อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการกลไกการออกฤทธิ์ของสารไพเพอรีนและอนุพันธ์ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด

Mechanisms of Action of Piperine and Its Derivatives in Reducing Risk Factor of Cardiovascular Diseases

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 19 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 1.5935337
เลขเรียกหนังสือ Q RC
669
ก1855
2555

โดย ผศ.ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์ และคณะ

พฤษภาคม 2555

สัญญาเลขที่ R2554B080

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการกลไกการออกฤทธิ์ของสารไพเพอรีนและอนุพันธ์ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด

Mechanisms of Action of Piperine and Its Derivatives in Reducing Risk Factor of Cardiovascular Diseases

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผศ.ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์[1]
ผศ.ดร.นันทีทิพย์ ลิ้มเพียรชอบ[2]
รศ.ดร.นันทกา โกรานา[2]
รศ.ดร.สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล[1]

[1]คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [2]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การ oxidation ของ LDL ทำให้เปลี่ยนสภาพไปเป็น oxidized LDL ส่งผลต่อในการถูกนำเข้าเซลล์ macrophage ซึ่งในที่สุดจะกลายเป็น foam cells และสะสมที่ผนังหลอดเลือด จนทำให้เกิดจากการหนาตัวของผนังหลอดเลือด และเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) มีหลายๆ การศึกษาที่พบว่า piperine มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงน่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาสารที่เป็นอนุพันธุ์ของ piperine นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า piperine มีผลลดไขมันในเลือด ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงเป็นการทดสอบ piperin และอนุพันธ์ 11 ชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นมา ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของ LDL ที่แยกได้มาจากเลือดของอาสาสมัคร รวมทั้งมีการศึกษาผลการลดไขมันในสัตว์ทดลอง และการศึกษาผลต่อแผนภูมิโปรตีนในตับ ผลการทดลองพบว่า จากการวัดการยับยั้ง lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARs assay พบว่าสารหลายชนิด ได้แก่ AI3, AI4, AI5, AI9, AI0, A20 และ AI23 มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่ความเข้มข้นต่ำ 1 μM สำหรับการศึกษา reducing activity ของสารตัวอย่างสามารถทำได้ด้วยวิธี FRAP assay ผลการทดลองพบว่า สารที่มี reducing activity สูง ได้แก่ AI0 และ AI1 แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation ไม่ได้เป็นผลมาจากฤทธิ์ reducing activity ของสารโดยตรง นอกจากนี้ สารทุกชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1 μM) ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ macrophage แต่มีผลลดการมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการให้ piperine พร้อมกับ cholesterol นาน 8 สัปดาห์มีผลลด weight gain ลด total cholesterol (TC) และ triglyceride (TG) ตลอดจนทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดดีขึ้น แต่ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนู โดยสรุปมีความเป็นไปได้ที่ piperine และสารในกลุ่มนี้อาจมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจร่วมหลอดเลือดได้

Abstract

Oxidation of low density lipoprotein (LDL) causes the formation of oxidized LDL that can be taken by macrophage. Macrophage then transforms to foam cells that can penetrate and accumulate in the vascular epithelial layers which finally cause atherosclerosis. Several studies reported the potential of piperine as antioxidant agent. Thus, it is interesting to further investigate the potential of piperine derivatives which could be even more active than piperine itself. We therefore synthesized 11 piperine derivatives and tested for their antioxidant activity against LDL oxidation. LDL was isolated from healthy volunteers by density sequential ultracentrifugation. As an anti-hyperlipidemic, some reports show that piperine produced clear blood lipid reductions whilst others failed to show any effect. Therefore, we aimed to study anti-oxidant activity of piperine and to show whether piperine could improve vascular endothelial function in cholesterol fed rats as well as its effect on liver protein profile.

Antioxidant effect was assessed by inhibitory activity on lipid peroxidation by TBARs assay and reducing activity by FRAP assay. The result showed that compound AI3, AI4, AI5, AI9, AI0, A20 and AI23 exhibited good lipid peroxidation inhibitory activity at 1 μM. For reducing activity, AI0 and AI1 showed the highest activity among all compounds. Dose-dependent pattern was also observed by both activities. These result suggested that inhibition of lipid peroxidation was not directly related to reducing activity. In addition, these compounds were test for their effect on macrophage cell viability and found that they were not toxic to cells at 1 μM and showed some reduction on cell viability at higher concentrations.

Throughout the 8 week trial, treatment with piperine (40, 80mg/kg) reduced body weight gain and food intake per day compared with control. The HC group exhibited elevation of both TC and TG. Piperine at 80mg/kg but not low dose (40mg/kg) partially reduced TC, while both doses effectively normalised the elevated TG. HDL was decreased in all animals including controls. Hypercholesterolemic and hypertriglyceridemic rats showed significant reduction of acetylcholine-induced vasorelaxation of isolated aortae and this was prevented by treatment with piperine. There was no change in liver protein profile.

This study showed that piperine reduced body weight gain, lowered TC and fully normalised TG and endothelial-mediated vasorelaxation of aorta. Thus piperine could provide beneficial effects in weight control, antihyperlipidemia and counteracted the poor vascular endothelial function in hyperlipidemia.

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

โรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด (Cardiovascular diseases) เป็นปัญหาสุขภาพที่มีความสำคัญอันดับต้น ๆ ทั้งในระดับโลกและในระดับประเทศ กล่าวคือ องค์การอนามัยโลก (World Health Oranization: WHO) รายงานว่า โรคหัวใจขาดเลือด (Ischemic heart disease) และ โรคหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular disease/Stroke) เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรโลกทั้งในเพศหญิงและเพศชาย โดยเฉพาะในประเทศที่มีรายได้อยู่ในระดับสูง (High-income countries) และประเทศที่มีรายได้อยู่ในระดับปานกลาง (Middle-income countries) องค์การอนามัยโลกยังได้รายงานว่าการเสียชีวิตของประชากรโลกที่มีสาเหตุมากจากโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 17.1 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2004 เป็น 23.4 ล้านคนในปี ค.ศ. 2030 (WHO Report, 2004) ในประเทศไทยมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจร่วมหลอดเลือดสูงถึง 40,000 คนต่อปี หรือคิดเป็นชั่วโมงละ 5 คน (กระทรวงสาธารณสุข, 2550)

เนื่องจากโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดเป็นโรคเรื้อรัง (Chronic disease) ที่พบในวัยกลางคนไปจนถึงผู้สูงอายุ หากเกิดขึ้นแล้วผู้ป่วยต้องได้รับยาและการรักษาตลอดชีวิต เป็นโรคที่ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาว และ ก่อให้เกิดภาระต่อสังคมทั้งด้านการรักษาพยาบาล และ การดูแลผู้ป่วย โดยปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการนำไปสู่โรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดได้แก่ ภาวะการมีไขมันในเลือดสูง (Hypercholesterolemia) อันเป็นที่ทราบแน่ชัดและมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่าในภาวะนี้มีการเพิ่มขึ้นของไขมันชนิด Low density lipoprotein (LDL) ซึ่งมีผลทำลายหลอดเลือดโดยเฉพาะเซลล์ Endothelium ทำให้เกิดภาวะ Endothelial dysfunction ที่นำไปสู่การเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด เช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) ซึ่งเป็นภาวะที่หลอดเลือแดงถูกทำลายจนเกิดการหนาตัว แข็งตัว สูญเสียความยืดหยุ่น และ อุดตันทำให้อัตราการไหลของเลือดลดลง ความดันในหลอดเลือดสูงขึ้น และเกิดการแตกของหลอดเลือดได้ง่ายทำให้อวัยวะสำคัญ เช่น สมอง และ หัวใจขาดเลือดไปเลี้ยงจนถึงแก่ชีวิตได้ในที่สุด

อย่างไรก็ดีโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด เป็นโรคที่สามารถป้องกันได้ โดยการลดปัจจัยเสี่ยง เช่น การป้องกันภาวะการมีไขมันในเลือดสูง ซึ่งสามารทำได้โดยปรับเปลี่ยนพฤติกรรม เช่น การออกกำลังกายและเปลี่ยนพฤติกรรมการบริโภคอาหารโดยเลือกรับประทานอาหารที่มีไขมันต่ำ หรือมีรายงานสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ว่าสามารถลดไขมันในเลือดได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาเชื่อมโยงกับทรัพยากรธรรมชาติต่าง ๆ มากมายของประเทศไทยที่อุดมไปด้วยพืชผักนานาชนิด รวมทั้งสมุนไพรจะเห็นได้ว่าเรามีศักยภาพสูงในการส่งเสริมให้มีการบริโภคสมุนไพรที่สามารถลดไขมันในเลือดได้ เช่น พริกไทย และ ดีปลี เป็นสมุนไพรไทยที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวันโดยใช้เป็นทั้งเครื่องเทศเพื่อปรุงรสอาหาร และใช้เป็นส่วนประกอบของพิกัดยาไทย สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพริกไทยและดีปลี คือ ไพเพอรีน (Piperine) ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด ลดภาวะ Oxidative stress ลดการอักเสบ และมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัวซึ่งเป็นหลักฐานสนับสนุนเบื้องต้นว่า Piperine มีศักยภาพในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจร่วมหลอดเลือด แต่การศึกษาดังกล่าวยังมีค่อนข้างน้อยและยังขาดการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Piperine ในเชิงลึก งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งวิจัยศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Piperine

รวมทั้งอนุพันธ์ของ Piperine (Piperine derivatives) ในการลดปัจจัยเสี่ยงของเกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด โดยจะศึกษาในประเด็นต่าง ๆ ดังนี้ คือ ทดสอบฤทธิ์ของ Piperine รวมทั้ง Piperine derivatives ที่จะทำการสังเคราะห์ขึ้น ในการยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation ของ LDL และผลในการยับยั้งการ Uptake ของ Oxidized LDL เข้าสู่ Macrophage cells ซึ่งผู้วิจัยคาดว่า จะสามารถค้นพบศักยภาพของสารกลุ่มนี้ และอาจมีอนุพันธ์บางชนิดที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นยาหรือสารอาหารเสริมสุขภาพ และเพื่อประเมินความสามารถของ Piperine ในการลดความเสี่ยงและป้องกันการเกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดให้ชัดเจนขึ้น ทีมผู้วิจัยวางแผนศึกษาผลของ Piperine ที่มีต่อระดับไขมัน และการทำงานของหลอดเลือด ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลยืนยันเชิงวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจนขึ้นว่า Piperine สามารถป้องกันการถูกทำลายของหลอดเลือดได้ และทีมผู้วิจัยยังมีความสนใจที่จะศึกษาในเชิงลึกเพื่อดูว่า Piperine มีผลเปลี่ยนแปลงโปรตีนใด ๆ ในตับหรือไม่โดยเฉพาะโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของไขมัน ดังนั้นตับของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะไขมันในเลือดสูงและได้รับ Piperine จะถูกนำไปศึกษาผลกระทบที่มีต่อแผนภูมิโปรตีนเพื่อนำผลที่ได้ไปเชื่อมโยงการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์กับฤทธิ์ของ Piperine ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดอันจะนำไปสู่การสนับสนุนการบริโภคสมุนไพรไทยในกลุ่มเครื่องเทศ เช่น พริกไทย ดีปลี เพื่อส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดต่อไป

2. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไพเพอรีนและอนุพันธ์ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดโดยมีเป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์คือ

- สร้างองค์ความรู้เพื่อผลิตผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติเพื่อมีส่วนสนับสนุนการเป็นมหาวิทยาลัยแห่งการวิจัยของ ม. นเรศวร
- พัฒนาคุณภาพคน และนำสังคมไทยสู่สังคมแห่งภูมิปัญญาและการเรียนรู้ ได้แก่ การแลกเปลี่ยนเรียนรู้ระหว่างนักวิจัยที่มีประสบการณ์ และการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ รวมทั้งการผลิตนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาที่มีคุณภาพระดับนานาชาติ
- เผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้เพื่อนำไปสู่การสนับสนุนการบริโภคสมุนไพรไทยในกลุ่มเครื่องเทศ เช่น พริกไทย ดีปลี และต่อยอดการพัฒนา Piperine derivatives เพื่อเป็นยาหรืออาหารเสริมสุขภาพ

โครงการนี้ประกอบด้วยโครงการย่อย 3 โครงการโดยมีขอบเขตและสมมติฐานการวิจัยดังนี้

มีการรายงานว่า Piperine มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า Piperine และ Piperine derivatives ที่สังเคราะห์ขึ้น จะสามารถยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation ของ LDL ได้ รวมทั้งยับยั้งการ Uptake ของ Oxidized LDL เข้าเซลล์ Macrophage ได้ และคาดว่า Piperine derivatives ที่สังเคราะห์ขึ้นบางชนิดอาจจะมีฤทธิ์ดีกว่า Piperine ซึ่งถ้าสมมติฐานของโครงการวิจัยนี้เป็นไปตามที่ตั้งไว้ จะสามารถศึกษาต่อยอดในระดับลึกถึงกลไกในการ uptake ของ oxidized LDL เช่น ศึกษาถึงบทบาทของ Receptor ที่ทำหน้าที่ในการ Uptake และรูปแบบการทดลองนี้ยังอาจใช้เป็น Model ซึ่งสามารถใช้ในการวิจัยเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกสาร (Screening test) ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งต่อไป

นอกจากประเด็นดังกล่าวข้างต้นแล้วยังมีรายงานที่แสดงว่า Piperine มีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด และมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดของหนูปกติคลายตัว ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานเพิ่มเติมว่าเมื่อให้ Piperine

แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง จะมีผลทำให้ไขมันในเลือดลดต่ำลงและส่งผลให้หลอดเลือดแดงมีการคลายตัวโดยตอบสนองต่อ Acetylcholine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ทดสอบการทำงานของ Endothelium ได้ในระดับที่เหมือนหรือใกล้เคียงกับหนูปกติ นอกจากนี้เมื่อศึกษาในเชิงลึกโดยนำเซลล์ตับจากสัตว์ทดลองดังกล่าวไปศึกษาต่อยอดเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน คาดว่าน่าจะพบการเปลี่ยนของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับเมทาบอลิซึมของไขมัน และ/หรือโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด ทำให้ได้มาซึ่งข้อมูลสนับสนุนเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของ Piperine ในเชิงลึกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหากผลเป็นดังสมมติฐานดังกล่าวก็จะเป็นหลักฐานเชิงวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันได้ชัดเจนว่า Piperine สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด อันจะนำไปสู่การป้องกันการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดได้ และจะเป็นการช่วยสนับสนุนการบริโภคสมุนไพรไทยกลุ่มเครื่องเทศที่มี Piperine เป็นองค์ประกอบ เพื่อส่งเสริมสุขภาพและป้องกันการเกิดโรคต่อไป รวมทั้งเป็นข้อมูลนำไปสู่การพัฒนา Piperine derivative ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น (ดู Diagram ประกอบ)

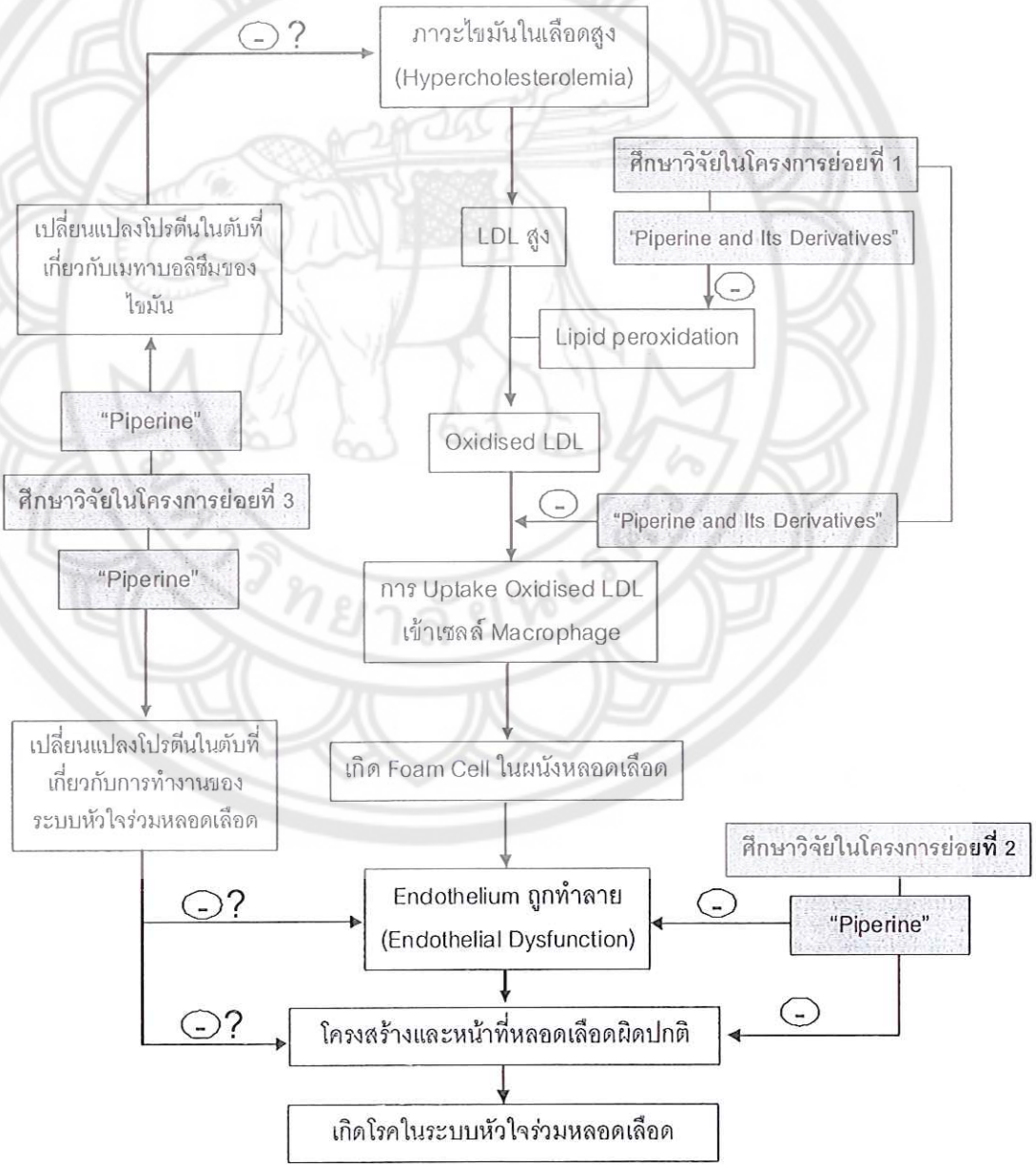


Diagram แสดงกรอบแนวคิดของแผนงานวิจัยการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Piperine ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

โครงการย่อยที่ 1: ไพเพอรีนและอนุพันธ์ยับยั้งอ็อกซิเดชั่นของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำและการนำเข้าเซลล์แมคโครฟาจ

เครื่องมือและอุปกรณ์

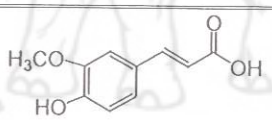
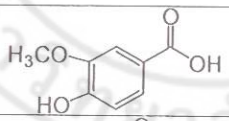
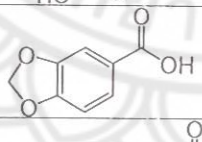
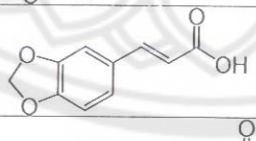
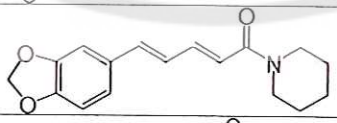
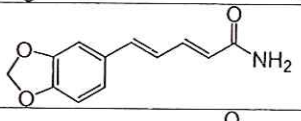
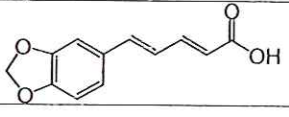
1. Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation)
2. CO_2-incubator (Forma series II, Thermo Fisher Scientific)
3. Larminar air flow (Heal Force®)
4. Liquid nitrogen tank (Taylor Wharton)
5. Microplate Spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Beckman Coulter)
6. pH meter (Mettler-Teledo)

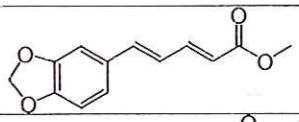
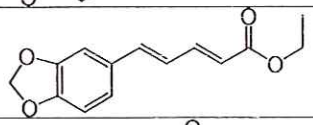
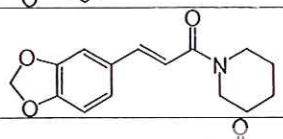
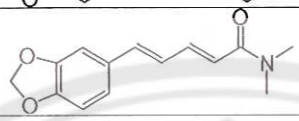
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสังเคราะห์ piperine derivatives

สารสังเคราะห์อนุพันธ์ของ piperine เป็นสารกลุ่ม acids, esters และ amides ตามตารางที่ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นันทกา โกรานา

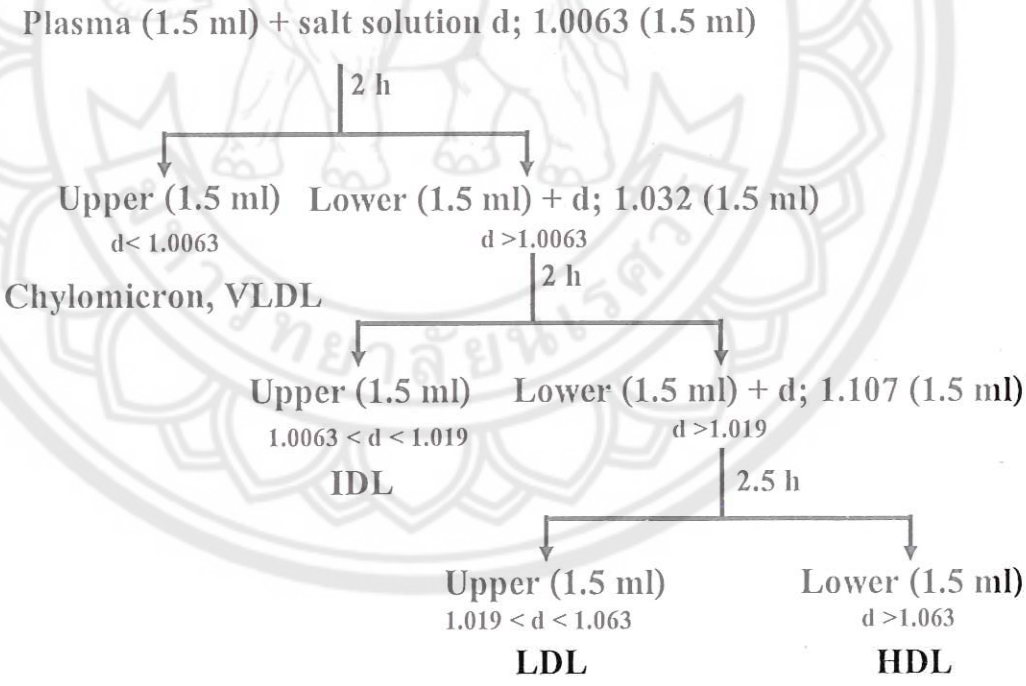
ตารางที่ 1 สารที่ใช้ทดสอบ

Code	Compound
AI-0	
AI-1	
AI-2	
AI-3	
AI-4	
AI-5	
AI-7	

AI-9	
AI-10	
AI-20	
AI-23	

2. การสกัดแยก LDLจากพลาสมา

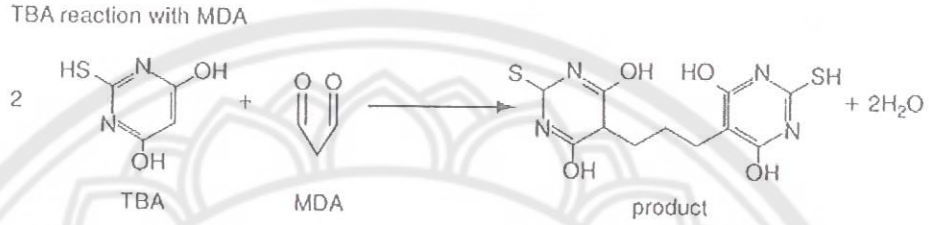
พลาสมาถูกเตรียมจากเลือดมนุษย์ ที่มีการเติม 0.1% EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยเตรียมจากการนำเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3600 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำไปปั่นแยก LDL (d = 1.019-1.063 g/ml) ด้วยวิธี density sequential ultracentrifugation ดังแผนภูมิรูป แล้วนำไป dialyze ใน 1x PBS, pH 7.4 ที่มี 10 μM EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดหาปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit แล้วเก็บ LDL ที่ได้ภายใต้ N_2 gas ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ศึกษาการเกิด oxidation ต่อไป



รูปที่ 1 การแยก LDL โดยวิธี density sequential ultracentrifugation (TLX centrifuge, fixed angle rotor, 80,000 rpm, 16.0 °C)

3. การวัด lipid oxidation ด้วย TBARs assay

การวัดปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วย TBARs assay เป็นการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยการเติม TBARs reagent (40% trichloroacetic acid, 1.4% thiobarbituric acid, 8% HCl) แล้ว incubate ที่ 90.0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำไปวัดการเรืองแสง ที่ EX 535 nm และ EM 595 nm



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่าง MDA และ TBA reagent
อ้างอิงจาก: http://www.currentprotocols.com/protocol/ns0717

4. การศึกษาผลของ piperine และอนุพันธ์ในการยับยั้ง lipid oxidation ของ LDL

ในการทดสอบผลของไพเพอรีนและอนุพันธ์โดยการเติมแต่ละความเข้มข้นต่างๆ ของ (10, 100, 1000 µM) ลงไปในปฏิกิริยาของการเกิด lipid oxidation ตามโมเดลที่ได้ศึกษาโดยมีการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการเกิด oxidation ด้วยการเติม 0.1 µM EDTA แล้วนำไปแช่ใน ice bath จากนั้นนำไปวัด lipid oxidation ด้วย TBARs assay

5. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

การมีชีวิตของเซลล์ก่อน ซึ่งสามารถวัดได้โดยใช้ MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetra-zolium bromide)] โดยเลี้ยงเซลล์ใน 96 well microplate ทำการเติมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้น 2 ชั่วโมงก่อนสิ้นสุดการ treatment ใส่ 20 µl ของ MTT (5 mg/ml ใน PBS) เมื่อสิ้นสุดเวลา นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วใส่ 200 µl DMSO:EtOH (1:1) และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย ELISA reader

6. การทดสอบการเป็น reducing agent ด้วยวิธี FRAP

เป็นวิธีการวัดความสามารถการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านออกซิเดชันที่อยู่ในตัวอย่าง โดย Ferric (Fe^{3+}) –TPTZ cpmplex (ไม่มีสี) จะถูกรีดิวซ์กลายเป็น Ferrous (Fe^{2+})–TPTZ complex (สีม่วงน้ำเงิน) ในการทดลอง คือ เติมสารที่ต้องการทดสอบจำนวน 20 µl ลงใน 96 well plate แล้วเติม FRAP solution 180 µl (300 mM Acetate buffer pH 3.6 : 10 mM TPTZ solution : 20 mM $FeCl_3$ solution อัตราส่วน 10:1:1) แล้ววัดค่า absorbance ที่ 595 nm ที่เวลา 30 นาที แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณ Ferrous (Fe^{2+})

โครงการย่อยที่ 2: ผลของสารไพเพอรีนต่อระดับไขมัน และหน้าที่ของหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

1 การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

ทีมผู้วิจัยได้เสนอรายละเอียดโครงการวิจัย เพื่อขออนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะ กรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยมีรายละเอียดของการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองดังต่อไปนี้

1.1 หลักการและเหตุผลที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของ Piperine ต่อโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งต้องมีการเจาะเลือดเพื่อวัดระดับไขมันในเลือด และต้องแยกหลอดเลือดออกมาศึกษาการทำงาน การศึกษาวิจัยดังกล่าวเป็นชนิด invasive ไม่เหมาะสมที่จะกระทำการศึกษาโดยตรงในมนุษย์ และไม่สามารถทำการทดลองโดยใช้ in vitro model อื่น ๆ เช่น การใช้ cell culture ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความจำเป็นต้องเลือกทำการศึกษาใน in vivo model ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะมีความสำคัญต่อการนำไปอธิบายกลไกของ Piperine ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด และข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการสนับสุนการบริโภคสมุนไพรไทยเพื่อส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรคต่อไป

1.2 แนวทางปฏิบัติในการใช้สัตว์

1) สัตว์ทดลองจะได้รับการดูแลอย่างดี ในสภาพแวดล้อมที่สะอาดและเหมาะสม
2) โครงการวิจัยนี้ได้คำนวนจำนวนหนูทดลองในปริมาณที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงคุณค่าของชีวิตสัตว์ที่นำมาทดลอง และค่าของผลการทดลองที่จะทำให้เกิดนัยสำคัญทางสถิติ
3) ทีมผู้วิจัยมีความชำนาญในการ handling หนูทดลองเป็นอย่างดี และจะปฏิบัติต่อสัตว์ด้วยความระมัดระวัง และด้วยความมีเมตตา
4) สัตว์จะถูกทำให้ตายอย่างสงบ (euthanasia) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองสำหรับงานวิจัยนี้คือ หนูแรทเพศผู้ (Sprague Dawley rats) น้ำหนัก 150-200 กรัม อายุประมาณ 1 เดือน โดยจะสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล ต.ศาลายา อ.ศาลายา จ. นครปฐม หนูทดลองจะถูกแบ่งกลุ่มเพื่อแยกเลี้ยงในกรง ๆ ละ 2 ตัว เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 25.0±2.0 องศาเซลเซียส ที่ตั้งเวลาเปิดของแสงไฟในห้องเลี้ยง ในช่วงเวลา 07:00-19:00 น. และได้รับอาหารเม็ด (สูตร G082, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม. มหิดล) และน้ำอย่างบริบูรณ์

หนูจะถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะไขมันในเลือดสูงโดยการให้อาหารที่มีส่วนประกอบของ Cholesterol 2,500 mg/kg BW, Bile extract 1,250 mg/kg BW, Coconut oil 1,250 mg/kg BW และ Distilled water 5,000 mg/kg BW

สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

1) กลุ่มควบคุม: ได้รับอาหารปกติ

2) กลุ่มไขมันในเลือดสูง: ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ Vehicle คือ Propylene glycol ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย Piperine

3) กลุ่มไขมันในเลือดสูงที่ได้รับ Piperine (40 mg/Kg BW): ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ ได้รับ Piperine ในขนาด 40 mg/Kg BW โดยเริ่มให้พร้อมกัน และร่วมกันกับอาหารไขมันสูง

4) กลุ่มไขมันในเลือดสูงที่ได้รับ Piperine (80 mg/Kg BW): ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ ได้รับ Piperine ในขนาด 80 mg/Kg BW โดยเริ่มให้พร้อมกัน และร่วมกันกับอาหารไขมันสูง

5) กลุ่มไขมันในเลือดสูงที่ได้รับยา Symvastatin (2 mg/Kg BW): ได้รับอาหารไขมันสูงตามสูตรข้างต้น และ ได้รับยา Symvastatin ในขนาด 2 mg/Kg BW โดยเริ่มให้พร้อมกัน และร่วมกันกับอาหารไขมันสูง (Vijayakumar and Nalini, 2006)

สัตว์ทดลองจะได้รับสารต่าง ๆ ตามรายละเอียดข้างต้นติดต่อกันนานเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยจะถูกวัดค่าต่าง ๆ ดังนี้

1. วัดน้ำหนักตัวและระดับไขมันในเลือดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง
2. วัดความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจทุก 2 สัปดาห์

หลังจากนั้นสัตว์ทดลองจะถูกทำให้ตายอย่างสงบ แล้วจึงแยกหลอดเลือดแดงเอออตาร์เพื่อนำไปศึกษาการทำงานต่อไป ซากสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตแล้วจะถูกเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ -20oC จนกว่าจะนำไปทำลาย

เกณฑ์การคัดเลือกหรือคัดแยกสัตว์ทดลอง (Inclusion and Exclusion criteria)

ก่อนเริ่มทำการวิจัย ทีมผู้วิจัยจะคัดเลือกหรือคัดแยกหนูทดลอง โดยใช้หลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

1) จะเลือกเฉพาะหนูทดลองเพศผู้ ที่มีสายพันธุ์แน่นอน คือ พันธุ์ Sprague Dawley rat ซึ่งจะสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ อ.ศาลายา จ.นครปฐม เท่านั้น
2) จะเลือกเฉพาะหนูหนุ่มที่มีขนาดน้ำหนักตัวระหว่าง 150-200 กรัม
3) จะไม่เลือกหนูทดลองที่กำลังป่วย มีไข้ หรือมีการติดเชื้อ
4) หนูที่ใช้ต้องมีระดับไขมันปกติ โดยจะเจาะเลือดหนูทุกตัวเพื่อตรวจวัดระดับไขมันก่อนเริ่มทำการทดลอง

เกณฑ์การให้เลิกจากการศึกษา (Discontinuation criteria)

ในขณะกำลังดำเนินการวิจัย ทีมผู้วิจัยมีเกณฑ์ยุติการศึกษา (นอกเหนือจากการสิ้นสุดการวิจัย) โดยใช้หลักดังต่อไปนี้

1) หนูทดลองที่มีสภาพร่างกายไม่สมบูรณ์
2) หนูทดลองที่ป่วย มีไข้ ติดเชื้อ หรือได้รับบาดเจ็บ
3) หนูทดลองที่มีความผิดปกติทางจิตและพฤติกรรม เช่น หวาดระแวง ดุร้าย หรือ ก้าวร้าว เป็นต้น
4) หนูทดลองที่ถูกคัดออกจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบด้วย CO2

3 การศึกษาผลของ Piperine ต่อน้ำหนักตัว ความดันเลือดเลือด อัตราการเต้นของหัวใจและระดับไขมันในเลือด

- สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะถูกวัดน้ำหนักสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

- สัตว์ทดลองจะถูกนำมาวัดความดัน Systolic blood pressure และ อัตราการเต้นของหัวใจทุก ๆ 2 สัปดาห์ ติดต่อกันตลอดระยะเวลาที่ศึกษาวิจัย โดยเป็นการวัดความดันเลือดจากหลอดเลือดที่หางโดยใช้อุปกรณ์ Non-Invasive Blood Pressure (NIBP) Controller (A.D. Instruments, Castle Hill, Australia) ค่าความดันเลือดที่วัดได้จะถูกบันทึกโดยอุปกรณ์ MacLab A/D converter (Chart V4; A.D. Instruments, Castle Hill, Australia) ทั้งนี้หนูทุกตัวจะถูกฝึกให้อยู่ใน Restrainer เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลองจริงเพื่อลดความเครียดของสัตว์ทดลองที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวัดความดันโลหิต

- การวัดระดับของไขมันจะทำทุก ๆ สัปดาห์ ๆ ละ 1 ครั้ง ติดต่อกันตลอดระยะเวลาที่ศึกษาวิจัย โดยจะเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณหางในปริมาณ 0.5 ml ต่อครั้งต่อตัว เพื่อไปวัดระดับ Total cholesterol, Triglyceride, และ High density lipoprotein โดยวิธี Enzymatic assay

4 การศึกษาผล Piperine ต่อการทำงานของหลอดเลือดเอออตาร์

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง โดยสัตว์ทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยใช้ยาสลบก่อนจึงตัดขั้วหัวใจ แล้วแยกเอาหลอดเลือดแดงเอออตาร์ออกมา จากนั้นจึงนำหลอดเลือดไปแขวนในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Physiological solution หรือ KREBS solution ที่มีส่วนประกอบ คือ NaCl 122 mM; KCl 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N′-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES) 10 mM; KH2PO4 0.5 mM; NaH2PO4 0.5 mM; MgCl2 1 mM; glucose 11 mM and CaCl2 1.8 mM และ ปรับ pH = 7.3 ด้วย NaOH ตลอดจนควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส หลอดเลือดที่แยกได้แล้วจะถูกแขวนด้วยแรงตึงที่ระดับ optimal tension (1 กรัม) และ ทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงก่อนทำการทดลองโดยทำการเปลี่ยน KREBS solution ทุกๆ 15 นาที

การตอบสนองของหลอดเลือดจะถูกวัดในรูปการเปลี่ยนแปลงของแรงตึงตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการหยดสาร Phenylephrine (10-5 M) เพื่อทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อน จากนั้นจึงหยด Acetylcholine (10-7-10-3 M) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยออกฤทธิ์ที่ Endothelium มีผลเพิ่มการหลั่ง Nitric oxide การเปลี่ยนแปลงของแรงที่เกิดขึ้นจะถูกวัดโดยตัวแปลงสัญญาณความแรง (force transducer) และ กราฟการตอบสนองที่ได้จะถูกบันทึกโดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney, Australia)

5 วิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่า เฉลี่ย (Mean) และ ความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่มทดลอง จะทำโดยวิธี Student t-test และหรือ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวนกลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และ ค่า p value <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โครงการย่อยที่ 3: การวิเคราะห์ผลของสารไพเพอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

1. **การเตรียมตัวอย่างโปรตีน**

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการให้หนูกินสารไพเพอรีนสัตว์ทดลองจากโครงการย่อยที่ 2 สัตว์ทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบ แล้วแยกเอาตับและอวัยวะส่วนอื่นๆเช่น ไต, ม้าม, หลอดเลือด, หัวใจ, สมอง เป็นต้นออกมา ตับและอวัยวะต่าง ๆ ที่ได้จะถูกเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพื่อคงสภาพการเป็นเนื้อเยื่อไว้ เนื้อตับน้ำหนัก 1 กรัม ถูกนำมาบดด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อ และถูกย่อยด้วยสารเคมี เพื่อทำลายผนังของเซลล์ตับ โปรตีนที่สกัดได้จะถูกวัดปริมาณด้วยวิธีมาตรฐาน Bradford เพื่อใช้ในการประมาณการแยกด้วยแยกด้วยไฟฟ้าบน SDS-PAGE

2. การแยกโปรตีน

ทำการแยกโปรตีนที่สกัดจากตับโดยใช้ SDS-PAGE ซึ่งสารละลายโปรตีนจะถูกแยกใน12% acrylamide gel และให้กระแสไฟฟ้าขนาด 10 มิลลิแอมป์เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย 25 มิลลิแอมป์ไปจนกว่าแถบของ bromophenol blue ติดอยู่เบื้องล่างของเจล เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าว สามารถติดตามโปรตีนได้โดยการย้อมสีย้อม Coomassie G-250 หรือ silver stain และสามารถเก็บรักษาสภาพเจลที่ 4 องศาเซลเซียส

3. **การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีนโดยใช้เทคนิค Mass Spectrometry**

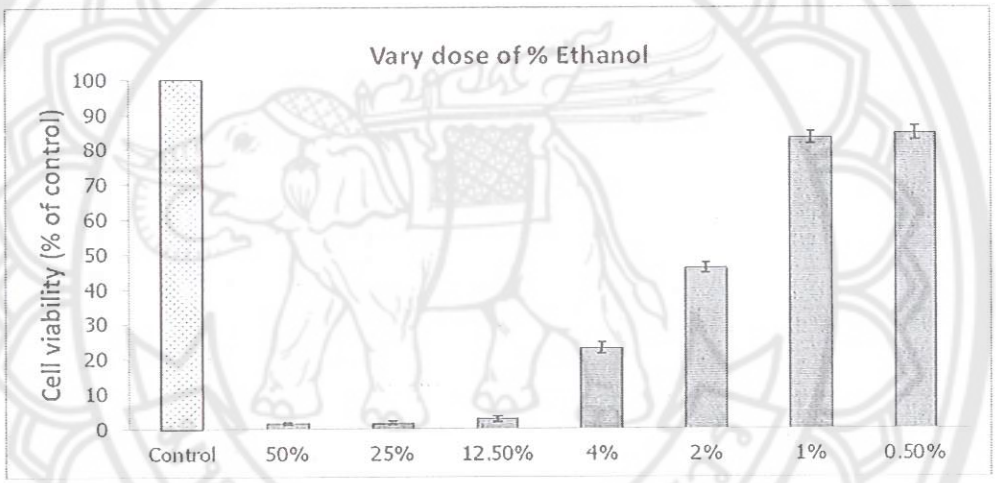
หลังจากที่ได้ทำการแยกและเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีน โดยการตัดเอาแถบของโปรตีนบนเจลตามตำแหน่งโปรตีนมาตรฐานให้มีขนาด 1 X 1 มม. แล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน(Trypsin) เพื่อตัดสายโพลีเปปไทป์สายยาวให้เป็นสายสั้นๆ (5 ถึง 10 กรดอะมิโน) แล้วเข้าทดสอบด้วยเครื่อง mass spectrometry (LC-MS/MS) โดยเครื่องจะเก็บข้อมูลเป็น peak ของมวลโมเลกุลของแต่ละสายโปรตีน แล้วเทียบ peak ดังกล่าวด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ DecyderTM MS เพื่อระบุความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ และนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ได้เทียบฐานข้อมูลในโปรแกรม MASCOT (Matrix Science Ltd, London, UK) โดยใช้ฐานข้อมูลของ NCBInr

บทที่ 3
ผลการทดลอง

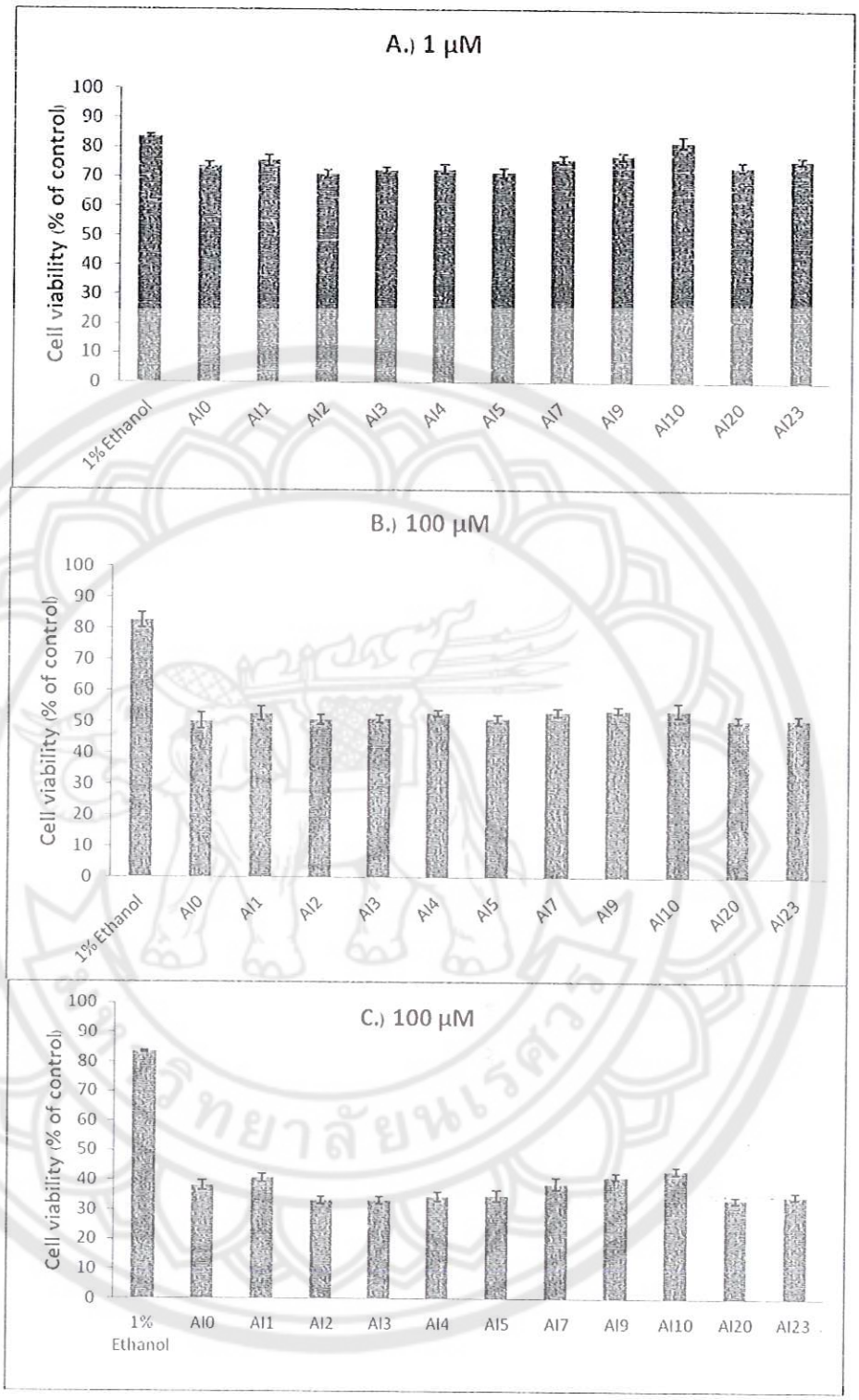
โครงการย่อยที่ 1: ไพเพอรีนและอนุพันธ์ยับยั้งอ็อกซิเดชั่นของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำและการนำเข้าเซลล์แมคโครฟาจ

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

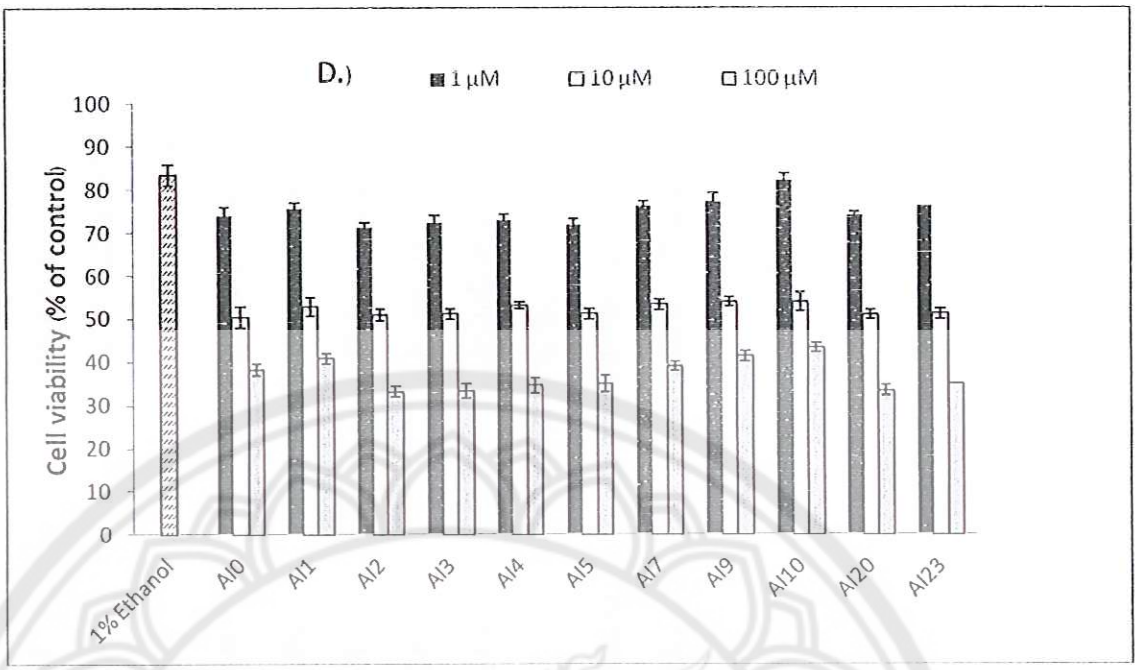
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 เมื่อทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น ethanol ต่างๆ ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับการละลายของไพเพอรีนและอนุพันธ์ในการทดลองนี้ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 0.5% ของ ethanol พบว่ามีผลน้อยต่ออัตราการมีชีวิตของซลล์ ผู้วิจัยจึงเลือกที่ระดับความเข้มข้น 1% ethanol สำหรับการละลายของ piperine และอนุพันธ์ในการทดลองนี้ อีกทั้งที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวช่วยในการทำละลายของไพเพอรีนและอนุพันธ์ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 3 ผลของ ethanol ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ murine macrophage RAW264.7 cells โดยเลี้ยงเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 1%, 10%, 12.50%, 4%, 2%, 1%, และ 0.50% ของ ethanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัด % cell viability ด้วย MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SEM โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (triplication)



รูปที่ 4 ผลของ piperine และอนุพันธ์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells เลี้ยงเซลล์ด้วยสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัด cell viability ด้วย MTT assay ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SEM จาก 3 การทดลองโดยแต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (triplication)

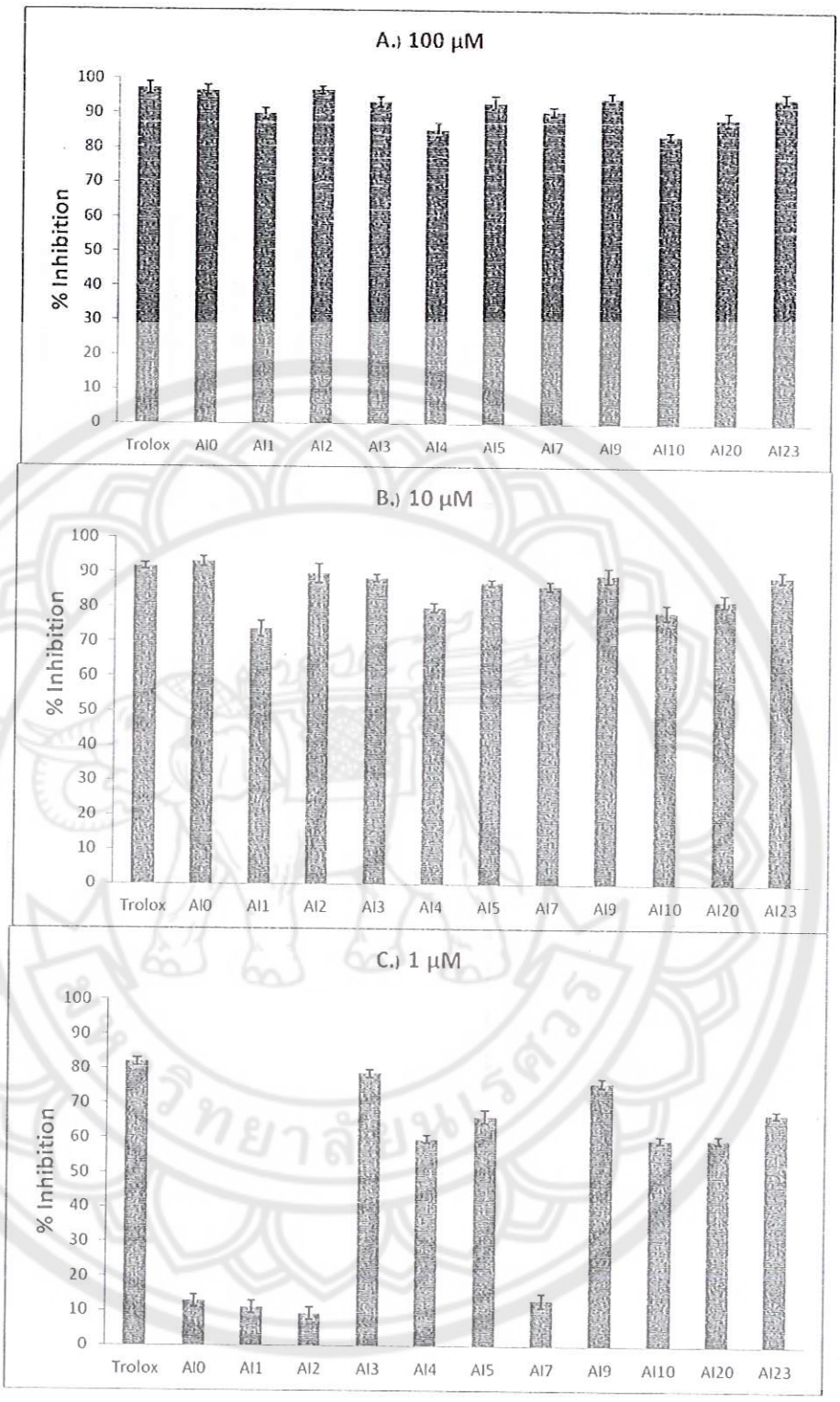


รูปที่ 5 สรุปผลของ piperine และอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells

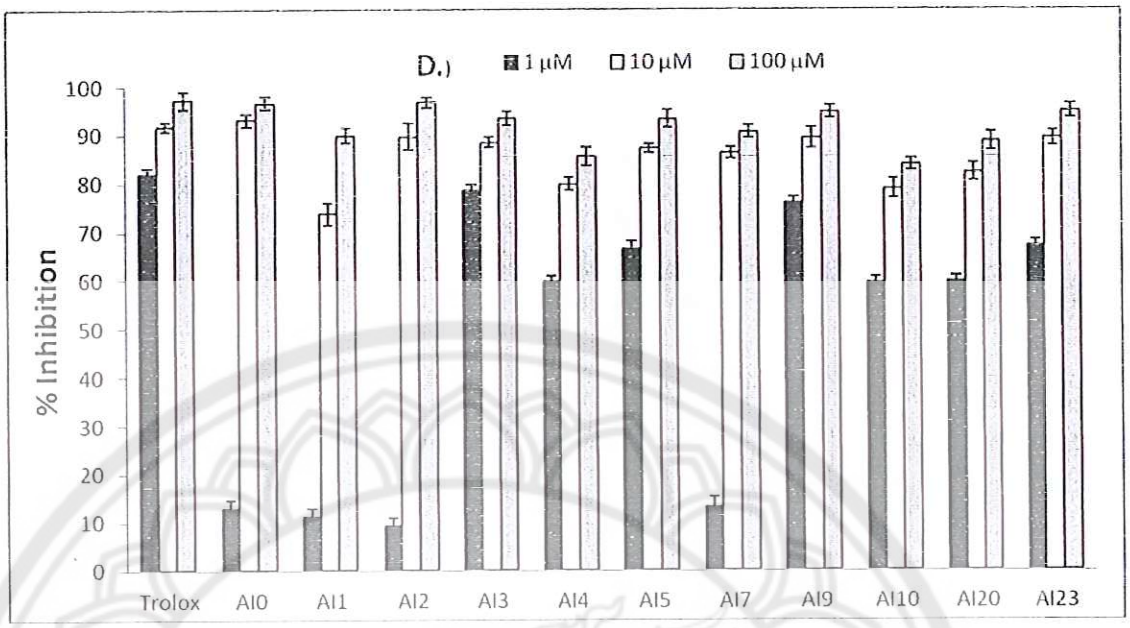
ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4 A, B และ C พบว่าสารที่ระดับความเข้มข้น 100 μM และ 10 μM ทำให้เซลล์ Murine macrophage RAW264.7 cells ตายไป คงเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ประมาณ 30% และ 50% ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1 μM จะมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์น้อย คือ มีค่า cell viability อยู่ที่ประมาณ 80% cell viability ซึ่งถือว่าเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ในเซลล์หรือในการศึกษาต่อไป

การเกิด lipid oxidation ของ LDL

การทดสอบ piperine และอนุพันธ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาของการเกิด lipid oxidation ของ LDL ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ trolox (vitamin E analog) การเหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ทำได้โดย incubate LDL ด้วย $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้น 50 μM ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่า LDL ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย $CuSO_4$ ได้ดี ส่วนการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น10 และ 100 μM มีความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดีกว่า 1 μM เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation จะเห็นได้ว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM ได้แก่ สารตัวอย่างรหัส AI0 และ AI2 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ trolox ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน และสารตัวอย่างรหัสทั้งหมดยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าของสารตัวอย่างรหัสเหล่านั้นเป็น dose-dependent pattern ที่ระดับความเข้มข้น 10 μM ได้แก่ สารตัวอย่างรหัส AI0 มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่า trolox และสารตัวอย่างรหัส AI2, AI3, AI9 และ AI23 มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ trolox ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM พบว่าไม่มีสารตัวอย่างรหัสใดมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ trolox



รูปที่ 6 ผลของการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ต่อ lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย $CuSO_4$ โดยเติม piperine และอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 µM ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD จาก 3 การทดลองโดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplication)

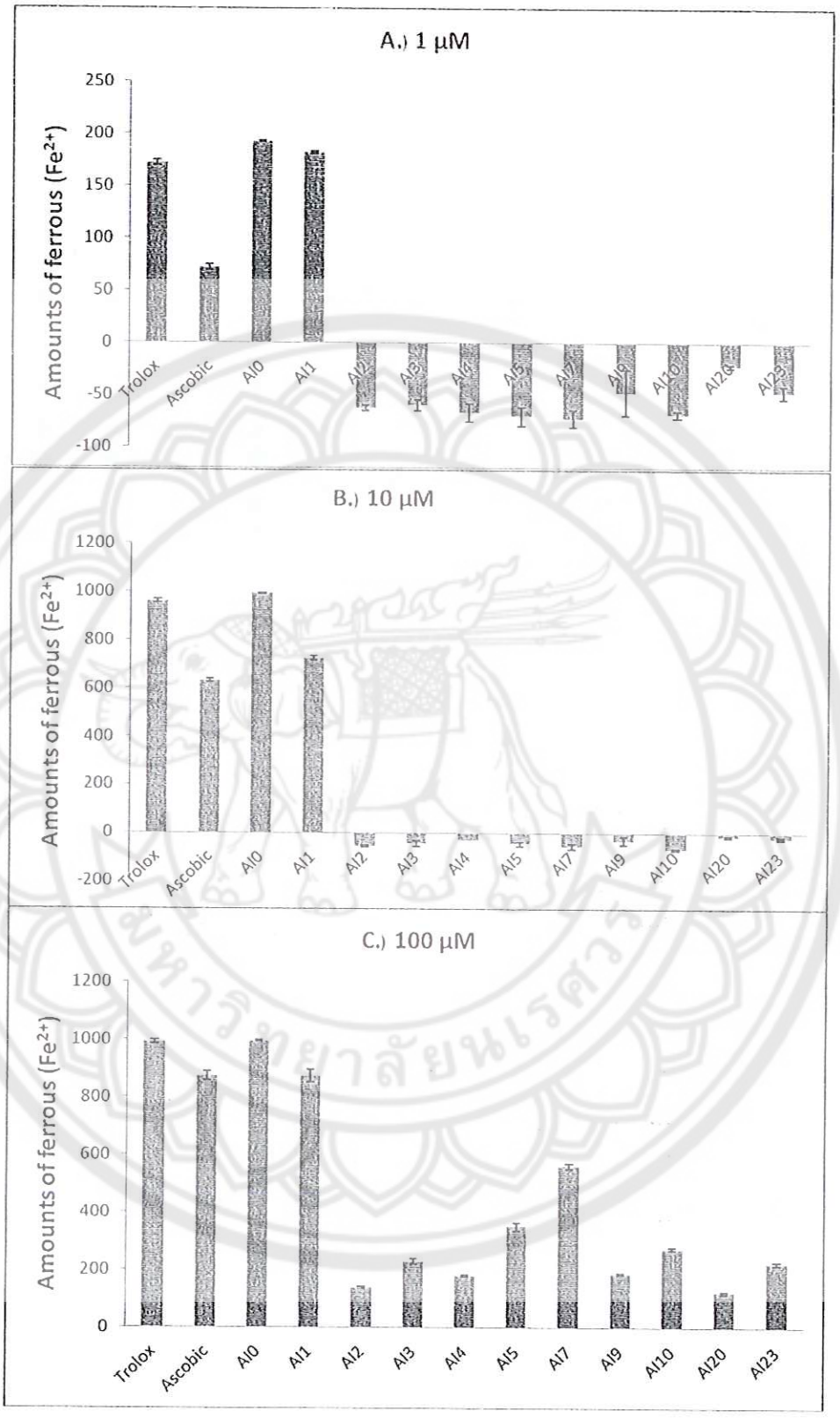


รูปที่ 7 สรุปผลของการทดสอบ piperine และอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อ lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ด้วย $CuSO_4$

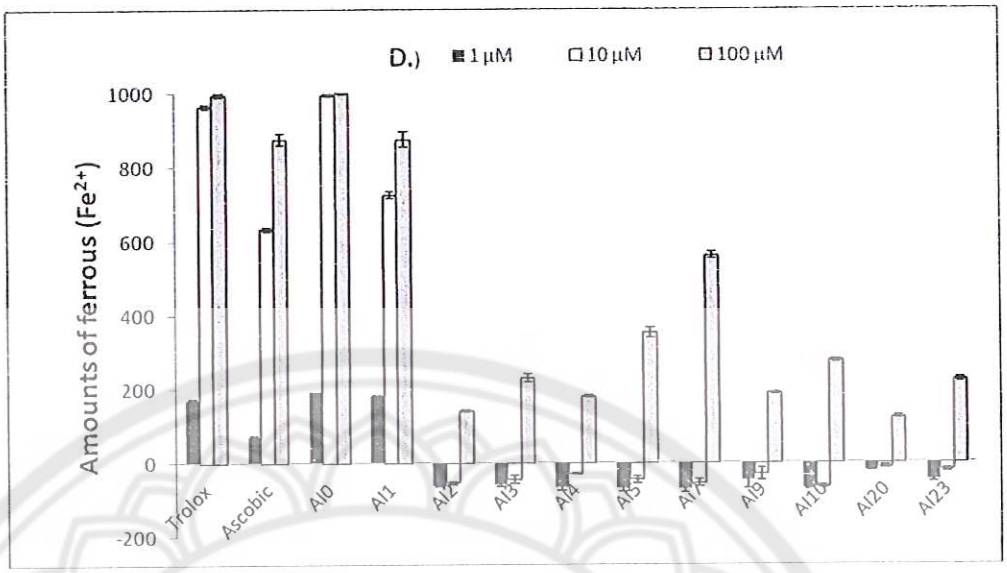
การทดสอบการเป็น reducing agent ด้วยวิธี FRAP

จากผลการทดลอง reducing activity ด้วย FRAP assay โดยการทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับ trolox และ ascorbic acid ผลการทดลองในการทดสอบฤทธิ์การเป็น reducing agent โดยทดสอบความสามารถในการเปลี่ยน Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่า piperine และสารอนุพันธ์ของ piperine ที่ระดับความเข้มข้น 100 µM ของสารตัวอย่างทุกรหัส มีความสามารถในเป็น reducing agent ได้ดีกว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 1 µM ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า สาร AI0, AI1 และ AI7 เป็นสาร reducing agent ที่ดี ระดับความเข้มข้น 100 µM เมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างรหัสอื่นที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันอย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ trolox จะเห็นได้ว่าสาร AI0, AI1 เป็นสาร reducing agent ที่ฤทธิ์ใกล้เคียงกัน ส่วนกรณีเปรียบเทียบกับ ascorbic acid จะเห็นได้ว่าสาร AI0, AI1 เป็นสาร reducing agent ที่ฤทธิ์ที่ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 1000 µM

ส่วนความสามารถการเป็นสาร reducing agent ของสารตัวอย่างรหัสที่เหลือนั้น ไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเทียบกับฤทธิ์ของ Trolox และ Ascobic ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน



รูปที่ 7 การทดสอบ reducing activities ของ piperine และสารอนุพันธ์ ด้วยวิธี FRAP assay ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SEM จากระดับความเข้มข้น 10, 100, 1000 µM โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง (triplication)

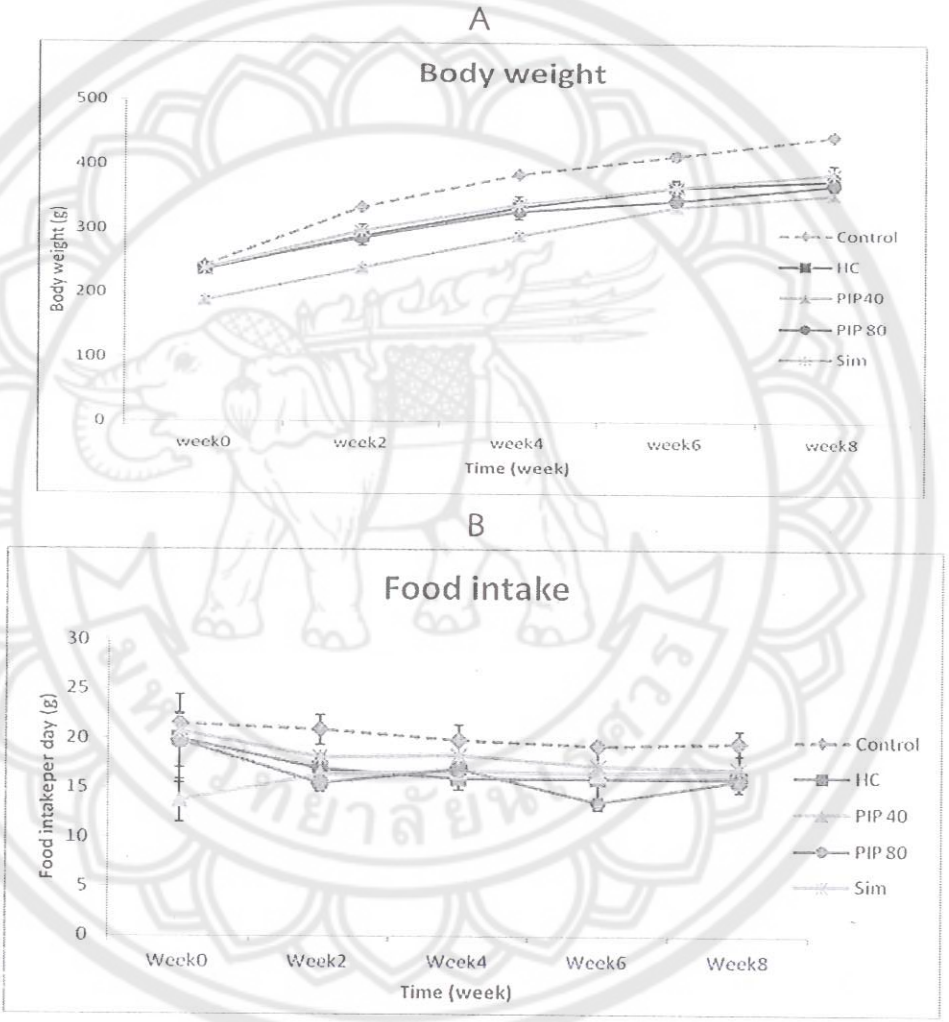


รูปที่ 8 สรุปผลการทดสอบ reducing activities ของ piperine และสารอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

โครงการย่อยที่ 2: ผลของสารไพเพอรีนต่อระดับไขมัน และหน้าที่ของหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

1. **ผลของการให้สารไพเพอรีนต่อน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินต่อวัน**

จากการชั่งน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินตลอดช่วงระยะเวลาการทดลองพบว่า หนูทดลองมีการเจริญเติบโตเป็นปกติในทุกกลุ่ม โดยพบว่าหนูกลุ่มควบคุม (control) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวมากที่สุดและในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงร่วมกับสารสกัดไพเพอรีน ขนาด 40 mg/kg (กลุ่ม PIP40) 80 mg/kg (กลุ่ม PIP80) และ Simvastatin 2 mg/kg (กลุ่ม Sim) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว (กลุ่ม HC) (รูปที่ 1A)



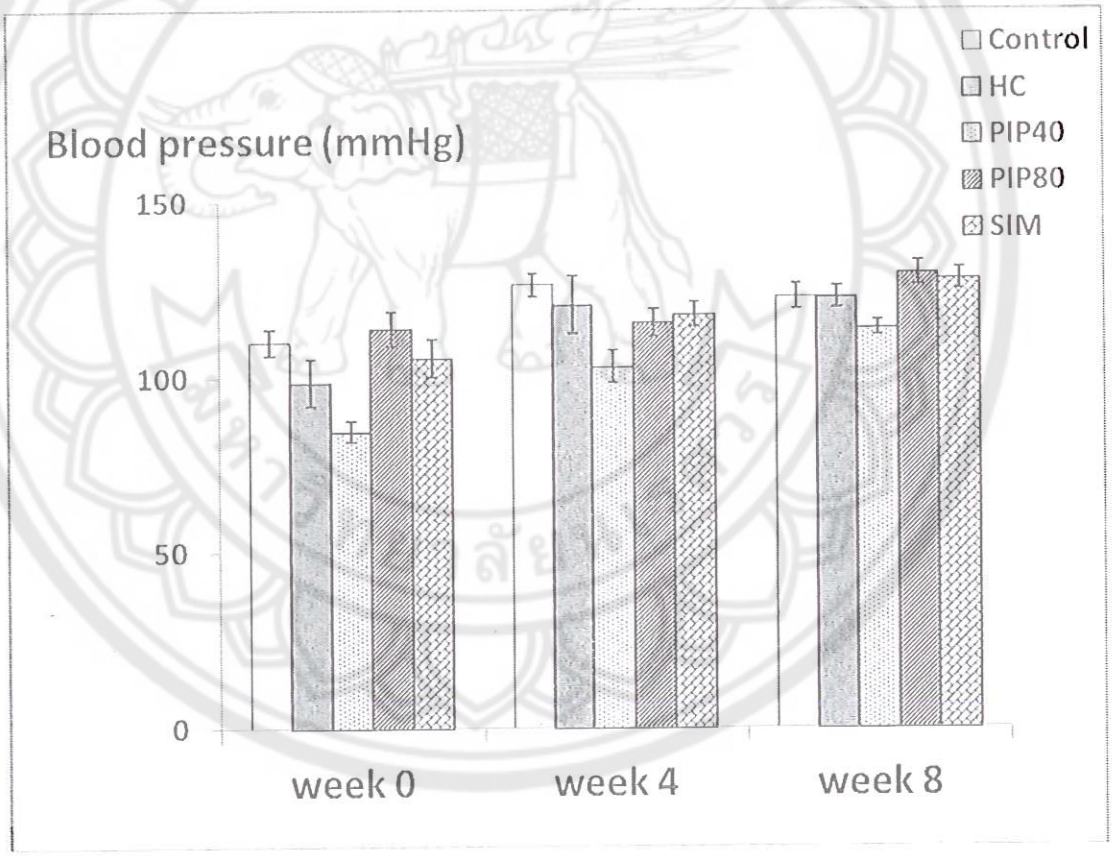
รูปที่ 1 ผลของการให้สารไพเพอรีนขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (A) และ ปริมาณอาหารที่หนูกินต่อวัน (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means ± sem, n=6-8

เช่นเดียวกับปริมาณอาหารที่หนูกินในแต่ละวัน พบว่าหนูทุกกลุ่มกินอาหารได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยหนูกลุ่ม control กินอหารได้มากกว่ากลุ่มอื่นเล็กน้อยในขณะที่หนูในกลุ่ม HC, PIP40, PIP80 และ Sim กินอาหารได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 1B)

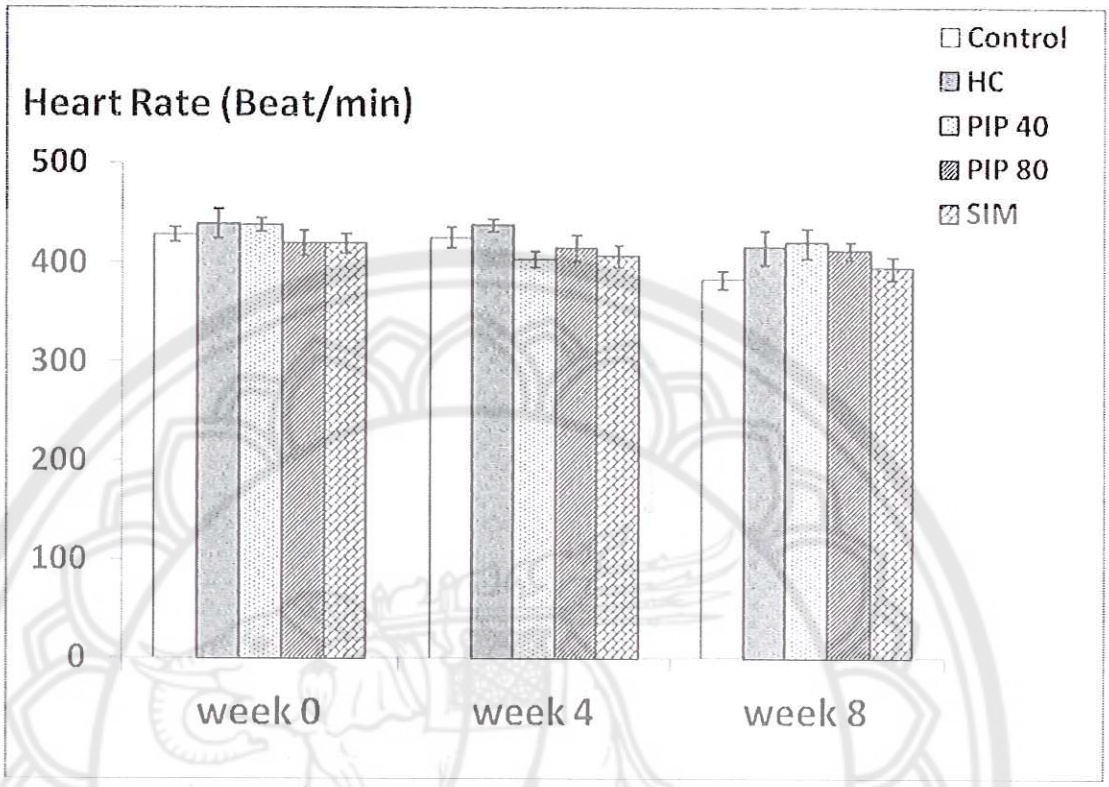
2. ผลของการให้สารไพเพอรีนต่อค่าความดันโลหิต Systolic และอัตราการเต้นของหัวใจ

ผู้วิจัยได้ทำการวัดค่าความดันโลหิต systolic blood pressure (SBP) ของหนูในกลุ่ม control, HC, PIP40, PIP80 และ Sim เป็นช่วงเวลาดังนี้คือ ก่อนการทดลอง (week0) หลังการทดลอง 4 สัปดาห์ (week4) และหลังการทดลอง 8 สัปดาห์ (week8) โดยพบว่าค่า SBP ในหนูทดลองแต่ละกลุ่มมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2A) ส่วนอัตราการเต้นของหัวใจ (Heart rate; HR) เมื่อเปรียบเทียบทั้งก่อนและหลังการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในหนูแต่ละกลุ่ม (รูปที่ 2B)

A



B



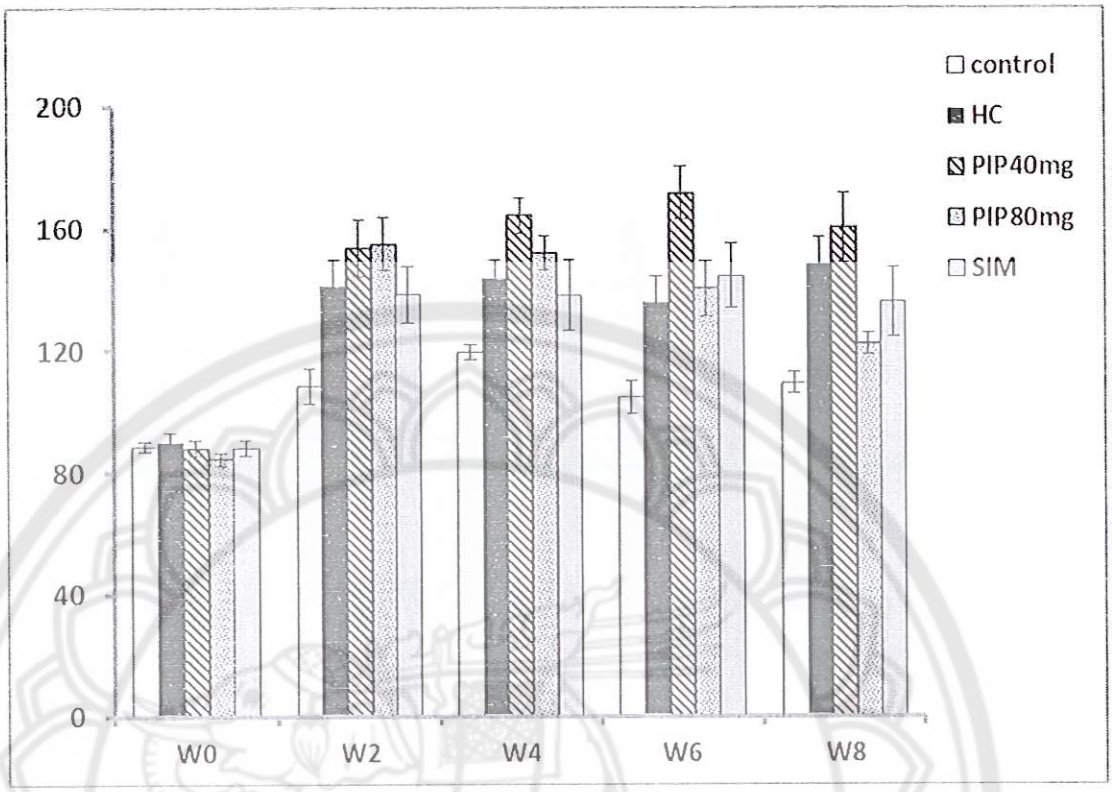
รูปที่ 2 ผลของการให้สารไพเพอรีนขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อค่าความดัน systolic blood pressure (A) และ อัตราการเต้นของหัวใจ (B) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means ± sem, n=6-8

3. ผลของการให้สารไพเพอรีนต่อค่าชีวเคมีในเลือดในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

3.1 ผลของสารสกัดไพเพอรีนต่อระดับ total cholesterol

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าการให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงส่งผลให้ระดับระดับ total cholesterol ในหนูกลุ่ม HC เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$; รูปที่ 3) และเมื่อเปรียบเทียบระดับ total cholesterol ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไพเพอรีนกับกลุ่ม HC พบว่าไพเพอรีนที่ขนาด 80 mg/kg และ Simvastatin 2 mg/kg มีผลลดระดับ total cholesterol ในกระแสเลือด (รูปที่ 3) ได้อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 8 โดยมีระดับ total cholesterol ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

จากข้อมูลนี้สามารถสรุปได้ว่าการให้สารสกัดไพเพอรีนขนาด 80 mg/kg เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงมีผลลดระดับ total cholesterol ในกระแสเลือดได้



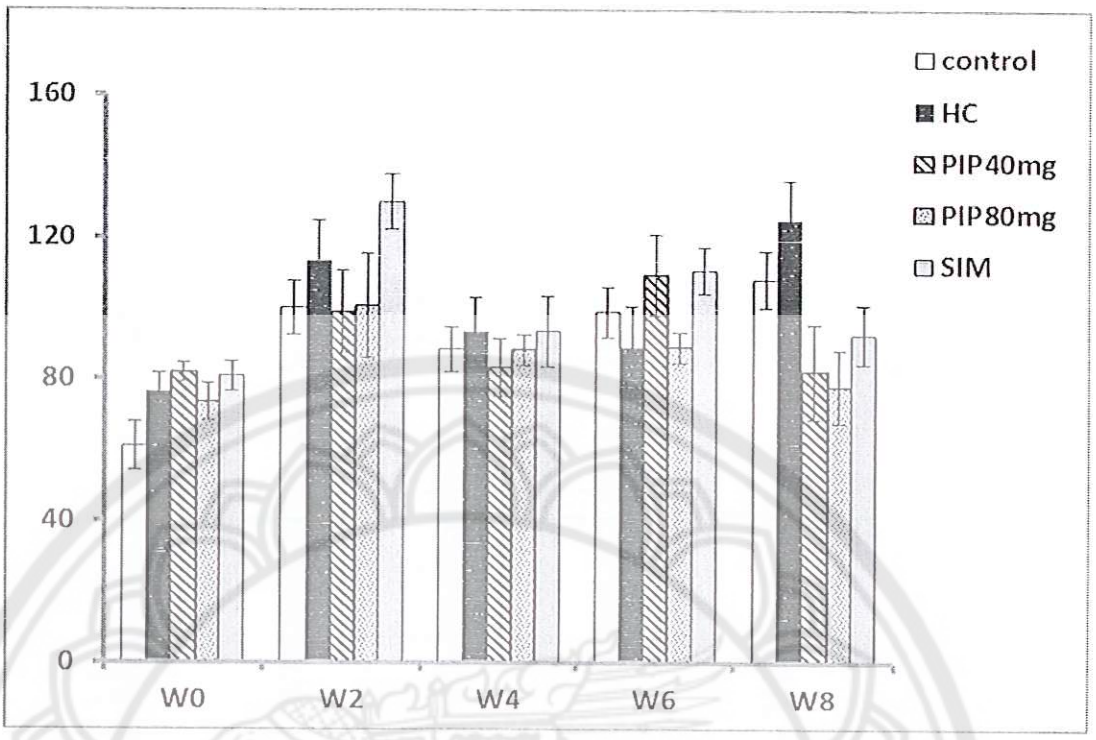
รูปที่ 3 ผลของการให้สารไพเพอรีนขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ total cholesterol ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่างๆ คือ means ± sem, n=6-8

* คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

** คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.2 ผลของสารไพเพอรีนต่อระดับ triglycerides

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของ triglyceride มีค่าเพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (รูปที่ 4) การให้ไพเพอรีนที่ขนาด 40, 80 mg/kg และ Simvastatin 2 mg/kg มีผลลดระดับ triglyceride ในกระแสเลือด (รูปที่ 4) ได้อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 8 โดยมีระดับ total cholesterol แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง ($p<0.05$)



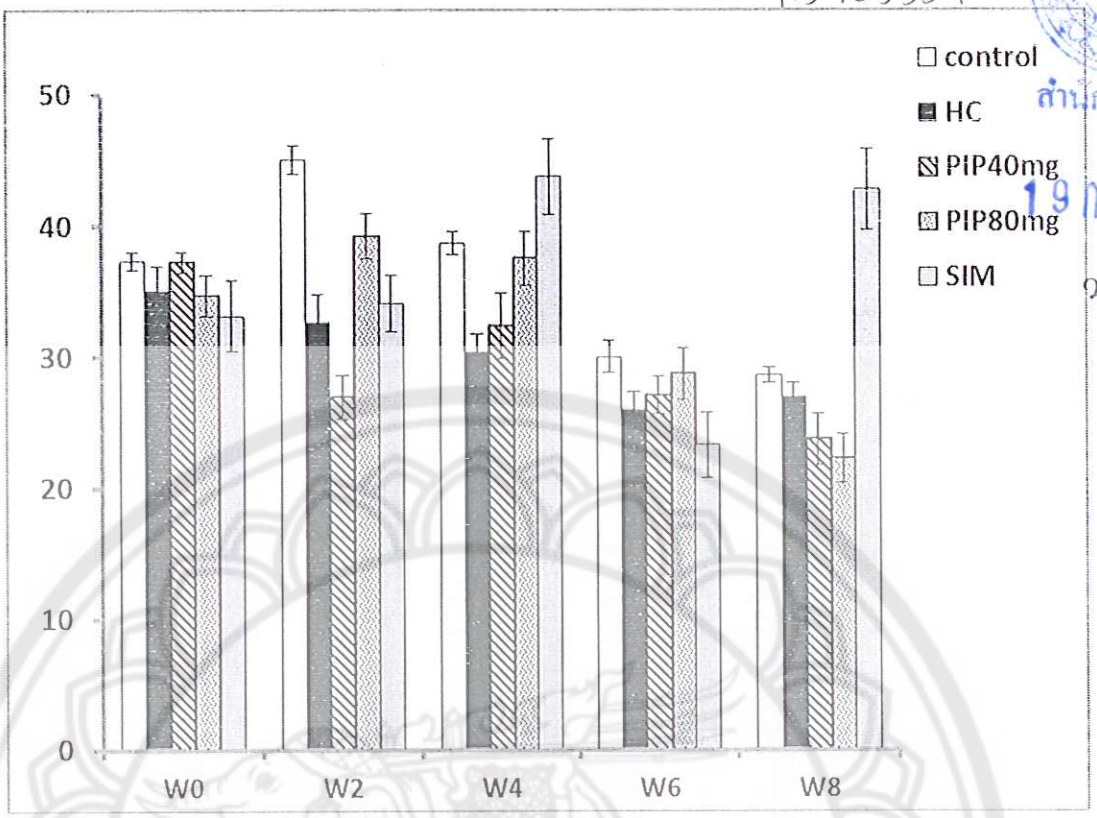
รูปที่ 4 ผลของการให้สารไพเพอรีนขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ triglyceride ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means ± sem, n=6-8

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC)

3.3 ผลของสารสกัดไพเพอรีนต่อระดับ HDL

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของ HDL มีแนวโน้มลดลงในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin (รูปที่ 5) ซึ่งมีผลทำให้ HDL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$)

i.5935337
สำนักหอสมุด.
19 ก.ค. 2555
9 RC
667
ก1855
2555

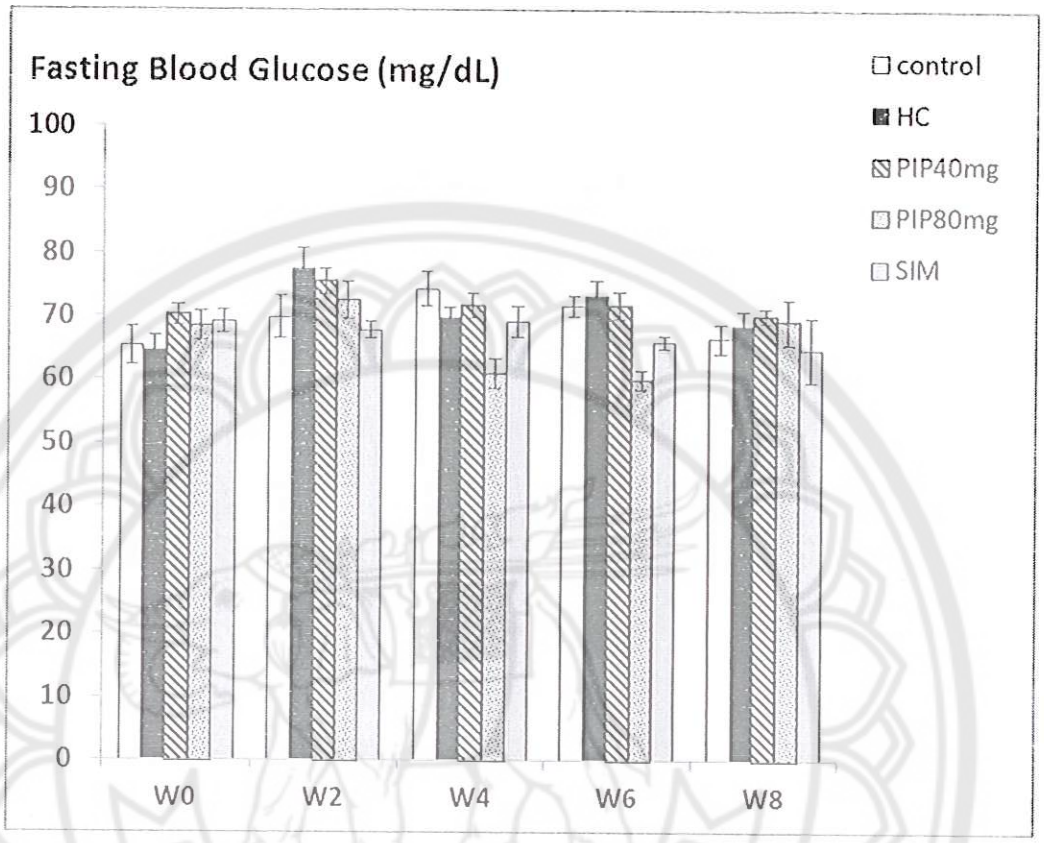


รูปที่ 5 ผลของการให้สารไพเพอรีนขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ HDL ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means ± sem, n=6-8

* $p<0.001$ คือ มีค่าทางชีวเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่ม PIP40, PIP80 และ กลุ่ม HC

3.4 ผลของสารสกัดไพเพอรีนต่อระดับ fasting blood glucose

ภายหลังการทดลองผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ Fasting blood glucose (รูป 6)

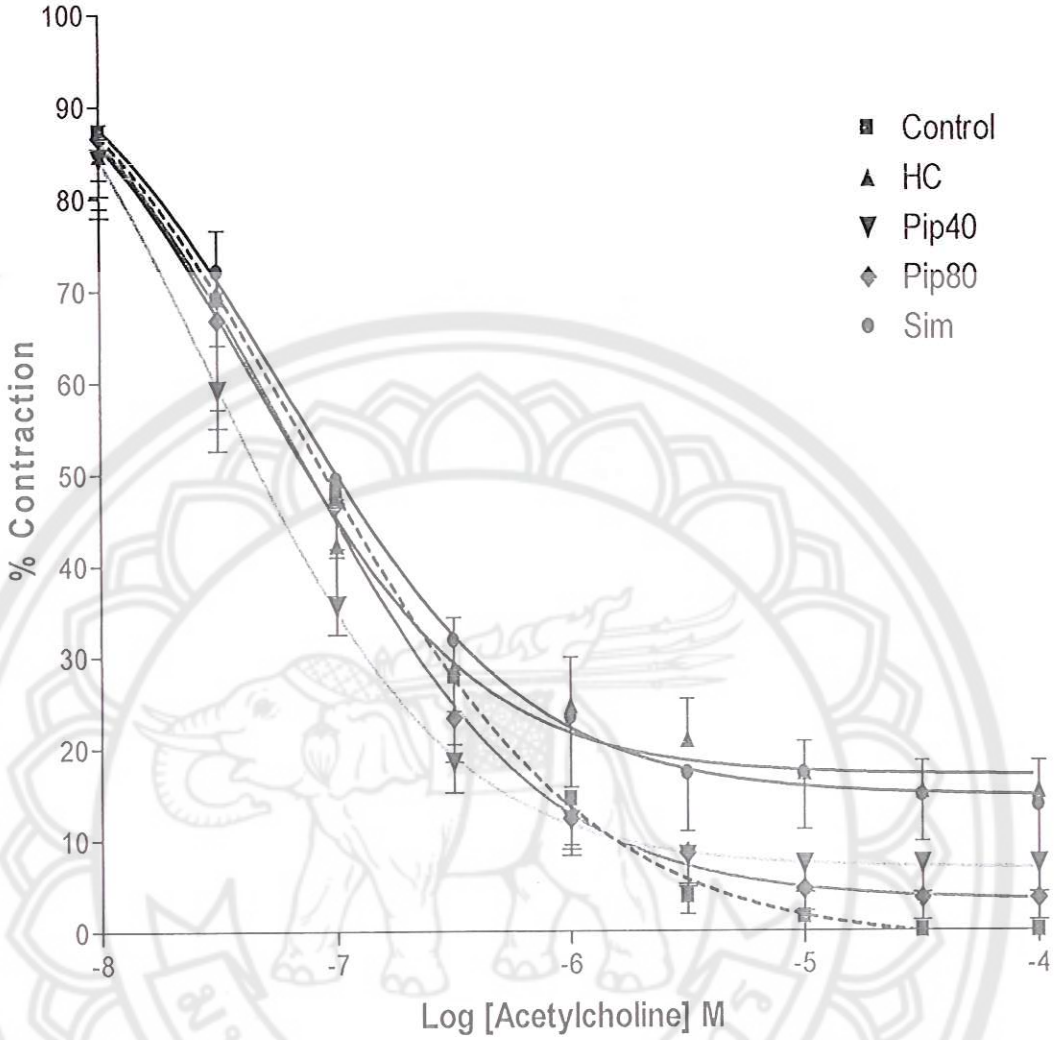


รูปที่ 6 ผลของการให้สารไพเพอรีนขนาด 40mg/kg BW (PIP40) 80 mg/kg BW (PIP80) หรือยา Simvastatin 2 mg/kg BW (Sim) ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ต่อระดับ Fasting blood glucose ในกระแสเลือดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) ค่าต่าง ๆ คือ means ± sem, n=6-8

4. ผลของการให้สารสกัดไพเพอรีนต่อการคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ต้า

จากการศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำโดยการให้สาร acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันนั้น และนำข้อมูลมาทำ concentration response curve (รูปที่ 7) แล้วพบว่าหลอดเลือดเอออร์ต้าของหนูกลุ่ม HC มีความสามารถในการคลายตัวลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control และการให้สารสกัดไพเพอรีนขนาด 40mg/kg หรือ 80mg/kg (PIP40, PIP80) สามารถช่วยฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดได้

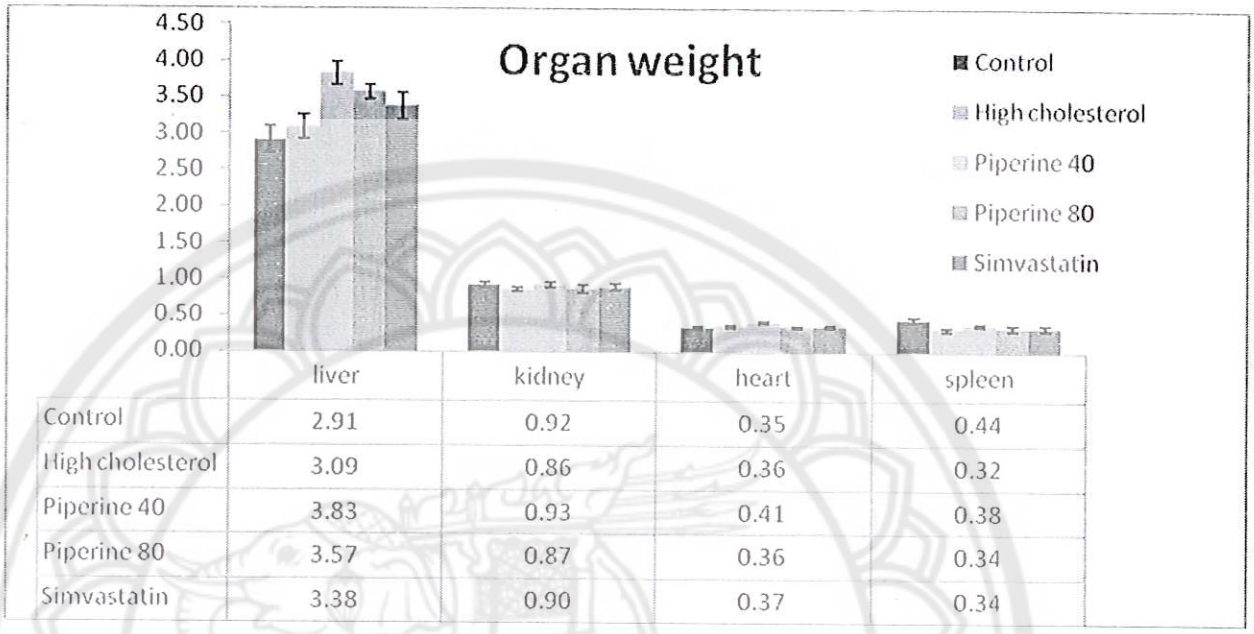
จากข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าการให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงแก่สัตว์ทดลองมีผลทำให้ความสามารถในการคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ต้าลดลง และการให้สารสกัดไพเพอรีนมีส่วนช่วยฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดได้



รูปที่ 7 แสดงผลของการให้สารสกัดไพเพอรีนขนาด 40 mg/kg หรือ 80 mg/kg หรือ simvastatin 2mg/kg เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ต่อการทำงานของหลอดเลือดเอออร์ต้า ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (กลุ่ม HC) แกน X คือ ค่าความเข้มข้นของ Acetylcholine (log M) ส่วนแกน Y แสดง % Contraction ค่าต่าง ๆ คือ Mean ± SEM, n=6-8

โครงการย่อยที่ 3: การวิเคราะห์ผลของสารไพเพอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

กราฟแสดงน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์



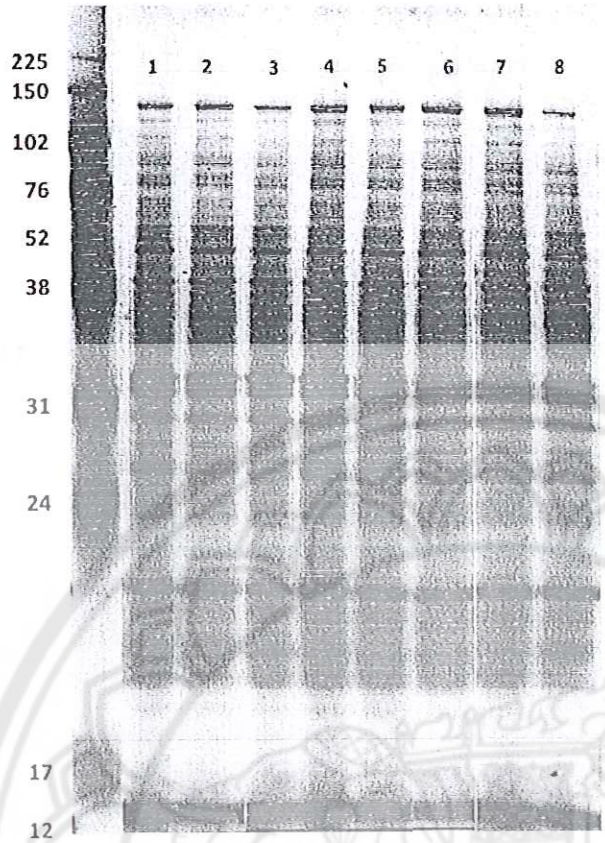
	liver	kidney	heart	spleen
Control	2.91	0.92	0.35	0.44
High cholesterol	3.09	0.86	0.36	0.32
Piperine 40	3.83	0.93	0.41	0.38
Piperine 80	3.57	0.87	0.36	0.34
Simvastatin	3.38	0.90	0.37	0.34

หมายเหตุ:

$$\text{น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์(กรัม\%)} = \left[\frac{\text{น้ำหนักอวัยวะ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัว(กรัม)}}\right] \times 100$$

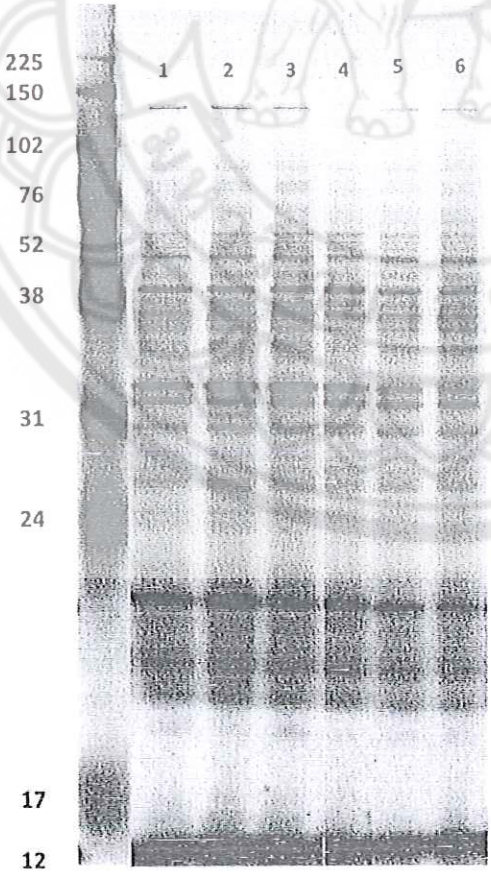
ผลการศึกษาแผนภูมิโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

การศึกษาผลของสารไพเพอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนู ในหนูทดลอง Sprauge Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 200-210กรัม (n=6-8) ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารโพรเพอรีนไกลคอล และกลุ่มที่ได้รับสารไพเพอรีน ในปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนในตับด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลที่ได้พบว่า แถบโปรตีนของตับทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสารไพเพอรีน จากการ load ในปริมาณที่เท่ากัน 500µg/lane จากการวิเคราะห์ด้วยตาเปล่าในเบื้องต้น ยังไม่พบความแตกต่างของแถบโปรตีนระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (ดังแสดงในภาพ A และ B)



Rat liver protein profiles of the control group (n=8)

Amount of proteins in each lane is 500 ug



Rat liver protein profiles of the piperine treated group (n=6)

Amount of proteins in each lane is 500 ug

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการย่อยที่ 1: ไพเพอรีนและอนุพันธ์ยับยั้งอ็อกซิเดชั่นของไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำและการนำเข้าเซลล์แมคโครฟาจ

จากผลการทดลองทั้งหมดผู้วิจัยได้เริ่มต้นทำการทดสอบผลของสารตัวอย่างจาก piperine และอนุพันธ์ต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1 μM) สารมีผลต่ออัตราการมีชีวิตต่ำกว่าสารที่ระดับความเข้มข้น (10 μM และ 100 μM) ดังนั้น จึงพิจารณานำเอาระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบโดยวิธี MTT assay ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ macrophage นำไปใช้ในการทดลองระดับเซลล์ นั่นคือ ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสม สำหรับผลการทดลองเกี่ยวกับคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) โดยใช้วิธี TBARs assay และ วิธี FRAP assay พบว่าสารที่มีคุณสมบัติที่ดี AI0 และ AI1 ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM และ 10 μM ทั้งค่า % inhibition และความสามารถ reducing agent ที่มีค่ามาก ส่วนสารตัวอย่างรหัส AI2, AI3, AI4, AI5, AI7, AI9, AI10, AI20 และ AI23 ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM และ 10 μM มีค่า % inhibition ที่สูงเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1 μM จะพบเพียงสารตัวอย่างรหัส AI3, AI4, AI5, AI9, AI0, A20 และ AI23 มีค่า % inhibition ที่สูง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารที่มีคุณสมบัติที่ดีในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) ทั้งค่า % inhibition และความสามารถ reducing agent ที่มีค่ามากจึงเหมาะสมต่อการนำไปทดสอบในเซลล์ต่อไป

โครงการย่อยที่ 2: ผลของสารไพเพอรีนต่อระดับไขมัน และหน้าที่ของหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการให้ piperine พร้อมกับ cholesterol นาน 8 สัปดาห์มีผลลด weight gain ลด total cholesterol (TC) และ triglyceride (TG) ซึ่งสอดคล้องการการศึกษาที่ผ่านมาโดย Shah และ คณะที่รายงานว่า piperine สามารถลด TC, TG และ fat mass แต่ไม่มีผลต่อ food intake ในหนูที่มีภาวะ hyperlipidemia อย่างไรก็ดีมีบางรายงานที่พบว่า piperine มีผลเพิ่ม food consumption

มีรายงานว่า piperine อาจมีผลต่อการดูดซึมของ cholesterol แต่ผลการศึกษานี้ยืนยันว่า piperine ออกฤทธิ์แบบ systemic เนื่องจากการทดลองได้ถูกออกแบบให้มีการให้ cholesterol ห่างจากการให้ piperine เป็นระยะเวลาห่างกัน 8 ชั่วโมง เพื่อลดปัญหาการรบกวนการดูดซึมของ piperine และ cholesterol ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของ piperine จึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการรบกวนการดูดซึมของ cholesterol

เนื่องจาก piperine มีโครงสร้างที่คล้ายกับ melanocortin (MC)-4 agonist จึงมีการเสนอว่า piperine อาจออกฤทธิ์โดยการกระตุ้น MC-4 receptor ที่สมองส่วน hypothalamus แล้วส่งผลลดความอยากอาหารและเพิ่ม insulin sensitivity ส่วนกลไกอื่น ๆ ของ piperine ที่เกี่ยวข้องกับการลดระดับไขมันในเลือดที่เคยมีรายงาน ได้แก่ 1) ยับยั้งการสังเคราะห์ cholesteryl ester (CE) 2) ยับยั้งการสะสมของ lipid และ lipoprotein โดยเปลี่ยนแปลงการทำงานของ lecithin cholesterol transferase, lipoprotein lipase และ acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) และ 3) ฤทธิ์ต้านการ

อักเสบ การศึกษานี้พบว่า HDL ลดลงในทุกกลุ่มของสัตว์ทดลอง ซึ่งกลไกที่ส่งผลดังกล่าวยังไม่ชัดเจนว่าเกิดจากอะไร

เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะ hyperlipidemia มีผลทำให้เกิด endothelial dysfunction ซึ่งจะทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดลดลง มีงานวิจัยที่รายงานภาวะดังกล่าวในสัตว์ทดลองที่มีภาวะ hyperlipidemia ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยในครั้งนี้ การให้ piperine มีผลทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดดีขึ้นในหนูที่มีภาวะ hyperlipidemia ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องอาจได้แก่ 1) piperine ยับยั้ง ACAT และลดการสังเคราะห์ CE ทำให้ลด lipid droplet และ ลดการเกิด foam cell ซึ่งเป็นสาเหตุของ endothelial dysfunction 2) piperine มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ 3) piperine ยับยั้งการแสดงออกของ cell adhesion molecules และ tumor necrosis factor-α ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดการอักเสบ

โดยสรุป piperine สามารถลดระดับไขมันในเลือดได้ และ ช่วยให้การทำงานของ endothelium ดีขึ้น ซึ่งอาจผ่านกลไกหลายอย่าง piperine จึงน่าจะมีบทบาทในการช่วยลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดได้ โดยควรมีการศึกษาในระดับคลินิกต่อไป

โครงการย่อยที่ 3: การวิเคราะห์ผลของสารไพเพอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนูที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง

การศึกษาผลของสารไพเพอรีนต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตับหนูด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลที่ได้พบว่า แถบโปรตีนของตับทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสารไพเพอรีน จากวิเคราะห์ด้วยตาเปล่าในเบื้องต้น ยังไม่พบความแตกต่างของแถบโปรตีนระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

บรรณานุกรม

ฐานข้อมูลสรรพคุณที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณ http://www.medplant.mahidol.ac.th/index.asp

Aviram, M., Kaplan, M. and Fuhrman, B. (2005) Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb Exp Pharmacol*, 263-300.

Bang JS, Oh da H, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, Yang HI, Yoo MC, Hahm DH and Kim KS. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. Arthritis Res Ther. 2009;11(2):R49.

Das B, Kundu J, Bachar SC, Uddin MA and Kundu JK. Antitumor and antibacterial activity of ethylacetate extract of Ludwigia hyssopifolia linn and its active principle piperine. Pak J Pharm Sci. 2007 Apr;20(2):128-31.

de Mattos Duarte C, Verli H, de Araújo-Júnior JX, de Medeiros IA, Barreiro EJ and Fraga CA. New optimized piperamide analogues with potent in vivo hypotensive properties. Eur J Pharm Sci. 2004 Dec;23(4-5):363-9.

Dhuley JN, Raman PH, Mujumdar AM and Naik SR. Inhibition of lipid peroxidation by piperine during experimental inflammation in rats. Indian J Exp Biol. 1993 May;31(5):443-5.

disease/2004_report_update/en/index.html)

Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL and Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. Cardiovascular Diabetology. 2006. 5:4 doi: 10.1186/1475-2840-5-4.

Félétou M. and Vanhoutte P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006. 291:985-1002. doi:10.1152/ajpheart.00292.

Gori T, Dragoni S, Stolfo GD and Forconi S. Endothelium and haemorheology. Ann Ist Super Sanità. 2007. Vol. 43, No. 2: 124-129.

Gülçin I. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (Piper nigrum) seeds. Int J Food Sci Nutr. 2005 Nov;56(7):491-9.

Hu Y, Guo DH, Liu P, Rahman K, Wang DX and Wang B. Antioxidant effects of a Rhodobryum roseum extract and its active components in isoproterenol-induced myocardial injury in rats and cardiac myocytes against oxidative stress-triggered damage. Pharmazie. 2009 Jan;64(1):53-7.

Hu Y, Liao HB, Liu P, Guo DH and Wang YY. Antidepressant effects of piperine and its neuroprotective mechanism in rats. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2009. Jul; 7(7):667-70.

Inchan A., Promma P, Chintana P and Chootip K. Cardiovascular action of Piper longum. Planta Med.. 2008. 74: 9, P:942.

Inchan, A. and Chootip, K. Vascular action and mechanism of action of black pepper (Piper nigrum L). Proceedings of Naresuan Research Conference 2006. p7-13.

Iwashita M., Oka N., Ohkubo S., Saito M. and Nakahata N. Piperlongumine, a constituent of Piper longum L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A2 receptor antagonist. Eur. J. Pharmacol. 2007a. 570, 38–42.

Iwashita M., Saito M., Yamaguchi Y., Takagaki R. and Nakahata N. Inhibitory effect of ethanol extract of Piper longum L. on rabbit platelet aggregation through antagonizing thromboxane A2 receptor. 2007b. Biol. Pharm. Bull. 30 (7), 1221-1225.

Jin Z, Borjihan G, Zhao R, Sun Z, Hammond GB and Uryu T. Antihyperlipidemic compounds from the fruit of Piper longum L. Phytother Res. 2009 Aug;23(8):1194-6.

Kapoor IP, Singh B, Singh G, De Heluani CS, De Lampasona MP and Catalan CA. Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (Piper nigrum). J Agric Food Chem. 2009 Jun 24;57(12):5358-64.

Khajuria A, Thusu N, Zutshi U and Bedi KL. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. Mol Cell Biochem. 1998 Dec;189(1-2):113-8.

Khazaei M, Moien-afshari F and Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. Pathophysiology. 2008. 15: 49–67.

Koul I.B. and Kapil A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. Planta. Med. 1993. 59, 413-417.

Krishnakumar N, Manoharan S, Palaniappan PR, Venkatachalam P and Manohar MG. Chemopreventive efficacy of piperine in 7, 12-dimethyl benz [a] anthracene (DMBA) - induced hamster buccal pouch carcinogenesis: An FT-IR study. Food Chem Toxicol. 2009. doi:10.1016/j.fct.2009.08.017

Kumar S, Arya P, Mukherjee C, Singh BK, Singh N, Parmar VS, Prasad AK and Ghosh B. Novel aromatic ester from Piper longum and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells. Biochemistry. 2005 Dec 6;44(48):15944-52.

Kumar S, Singhal V, Roshan R, Sharma A, Rembhotkar GW and Ghosh B. Piperine inhibits TNF-alpha induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF-kappaB and IkappaB kinase activation. Eur J Pharmacol. 2007 Dec 1;575(1-3):177-86.

Lapointe, A., Couillard, C. and Lemieux, S. (2006) Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J Nutr Biochem*, 17, 645-658.

Lee S.W., Rho M.C., Nam J.Y., Lim E.H., Kwon O.E., Kim Y.H., Lee H.S. and Kim Y.K. Guineensine, an Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, from the fruits of Piper longum. Planta Med. 2004. 70, 678-679.

Lee SA, Hong SS, Han XH, Hwang JS, Oh GJ, Lee KS, Lee MK, Hwang BY and Ro JS. Piperine from the fruits of Piper longum with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2005 Jul;53(7):832-5.

Li S, Wang C, Li W, Koike K, Nikaido T and Wang MW. Antidepressant-like effects of piperine and its derivative, antiepilepsirine. J Asian Nat Prod Res. 2007 Apr-Aug;9(3-5):421-30.

Manoharan S, Balakrishnan S, Menon VP, Alias LM and Reena AR. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Singapore Med J. 2009 Feb;50(2):139-46.

Matsuda, D., Ohte, S., Ohshiro, T., Jiang, W., Rudel, L., Hong, B., Si, S. and Tomoda, H. (2008) Molecular target of piperine in the inhibition of lipid droplet accumulation in macrophages. *Biol Pharm Bull,* 31, 1063-1066.

Matsuura, E., Hughes, G. R. and Khamashta, M. A. (2008) Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev,* 7, 558-566.

Mittal Rand Gupta RL. In vitro antioxidant activity of piperine. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2000 Jun;22(5):271-4.

Mittal, R. and Gupta, R. L. (2000) In vitro antioxidant activity of piperine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol,* 22, 271-274.

Mujumdar AM, Dhuley JN, Deshmukh VK, Raman PH and Naik SR. Anti-inflammatory activity of piperine. Jpn J Med Sci Biol. 1990 Jun;43(3):95-100.

Naidu KA and Thippeswamy NB. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. Mol Cell Biochem. 2002 Jan;229(1-2):19-23.

Naidu, K. A. and Thippeswamy, N. B. (2002) Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. *Mol Cell Biochem,* 229, 19-23.

Naseri MK and Yahyavi H. Pak J Biol Sci. Antispasmodic effect of Piper nigrum fruit hot water extract on rat ileum. 2008 Jun 1;11(11):1492-6.

Ononiwu IM, Ibeneme CE and Ebong OO. Effects of piperine on gastric acid secretion in albino rats. Afr J Med Med Sci. 2002 Dec;31(4):293-5.

Panda S and Kar A. Piperine lowers the serum concentrations of thyroid hormones, glucose and hepatic 5'D activity in adult male mice. Horm Metab Res. 2003 Sep;35(9):523-6.

Park BS, Son DJ, Park YH, Kim TW and Lee SE. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of Piper longum L. Phytomed. 2007. 4: 853–855.

Pradeep CR and Kuttan G. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. Int Immunopharmacol. 2004 Dec 20;4(14):1795-803.

Raghavendra RH and Naidu KA. Spice active principles as the inhibitors of human platelet aggregation and thromboxane biosynthesis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009 Jul;81(1):73-8.

Rho, M. C., Lee, S. W., Park, H. R., Choi, J. H., Kang, J. Y., Kim, K., Lee, H. S. and Kim, Y. K. (2007) ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of Piper nigrum. *Phytochemistry,* 68, 899-903.

Singh TU, Kumar D, Tandan SK and Mishra SK. Inhibitory effect of essential oils of Allium sativum and Piper longum on spontaneous muscular activity of liver fluke, Fasciola gigantica. Exp Parasitol. 2009. Aug 11. [Epub ahead of print]

Sunila ES and Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. J Ethnopharmacol. 2004 Feb;90(2-3):339-46.

Taqvi SI, Shah AJ and Gilani AH. Blood pressure lowering and vasomodulator effects of piperine. J Cardiovasc Pharmacol. 2008 Nov;52(5):452-8.

Thomas M, Sujatha KS and George S. Protective effect of Piper longum Linn. on monosodium glutamate induced oxidative stress in rats. Indian J Exp Biol. 2009 Mar;47(3):186-92.

Unnikrishnan MC and Kuttan R, Tumor reduceing and anticarcinogenic activity of selected spices. Cancer Lett. 1990. 51; 85-89

Vijayakumar RS and Nalini N. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from Piper nigrum on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats. Cell Biochem Funct. 2006a. 24(6):491-8.

Vijayakumar RS and Nalini N. Piperine, an active principle from Piper nigrum, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2006b. 17(2):71-86.

Vijayakumar RS, Surya D and Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. Redox Rep. 2004;9(2):105-10.

Vijayakumar, R. S., Surya, D. and Nalini, N. (2004) Antioxidant efficacy of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep,* 9, 105-110.

Wattanathorn J, Chonpathompikunlert P, Muchimapura S, Priprem A and Tankamnerdthai O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. Food Chem Toxicol. 2008. Sep;46(9):3106-10.

Witztum, J. L. and Steinberg, D. (2001) The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med,* 11, 93-102.

Woo HM, Kang JH, Kawada T, Yoo H, Sung MK and Yu R. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. Life Sci. 2007 Feb 13;80(10):926-31.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. สร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับฤทธิ์ของ piperine ในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด
2. นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ Poster presentation ในที่ประชุมสรีรสมาคมแห่งประเทศไทย 2-4 พฤษภาคม 2555
3. ตีพิมพ์ผลงานระดับชาติ

ภาคผนวก

Manuscript (Accepted and published in Journal of Physiological and Biomedical Sciences)

Piperine Is Antihyperlipidemic And Improves Endothelial-dependent Vasorelaxation In Rats On A High Cholesterol Diet

Putcharawipa Maneesai[1], C. Norman Scholfield[2], Krongkarn Chootip[1*].
[1]Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
[2]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Phitsanulok 65000, Thailand
E-mail: krongkarnc@nu.ac.th (Dr. Krongkarn Chootip)
Key words: piperine, cholesterol, lipid, vasodilatation

Introduction. Piperine is a major ingredient of black pepper and long pepper, which are widely used as a spice and in Ayurvedic medicine. As an anti-hyperlipidemic, some reports show clear blood lipid reductions whilst others failed to show any effect. Therefore, we aimed to resolve this discrepancy and to show whether piperine could improve vascular endothelial function in cholesterol fed rats.
Methods. Male Sprague-Dawley rats (180-250g) were made hypercholesterolemic by daily intragastric gavage of emulsified cholesterol for 8 weeks and piperine was given 8 hr after cholesterol as appropriate to prevent digestive/absorptive interactions. Animals were divided into 4 groups: (i) sham (control), (ii) cholesterol (HC) (iii) the cholesterol plus 40mg/kg piperine (Pip40), and (iv) cholesterol plus 80mg/kg piperine (Pip80). Serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and high density lipoprotein (HDL) were measured at week0 and week8. At week8, rats were killed and endothelium-dependent vasorelaxation induced by acetylcholine in isolated aortic rings.
Results. Throughout the 8 week trial, treatment with piperine (40, 80mg/kg) reduced body weight gain and food intake per day compared with control. The HC group exhibited elevation of both TC and TG. Piperine at 80mg/kg but not low dose (40mg/kg) partially reduced TC, while both doses effectively normalised the elevated TG. HDL was decreased in all animals including controls. Hypercholesterolemic and hypertriglyceridemic rats showed significant reduction of acetylcholine-induced vasorelaxation of isolated aortae and this was prevented by treatment with piperine.
Conclusion. This study showed that piperine reduced body weight gain, lowered TC and fully normalised TG and endothelial-mediated vasorelaxation of aorta. Thus piperine could provide beneficial effects in weight control, antihyperlipidemia and counteracted the poor vascular endothelial function in hyperlipidemia.
Supported by National Research Council of Thailand.

Introduction

Black pepper (*Piper nigrum*) and long pepper (*Piper longum*) have been widely used as spices and in Ayurvedic medicine mainly for its actions on the gastrointestinal tract. Their major active constituent, piperine, possesses various pharmacological actions including antioxidant (1, 2, 3), anti-inflammatory (4, 5), and anti-hypertensive (6) effects. Previous studies also showed it to reduce obesity and hyperlipidemia (7, 8, 9, 10), major risk factors for cardiovascular disease which has become global health problem. However, the findings for rodents are controversial: some studies reported that supplementing piperine with high fat diet reduced body weight, total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) (8, 10). In contrast, others demonstrated that a high carbohydrate, high fat diet with piperine produced no effect on both plasma TC and TG (9). These discrepancies are likely to be due to differences in experimental protocol including method of administration.

A consistent pathology resulting from hypercholesterolemia is endothelial dysfunction (11). Thus, we hypothesize that if piperine could normalise blood cholesterol, endothelial function would benefit. The present study was designed to demonstrate a hypolipidemic effect of piperine given as daily bolus doses separate from cholesterol. Such a protocol reduces the confounding influences that piperine might have on the utilisation of the normal diet. After 8 weeks on the diet, the endothelial-dependent vasorelaxant responses were characterised.

Methods

Animals

Male Sprague-Dawley rats (180-250g) were obtained from the National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Salaya, Nakhorn Pathom, Thailand and maintained under standard conditions: 25±2°C, 12 hours light-dark cycle and received tap water and commercial rat diet *ad libitum*. Experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.

Experimental design

To induce hypercholesterolemia, a freshly prepared cholesterol emulsion (12) was which comprised cholesterol 1500mg (Carlo Erba Reactifs, Italy), bile extract 750mg (Sigma Chemicals, MO, USA), coconut oil 750mg (PN Natural Products, Thailand) and distilled water 3ml. The given dose of cholesterol in each animal was 1500mg/kg/ administered every morning for 8 weeks to each animal, except controls, as single intragastric feedings. Piperine (Sigma Chemicals) was also given by gavage 8 hr after the cholesterol to prevent piperine interfering with absorption.

Animals were divided into 4 groups: (i) sham (control, n=6), (ii) cholesterol (HC, n=8) (iii) cholesterol plus 40mg/kg piperine (Pip40, n=8), and (iv) cholesterol plus 80mg/kg piperine (Pip80, n=6). Piperine at 40mg/kg was previously shown to have an antihyperlipidemic effect (7), thus 40 and 80mg/kg were chosen in this study in order to evaluate its dose dependency. Body weight and food consumption were recorded daily, while the lipid profile was measured at week0 and week8. At week8, rats were anesthetized (Nembutal 20mg/kg, ip injection) and killed by exsanguination.

Lipid profile measurement

The rats were fasted overnight and then ~0.5ml of blood collected from the tail vein (12). Serum samples were centrifuged (7000g, 10min). Serum lipid levels of TC, HDL and TG were determined using a commercial kit (HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica GmbH, Germany).

Vasorelaxant activity

Immediately after, the rats were euthanised, the thoracic aorta was rapidly removed and cleaned of surrounding loose connective tissue and cut into rings 2-5 mm in length for tension measurements. The rings were mounted on a pair of wires in organ baths containing aerated 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 bubbled with air. The vessel segments were allowed to stabilise for 1 hr at a resting tension of 1 g during which time the solution was refreshed every 15 min. Following stabilisation, acetylcholine (Ach, 0.01-10μM) induced endothelial mediated-relaxations were evaluated in phenylephrine (10μM) pre-contracted arterial rings. Changes in isometric tension were measured using a force transducer (CB Sciences Inc., Milford, USA) connected to a MacLab A/D converter (Chart V5), stored and displayed on a personal computer.

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) of *n* animals. Statistical significance was assessed using paired or un-paired Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, as appropriate. In all comparisons, *p* values less than 0.05 were accepted as significant.

Results

Effect of piperine on body weight and food intake

Control animals progressively gained weight from 243.3±7.6 to 444.8±10.9g (mean±SDs, n=6) throughout the 8 week trial, but all the treated rats showed a lower weight gain compared to controls (p<0.01 for HC (n=8), <0.001 for HC+Pip40 (n=8) and <0.01 for HC+Pip80 (n=6), Figure 1A). For group HC+Pip80 the weight reduction was more pronounced than the HC and HC+Pip40 groups (p<0.05, Figure 1A). The food intake per day reduced in all treatment groups compared to control (Figure 1B). Piperine at 40mg/kg appeared to cause greater effect than other treatments.

Piperine improved the lipid profile

Oral administration of cholesterol produced a clear increase of both serum TC (from 89.6±3.4 (week0) to 148.3±8.8 (week8) mg/dL, p<0.001) and TG (from 76.2±5.7 (week0) to 124.9±11.1 (week8) mg/dL, p<0.01, Table 1). Serum TC was increased (68%) but with piperine at 80mg/kg, this effect was smaller (to 45%), while 40mg/kg was apparently ineffective. For triglycerides, both low (40mg/kg) and high doses (80mg/kg) of piperine normalised the elevated serum TG (Table 1). HDL was consistently decreased across all groups of animal studied (Table 1).

Piperine improved vasorelaxation

Rats given cholesterol showed a reduced Ach-relaxations of isolated aorta (p<0.01 compared to controls, Figure 2). Thus the % maximum relaxation was decreased from 100% to 84.7±3.2% (HC) of controls but the ID_{50} was unaffected. Piperine at both low (40mg/kg) and high (80mg/kg) doses normalized the vasorelaxation of the aorta (p<0.05 compared to HC, Figure 2).

Discussion

The present study showed that dosing with piperine for 8 weeks following a cholesterol gavage slowed the gain in body weight, partially reduced serum TC and completely restored serum TG. Similar findings have been reported by previous studies using hyperlipidemic rat model by Shah et al (10) who demonstrated that piperine reduced body weight, TC, TG, and fat mass, but not food intake in obesity-induced dyslipidemia in high-fat diet rats. This accords with the reduced adipose tissue mass with dietary piperine in rats (10). In contrast, rats consuming piperine in the food showed increased food consumption (9). Thus the difference might arise from gustatory drive.

Piperine may modulate cholesterol absorption (13). However, in the present study the cholesterol was administered 8 hr before the piperine by which time the cholesterol will have been absorbed. Thus, piperine is likely to be acting beyond the absorptive phase. Because of its structural similarity with a melanocortin (MC)-4 agonist, it was previously suggested that piperine might activate hypothalamic MC-4 receptors thus leading to decreased appetite and increase insulin sensitivity (10). Other possible mechanisms of anti-obesity and lipid lowering effects of piperine might involve (i) the inhibitory action of piperine on cholesteryl ester (CE) synthesis, (ii) lipid and lipoprotein accumulation by modulating lecithin cholesterol transferase, lipoprotein lipase and acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) (9) and (iii) anti-inflammatory actions (4, 5).

In the present study, HDL was decreased across all animal groups. The effects on HDL were ambiguous but there is an increasing realization that statins are also inadequate in high risk CVD patients who require additional therapy to raise HDLs (14). Clearly, piperine would need similar supplementation.

It is well known that hyperlipidemia plays a crucial role in endothelial dysfunction. Several lines of evidence demonstrated the impairment of endothelial-mediated vasorelaxation in dyslipidemic animal models (9, 15, 16), which is in agreement with our findings. In the present study, treatment with piperine successfully restored the vasorelaxant function of aorta, consistent with the previous report (9). Apart from its anti-hyperlipidemia, several other mechanisms of action of piperine could be involved in vascular function improvement including: (i) piperine inhibited macrophage ACAT to decrease CE synthesis leading to a reduction of lipid droplets and foam cell formation, which prevent endothelial dysfunction (3), (ii) piperine possessed antioxidant activity, lowered lipid peroxidation, increased glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity, thus protecting against oxidative damage of endothelial cells (1, 2, 3) and (iii) piperine inhibits expression of cell adhesion molecules and tumor necrosis factor-α induced adhesion of neutrophils to endothelial cells, thus preventing or delaying the inflammatory process (4, 5). Evidently, piperine has multiple actions but at this stage, clinical studies are needed to determine the effect(s) which have some impact on human disease.

Conclusion

We conclude that piperine reduced body weight gain, lowered TC and fully normalised TG, restored endothelial-mediated vasorelaxation of aorta and acts in the post-absorptive stage. Thus piperine could provide beneficial effects in weight control, anti-hyperlipidemia and vascular endothelial function.

References

1. Dhuley JN, Raman PH, Mujumdar AM, Naik SR. Inhibition of lipid peroxidation by piperine during experimental inflammation in rats. Indian J Exp Biol 1993; 31: 443-445.
2. Vijayakumar RS, Nalini N. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from Piper nigrum on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats. Cell Biochem Funct 2006; 24: 491-498.
3. Matsuda D, Ohte S, Ohshiro T, Jiang W, Rudel L, Hong B, Si S, Tomoda H. Molecular target of piperine in the inhibition of lipid droplet accumulation in macrophages. Biol Pharm Bull 2008; 31: 1063-1066.
4. Kumar S, Arya P, Mukherjee C, Singh BK, Singh N, Parmar VS, Prasad AK, Ghosh B. Novel aromatic ester from Piper longum and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells. Biochemistry 2005; 44: 15944-15952.

5. Kumar S, Singhal V, Roshan R, Sharma A, Rembhotkar GW, Ghosh B. Piperine inhibits TNF-α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF-κB and IκB kinase activation. Eur J Pharmacol 2007; 575: 177-186.
6. Taqvi SI, Shah AJ, Gilani AH. Blood pressure lowering and vasomodulator effects of piperine. J Cardiovasc Pharmacol 2008; 52: 452-458.
7. Vijayakumar, RS, Nalini N. Piperine, an active principle from Piper nigrum, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2006; 17: 71-86.
8. Jin Z, Borjihan G, Zhao R, Sun Z, Hammond GB, Uryu T. Antihyperlipidemic compounds from the fruit of Piper longum L. Phytother Res 2009; 23: 1194-1196.
9. Diwan V, Poudyal H, Brown L. Piperine attenuates cardiovascular, liver and metabolic changes in high carbohydrate, high fat-fed rats. Cell Biochem Biophys doi 10.1007/s12013-011-9306-1.
10. Shah SS, Shah GB, Singh SD, Gohil PV, Chauhan K, Shah KA, Chorawala M. Effect of piperine in the regulation of obesity-induced dyslipidemia in high-fat diet rats. Indian J Pharmacol 2011; 43: 296-299.
11. Warnholtz A, Mollnau H, Oelze M, Wendt M, Münzel T. Antioxidants and endothelial dysfunction in hyperlipidemia. Curr Hypertens Rep 2001; 3: 53-60.
12. Limpeanchob N, Trisat K, Duangjai A, Tiyaboonchai W, Pongcharoen S, Sutheerawattananoda M. Sericin Reduces Serum Cholesterol in Rats and Cholesterol Uptake into Caco-2 Cells. J Agr Food Chem 2010; 58: 12519-12522.
13. Khajuria A, Thusu N, Zutshi U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. Phytomedicine 2002; 9: 224-231.
14. Sharma RK, Singh VN, Reddy HK. Thinking beyond low-density lipoprotein cholesterol: strategies to further reduce cardiovascular risk. Vasc Health Risk Manag 2009; 5: 793-799.
15. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kano H, Asai Y, Kumar TN, Jayachandran M, Sumi D, Iguchi A. Endothelium-dependent relaxation of rabbit atherosclerotic aorta was not restored by control of hyperlipidemia: the possible role of peroxynitrite (ONOO-). Atherosclerosis 1999; 147: 349-363.
16. Ito K M, Okayasu M, Koshimoto C, Shinohara A, Asada Y, Tsuchiya K, Sakamoto T, Ito K. Impairment of endothelium-dependent relaxation of aortas and pulmonary arteries from spontaneously hyperlipidemic mice (Apodemus sylvaticus). Vascul Pharmacol 2007; 47: 166-173.

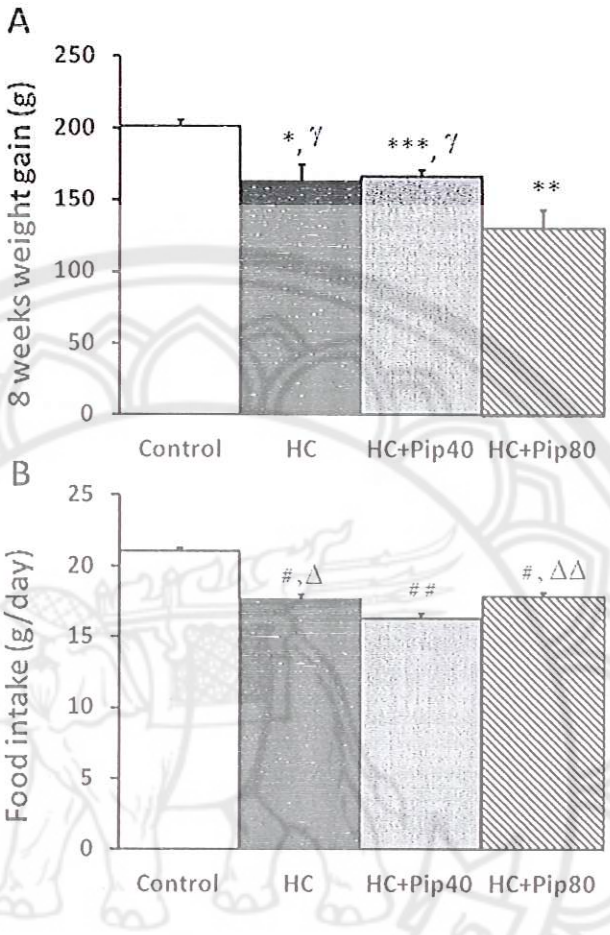


Figure 1

Effect of piperine on (A) weight gain (comparing week0 and week8) and (B) food intake (the averaged daily intake during the 8 week period). Rats were fed daily with water (control), cholesterol (HC) or cholesterol with either 40mg/kg piperine (Pip40), or 80mg/kg piperine (Pip80) as indicated. All points are means±SEMs of all animals from groups as indicated (n=6-8). P-values are indicated as $^{*}p<0.01$, $^{**}p<0.001$, $^{***}p<0.0001$ compared to control; $^{\gamma}p<0.05$ compared to HC+Pip80; $^{\#}p<0.00001$, $^{\#\#}p<0.000001$ compared to control; $^{\Delta}p<0.05$, $^{\Delta\Delta}p<0.01$ compared to HC+Pip40. All data points are mean±SEM (n=6-8).

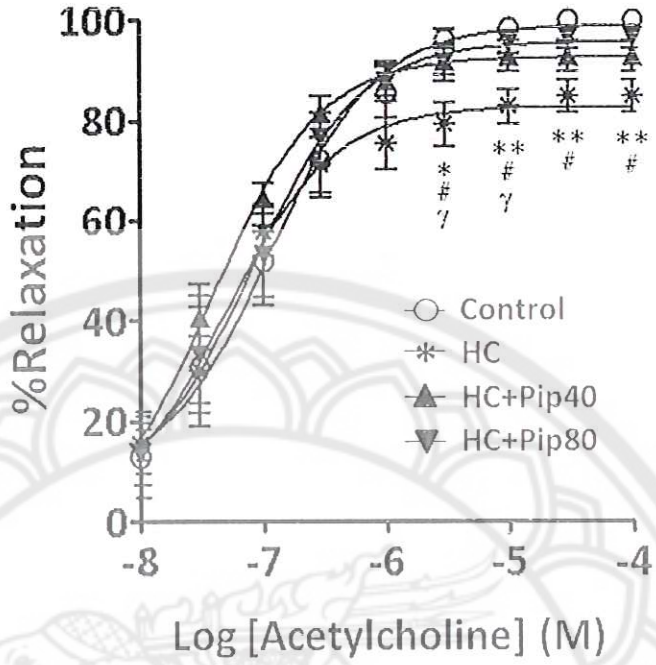


Figure 2

Concentration-response curves for acetylcholine (0.01-10μM) induced-relaxations of isolated aortae removed from the animals immediately after killing at week8. Rats were fed daily with water (control), cholesterol (HC) or cholesterol with either 40mg/kg piperine (Pip40), or 80mg/kg piperine (Pip80) as indicated. The relaxations are expressed as % reduction of tension in vessels pre-contracted with phenylephrine: 100% relaxation = vessel tension before adding phenylephrine (10μM). P-values using ANOVA are indicated $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ (compared to control); $^{\#}p<0.05$ (compared to HC+Pip80); $^{\gamma}p<0.05$ (compared to HC+Pip40). All data points are mean±SEM (n=6-8).

Treatment	Serum lipid (mg/dL)					
	Total cholesterol		Triglycerides		HDL	
	Week 0	Week 8	Week 0	Week 8	Week 0	Week 8
Control	88.6±1.5	$109.4\pm3.7^{*\gamma}$	61.1±6.9	$108.3\pm7.9^{*}$	37.3±0.7	$28.6\pm0.6^{**}$
HC	89.6±3.4	$148.3\pm8.8^{**\#}$	$76.2\pm5.7^{\#}$	$124.9\pm11.1^{*}$	35.1±1.9	$26.9\pm1.1^{*}$
HC+Pip40	88.1±2.4	$160.3\pm11.4^{**\#\#}$	$82.1\pm2.7^{\#\#}$	$82.1\pm13.5^{\gamma}$	37.3±0.8	$23.8\pm1.9^{**}$
HC+Pip80	84.5±2.2	$122.2\pm3.4^{**\Delta}$	73.8±5.2	$77.9\pm8.2^{\gamma\gamma}$	34.7±1.6	$22.3\pm1.9^{**\#}$

Table 1

Effect of piperine on serum concentrations of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and high density lipoprotein (HDL) measured at week 0 and week 8, expressed as mg/dL for all parameters. Rats were fed daily with water (Control), cholesterol (HC) or cholesterol with either 40mg/kg piperine (Pip40), or 80mg/kg piperine (Pip80) as indicated. P values using pair T-test (for W0 vs W8 of the same group/parameter) or ANOVA (for comparison between the 4 groups) are indicated $^{*}p<0.01$, $^{**}p<0.001$ (compared to week0); $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p< 0.01$ (compared to control); $^{\gamma}p<0.05$, $^{\gamma\gamma}p<0.01$ (compared to HC); $^{\Delta}p<0.01$ (compared to Pip40). All data points are mean±SEM (n=6-8).