboratory animals (Institute of Laboratory Animal Research, eighth edition 2011. Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of thiopental sodium (100 mg/kg BW) and killed. The mesenteric arteries were excised, cleaned of surrounding loose connective tissue and cut into rings of 3–5 mm width. In some experiments, endothelial cells were mechanically removed by gently rubbing the lumen with a stainless steel wire. The mesenteric rings were mounted on a pair of intraluminal wires in organ chambers containing physiological Krebs' solution (mM): NaCl, 122; KCl, 5; [N-(2-hydroxyethyl) piperazine N'-(2-ethanesulfonic acid)] HEPES, 10; KH_2PO_4 , 0.5; NaH_2PO_4 , 0.5; MgCl_2 , 1; glucose, 11; and CaCl_2 , 1.8 (pH 7.3), at 37 °C and aerated [29,49–51]. The vessel segments were allowed to equilibrate for 1-h at a resting tension of 1–1.3 g during which the solution was replaced every 15 min. Changes in isometric tension were measured using force transducer lever (CB Sciences Inc., Milford, MA, USA) connected to a MacLab A/D converter (Chart V7; A.D. Instruments, Castle Hill, NSW, Australia), stored and displayed on a personal computer. Following stabilization, the arterial rings were tested for viability by the application of 10 μM PE. Upon development of a steady contraction, the endothelium status was tested with 10 μM ACh. The vessel was considered endothelial intact when the ACh induced >70% relaxation. After establishing the status of the endothelium, the rings were then rinsed with Krebs' solution for 30 min and one of the following protocols was initiated.

Luteolin (lot 126M4061V) and apigenin (lot WE445301/1) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bacoside A (lot 00002005-003) and bacopaside I (lot 00002002-T1711) were purchased from ChromaDex, Inc. (Irvine, CA, USA).

4.2. Vasorelaxant Effects of *B. monnieri* Active Compounds on Endothelial Intact Arteries

Following stabilization, endothelial intact rings of mesenteric arteries were pre-contracted with 10 μ M PE. After the contraction had become constant, the *B. monnieri* active compounds (0.1–100 μ M), including luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I were added cumulatively.

4.3. Vasorelaxant Effects of *B. monnieri* Active Compounds on Endothelial Denuded Arteries

Successful endothelial denudation was confirmed by the absence of relaxation upon addition of 10 μ M ACh. For investigation of the role of endothelium in 0.1–100 μ M *B. monnieri* active compounds (luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I) induced vasorelaxation, endothelial denuded arteries were used. The data of effect of active compounds were presented as %relaxation.

4.4. Study of Vasorelaxant Mechanisms of *B. monnieri* Active Compounds via eNOS Pathway

The role of the endothelial relaxing factor, NO, in *B. monnieri* active compounds (luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I) induced vasorelaxation were evaluated in endothelial intact ring pre-treated with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M), an inhibitor of eNOS, for 30 min prior to 10 μ M PE exposure.

4.5. Study of Vasorelaxant Mechanisms of *B. monnieri* Active Compounds on Extracellular Ca²⁺ Influx

Endothelial denuded mesenteric arteries were equilibrated in Ca²⁺-free Krebs' solution (containing (mM): ethylene glycol-bis (6-aminoethyl ether)-N,N,N,N tetra acetic acid (EGTA), 0.01; NaCl, 122; KCl, 5; HEPES, 10; KH₂PO₄, 0.5; NaH₂PO₄, 0.5; MgCl₂, 1 and glucose, 11 (pH 7.3)) for 30 min followed by replacing with Ca²⁺-free Krebs' solution containing 80 mM K⁺ for 10 min which depolarizes the vascular smooth muscle cells, thus opening VOCCs. Various concentrations of CaCl₂ were then added (0.01–10 mM) in a logarithmic progression. After obtaining the maximum response, the baths were washed out and replenished with Ca²⁺-free Krebs' solution for 30 min. The Ca²⁺-free 80 mM K⁺ solution was then re-applied following pre-incubation for 10 min with either: 10 μ M active compounds or 1 μ M nicardipine (antagonist of VOCCs). Concentration-response curves to cumulative addition of CaCl₂ were then repeated and compared with maximum contraction evoked by previous control CaCl₂ challenges.

4.6. Study of Vasorelaxant Mechanisms of *B. monnieri* Active Compounds on Intracellular Ca²⁺ Release

To stimulate initial Ca²⁺ loading of the SR Ca²⁺ stores, endothelial denuded mesenteric arteries were exposed to 80 mM K⁺ solution for 5 min, and then washed out with Ca²⁺-free Krebs' solution containing 1 mM EGTA for 10 min. The arterial rings were then challenged with 10 μ M PE (acting through phospholipase C/IP₃ signaling) which release Ca²⁺ from the SR thereby eliciting a transient contraction [29]. The same protocol was then repeated to ensure that similar transient contractions to PE could be obtained. Then, the arterial rings were challenged again with 80 mM K⁺ solution for 5 min, and washed out with Ca²⁺-free Krebs' solution containing 1 mM EGTA and 10 μ M active compounds for 10 min. The arterial rings were again challenged with 10 μ M PE. The PE-induced contractions were compared in the presence or absence of active compounds.

4.7. Statistical Analyses

Statistical analyses used GraphPad Prism version 5.00 for Windows, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data from each concentration-effect curve was analysed using non-repeated two-way ANOVA. Curve fitting in the figures was generated by the same software using non-linear regression.

EC_{50} and E_{max} were compared using unpaired Student's *t* test. Values are expressed as mean \pm SEM. A *p*-value < 0.05 was considered significant. 'n' is the number of vascular rings used, each ring originating from a different animal.

5. Conclusions

This study demonstrated that *B. monnieri* active components, including both saponins and flavonoids, produced vasodilatory effects on rat isolated mesenteric arteries partially via endothelial dependent release of vasodilators and also by direct effects on vascular smooth muscle cells via blockade of Ca^{2+} influx and its release from SR. This study for the first time reports the comparative vasodilatory effects of saponins and flavonoids found in *B. monnieri* extract. However, *B. monnieri* extract, flavonoids i.e., luteolin and apigenin would be more potent vasodilators but saponins have a greater effect because of their greater contents. Accordingly, the clinical benefits on enhanced blood flow and cognitive function may arise from a combination of flavonoids and particularly the saponins.

Supplementary Materials: Supplementary materials are available online. Figure S1: Representative HPLC-UV chromatogram of mixed seven standards at 20 μ g/mL for 1 and 2 and 100 μ g/mL for 3–7 (A) and Brahmi extract (2 mg/mL) (B); luteolin (1), apigenin (2), bacoside A3 (3), bacoside H (4), bacoside X (5), bacosaponin C (6) and bacoside I (7), Table S1: Amount of each compound in 95% ethanolic extract of Brahmi analyzed by HPLC.

Author Contributions: Conceptualization, K.I., N.W. and K.C.; methodology and experimental design, N.K., T.U.P. and K.C.; software, N.K.; validation, N.K., T.U.P. and K.C.; formal analysis, N.K. and K.C.; investigation, N.K.; resources, K.I., N.W. and K.C.; data curation and interpretation, N.K. and K.C.; writing—original draft preparation, N.K.; manuscript writing—review and editing, T.U.P. and K.C.; visualization, K.I., N.W. and K.C.; supervision, K.I., N.W. and K.C.; project administration, K.C.; funding acquisition, K.C.

Funding: This research was funded by National Research Council of Thailand (NRCT), grant No. R2561B032.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the International Research Network (IRN61W0005) on research facility support. We would like to thank C. Norman Scholfield for his constructive criticism of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declared no conflict of interest.

References

1. *Bacopa monniera*. Monograph. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* **2004**, *9*, 79–85.
2. Russo, A.; Borrelli, F. *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: An overview. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 305–317. [CrossRef] [PubMed]
3. Kumar, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: An overview. *Phytother. Res. PTR* **2006**, *20*, 1023–1035. [CrossRef]
4. Rajan, K.B.; Preethi, J.; Singh, H.K. Molecular and functional characterization of *Bacopa monniera*: A retrospective review. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. eCAM* **2015**, *2015*, 945217. [CrossRef] [PubMed]
5. Aguiar, S.; Borowski, T. Neuropharmacological review of the nootropic herb *Bacopa monnieri*. *Rejuvenation Res.* **2013**, *16*, 313–326. [CrossRef] [PubMed]
6. Singh, H.K. Brain enhancing ingredients from Ayurvedic medicine: Quintessential example of *Bacopa monniera*, a narrative review. *Nutrients* **2013**, *5*, 478–497. [CrossRef] [PubMed]
7. Mathur, D.; Goyal, K.; Koul, V.; Anand, A. The molecular links of re-emerging therapy: A review of evidence of Brahmi (*Bacopa monniera*). *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 44. [CrossRef]
8. Das, A.; Shanker, G.; Nath, C.; Pal, R.; Singh, S.; Singh, H. A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: Anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *73*, 893–900. [CrossRef]
9. Dhanasekaran, M.; Tharakan, B.; Holcomb, L.A.; Hitt, A.R.; Young, K.A.; Manyam, B.V. Neuroprotective mechanisms of ayurvedic antidementia botanical *Bacopa monniera*. *Phytother. Res. PTR* **2007**, *21*, 965–969. [CrossRef]
10. Limpeanchob, N.; Jaipan, S.; Rattanakaruna, S.; Phrompittayarat, W.; Ingkaninan, K. Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 112–117. [CrossRef]

11. Uabundit, N.; Wattanathorn, J.; Mucimapura, S.; Ingkaninan, K. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 26–31. [CrossRef] [PubMed]
12. Vollala, V.R.; Upadhyay, S.; Nayak, S. Enhancement of basolateral amygdaloid neuronal dendritic arborization following *Bacopa monniera* extract treatment in adult rats. *Clinics (Sao Paulo Brazil)* **2011**, *66*, 663–671. [CrossRef] [PubMed]
13. Vollala, V.R.; Upadhyay, S.; Nayak, S. Learning and memory-enhancing effect of *Bacopa monniera* in neonatal rats. *Bratisl. Lek. Listy* **2011**, *112*, 663–669. [PubMed]
14. Vollala, V.R.; Upadhyay, S.; Nayak, S. Enhanced dendritic arborization of hippocampal CA3 neurons by *Bacopa monniera* extract treatment in adult rats. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2011**, *52*, 879–886. [PubMed]
15. Vollala, V.R.; Upadhyay, S.; Nayak, S. Enhanced dendritic arborization of amygdala neurons during growth spurt periods in rats orally intubated with *Bacopa monniera* extract. *Anat. Sci. Int.* **2011**, *86*, 179–188. [CrossRef] [PubMed]
16. Kongkeaw, C.; Dilokthornsakul, P.; Thanarangsarit, P.; Limpeanchob, N.; Norman Scholfield, C. Meta-analysis of randomized controlled trials on cognitive effects of *Bacopa monnieri* extract. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 528–535. [CrossRef] [PubMed]
17. Anbarasi, K.; Vani, G.; Balakrishna, K.; Devi, C.S. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci.* **2006**, *78*, 1378–1384. [CrossRef] [PubMed]
18. Jyoti, A.; Sharma, D. Neuroprotective role of *Bacopa monniera* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. *Neurotoxicology* **2006**, *27*, 451–457. [CrossRef]
19. Mannan, A.; Abir, A.B.; Rahman, R. Antidepressant-like effects of methanolic extract of *Bacopa monniera* in mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **2015**, *15*, 337. [CrossRef]
20. Sairam, K.; Dorababu, M.; Goel, R.K.; Bhattacharya, S.K. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 207–211. [CrossRef]
21. Kadali, S.R.M.; Das, M.C.; Rao, A.S.; Sri, G.K. Antidepressant activity of brahmi in albino mice. *J. Clin. Diagn. Res. [CDR]* **2014**, *8*, 35–37. [CrossRef] [PubMed]
22. Udhaya Lavinya, B.; Sabina, E.P. Anti-hyperglycaemic effect of Brahmi (*Bacopa monnieri* L.) in streptozotocin-induced diabetic rats: A study involving antioxidant, biochemical and haematological parameters. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 531–534.
23. Kamesh, V.; Sumathi, T. Antihypercholesterolemic effect of *Bacopa monniera* Linn. on high cholesterol diet induced hypercholesterolemia in rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2012**, *5*, 949–955. [CrossRef]
24. Sireeratawong, S.; Jaijoy, K.; Khonsung, P.; Lertprasertsuk, N.; Ingkaninan, K. Acute and chronic toxicities of *Bacopa monnieri* extract in Sprague-Dawley rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 249. [CrossRef] [PubMed]
25. Joshua Allan, J.; Damodaran, A.; Deshmukh, N.S.; Goudar, K.S.; Amit, A. Safety evaluation of a standardized phytochemical composition extracted from *Bacopa monnieri* in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1928–1937. [CrossRef] [PubMed]
26. Pravina, K.; Ravindra, K.R.; Goudar, K.S.; Vinod, D.R.; Joshua, A.J.; Wasini, P.; Venkateshwarlu, K.; Saxena, V.S.; Amit, A. Safety evaluation of BacoMind in healthy volunteers: A phase I study. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 301–308. [CrossRef] [PubMed]
27. Srimachal, S.; Devaux, S.; Demougeot, C.; Kumphune, S.; Ullrich, N.D.; Niggli, E.; Ingkaninan, K.; Kamkaew, N.; Scholfield, C.N.; Tapechum, S.; et al. *Bacopa monnieri* extract increases rat coronary flow and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 117. [CrossRef]
28. Nandave, M.; Ojha, S.K.; Sujata, J.; Kumari, S.; Arya, D.S. Cardioprotective effect of *Bacopa monniera* against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Int. J. Pharmacol.* **2007**, *3*, 385–392.
29. Kamkaew, N.; Scholfield, C.N.; Ingkaninan, K.; Manesai, P.; Parkington, H.C.; Tare, M.; Chootip, K. *Bacopa monnieri* and its constituents is hypotensive in anaesthetized rats and vasodilator in various artery types. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 790–795. [CrossRef]
30. Kamkaew, N.; Norman Scholfield, C.; Ingkaninan, K.; Taepavaraprak, N.; Chootip, K. *Bacopa monnieri* increases cerebral blood flow in rat independent of blood pressure. *Phytother. Res. PTR* **2013**, *27*, 135–138. [CrossRef]

31. Phrompittayarat, W.; Putalun, W.; Tanaka, H.; Jetiyanon, K.; Wittaya-Areekul, S.; Ingkaninan, K. Determination of pseudojubilogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochem. Anal. PCA* **2007**, *18*, 411–418. [CrossRef] [PubMed]
32. Phrompittayarat, W.; Putalun, W.; Tanaka, H.; Wittaya-Areekul, S.; Jetiyanon, K.; Ingkaninan, K. An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
33. Nuengchamnong, N.; Sookying, S.; Ingkaninan, K. LC-ESI-QTOF-MS based screening and identification of isomeric jubilogenin and pseudojubilogenin aglycones in *Bacopa monnieri* extract. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 121–134. [CrossRef] [PubMed]
34. Homnegowda, S.; Bagul, M.S.; Padh, H.; Rajani, M. A rapid densitometric method for the quantification of luteolin in medicinal plants using HPTLC. *Chromatographia* **2004**, *60*, 131–134.
35. Deepak, M.; Sangli, G.K.; Arun, P.C.; Amit, A. Quantitative determination of the major saponin mixture bacopaside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. *Phytochem. Anal. PCA* **2005**, *16*, 24–29. [CrossRef] [PubMed]
36. Rajasekaran, A. Simultaneous estimation of luteolin and apigenin in methanol leaf extract of *Bacopa monnieri* Linn by HPLC. *Br. J. Pharm. Res.* **2014**, *4*, 1629–1637. [CrossRef]
37. Chan, E.C.; Pannangpetch, P.; Woodman, O.L. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: Mechanism of action and structure-activity relationships. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2000**, *35*, 326–333. [CrossRef]
38. Calderone, V.; Chericoni, S.; Martinelli, C.; Testai, L.; Nardi, A.; Morelli, I.; Breschi, M.C.; Martinotti, E. Vasorelaxing effects of flavonoids: Investigation on the possible involvement of potassium channels. *Nannyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, *370*, 290–298. [CrossRef]
39. Je, H.D.; Kim, H.-D.; La, H.-O. The inhibitory effect of apigenin on the agonist-induced regulation of vascular contractility via calcium desensitization-related pathways. *Biomol. Ther.* **2014**, *22*, 100–105. [CrossRef]
40. Jiang, H.; Xia, Q.; Wang, X.; Song, J.; Bruce, I.C. Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Die Pharm.* **2005**, *60*, 444–447.
41. Si, H.; Wyeth, R.P.; Liu, D. The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *53*, 269–275. [CrossRef] [PubMed]
42. Saesong, T.; Temkitthawon, P.; Nangngam, P.; Ingkaninan, K. Pharmacognostic and physico-chemical investigations of the aerial part of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *SJST* **2019**, *41*, 397–404.
43. Wu, H.; Jiang, H.; Wang, L.; Hu, Y. Relationship between vasorelaxation of flavonoids and their retention index in RP-HPLC. *Die Pharm.* **2006**, *61*, 667–669.
44. Jin, B.H.; Qian, L.B.; Chen, S.; Li, J.; Wang, H.P.; Bruce, I.C.; Lin, J.; Xia, Q. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *616*, 200–205. [CrossRef] [PubMed]
45. Ko, E.A.; Han, J.; Jung, I.D.; Park, W.S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.* **2008**, *44*, 65–81. [CrossRef] [PubMed]
46. Ma, X.; Li, Y.F.; Gao, Q.; Ye, Z.G.; Lu, X.J.; Wang, H.P.; Jiang, H.D.; Bruce, I.C.; Xia, Q. Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life Sci.* **2008**, *83*, 110–117. [CrossRef]
47. Qian, L.B.; Wang, H.P.; Chen, Y.; Chen, E.X.; Ma, Y.Y.; Bruce, I.C.; Xia, Q. Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress. *Pharmacol. Res.* **2010**, *61*, 281–287. [CrossRef]
48. El-Bassosy, H.M.; Abo-Warda, S.M.; Fahmy, A. Chrysin and luteolin attenuate diabetes-induced impairment in endothelial-dependent relaxation: Effect on lipid profile, AGEs and NO generation. *Phytother. Res. PTR* **2013**, *27*, 1678–1684. [CrossRef]
49. Wisutthathum, S.; Kamkaew, N.; Inchan, A.; Chaturong, U.; Paracha, T.U.; Ingkaninan, K.; Wongwad, E.; Chootip, K. Extract of *Aquilaria crassna* leaves and mangiferin are vasodilators while showing no cytotoxicity. *J. Tradit. Complement. Med.* **2018**, in press. [CrossRef]
50. Wisutthathum, S.; Demougeot, C.; Totoson, P.; Adthapanyawanich, K.; Ingkaninan, K.; Temkitthawon, P.; Chootip, K. *Eulophia macrobulbon* extract relaxes rat isolated pulmonary artery and protects against monoxrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Phytomedicine* **2018**, *50*, 157–165. [CrossRef]

51. Wisutthathum, S.; Chootip, K.; Martin, H.; Ingkaninan, K.; Temkitthawon, P.; Totoson, P.; Demougeot, C. Vasorelaxant and hypotensive effects of an ethanolic extract of *Eulophia macrobulbon* and its main compound 1-(4'-hydroxybenzyl)-4,8-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 484. [CrossRef] [PubMed]

Sample Availability: Samples of the compounds, luteolin, apigenin, bacoside A and bacoside I are not available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary data

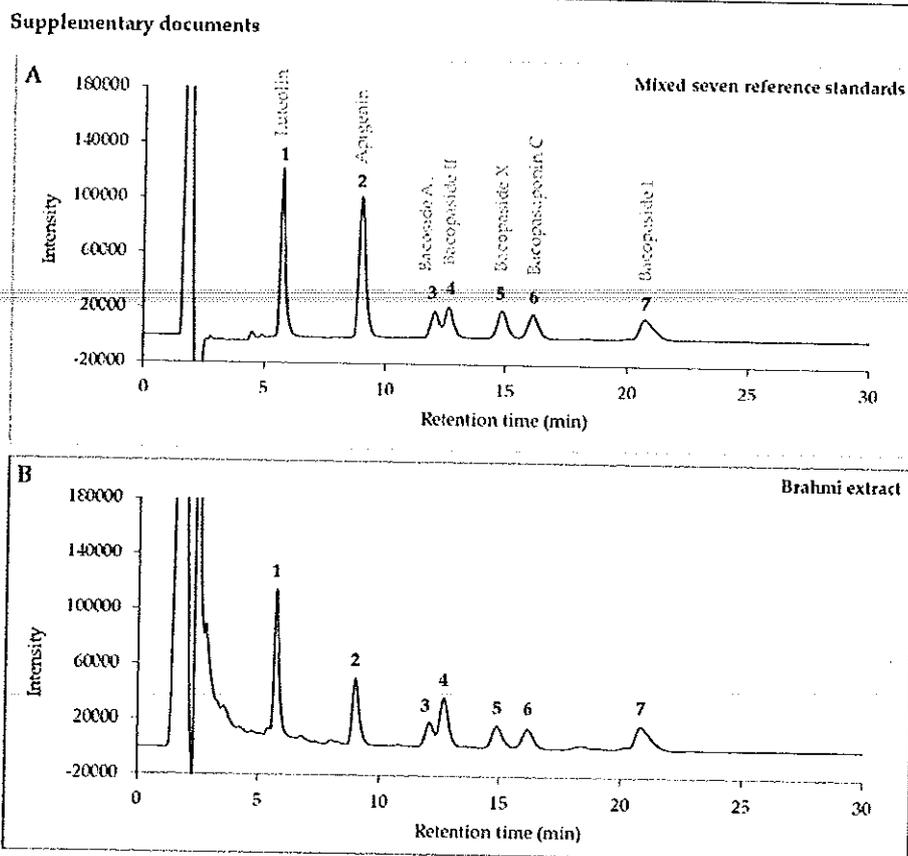


Figure S1. Representative HPLC-UV chromatogram of mixed seven standards at 20 µg/ml for 1 and 2 and 100 µg/ml for 3-7 (A) and Brahmi extract (2 mg/ml) (B); luteolin (1), apigenin (2), bacoside A₃ (3), bacoside II (4), bacoside X (5), bacopasaponin C (6) and bacoposide I (7). The HPLC method followed the previous report [1].

Table S1. Amount of each compound in 95% ethanolic extract of Brahmi analyzed by HPLC. The values are expressed as averages from triplicate experiments ± standard deviations.

Compound	Amount (mg/g of dried extract)
Luteolin	1.39 ± 0.07
Apigenin	0.77 ± 0.06
Bacoside A ₃	9.16 ± 0.13
Bacoside II	15.63 ± 0.53
Bacoside X	7.07 ± 0.36
Bacopasaponin C	8.19 ± 0.38
Bacoposide I	10.69 ± 0.19

Total flavonoids: 2.1 mg/g; total saponins: 51 mg/g

References

- Sacsong, T.; Temkitthawon, P.; Nangngam, P.; Ingkaninan, K., Pharmacognostic and physico-chemical investigations of the aerial part of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *SJST* 2019, 41, 397-404.