



รหัสโครงการ SUT1-111-60-12-10

รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดตั้งเช่าและผักเชียงดาต่อการลดระดับน้ำตาลและระดับไขมัน
ในเลือดหนูถีบจักรและกลไกการออกฤทธิ์

(The effects of *Cordyceps sinensis* and *Gymnema inodorum*
extracts on antihyperglycemia, antihyperlipidemia in mice and
mechanism of action)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รหัสโครงการ SUT1-111-60-12-10

รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดตั้งเช่าและผักเชียงดาต่อการลดระดับน้ำตาลและระดับไขมัน
ในเลือดหนูถีบจักรและกลไกการออกฤทธิ์

(The effects of *Cordyceps sinensis* and *Gymnema inodorum*
extracts on antihyperglycemia, antihyperlipidemia in mice and
mechanism of action)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ภค.ดร.เกรียงศักดิ์ เอี่ยมแก้ว

สาขาวิชาปริคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย

รศ.สพญ.ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์

อาจารย์ ดร.สนอง สุขแสวง

อาจารย์ ดร.เสกสิทธิ์ ชำนาญศิลป์

นางสาวธนาภรณ์ เสงประถม

นางสาวกนกวรรณ เทียมยม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องผลของสารสกัดงั๋งเช่าและผักเชียงดาต่อการลดระดับน้ำตาลและระดับไขมันในเลือด หนูถีบจักรและกลไกการออกฤทธิ์ ในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี ปีงบประมาณ 2560 ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยและคณะ ขอขอบคุณ บริษัท WORLD WIDE HEALTHY CO.,LTD ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดงั๋งเช่างาน งานวิจัยนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมี โดย FTIR สำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ ที่ ช่วยผลิตสัตว์ทดลองในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ คุณวัชรระ วงศ์วิริยะ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและ อนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำวิจัยที่อาคารสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยจนประสบ ผลสำเร็จ

บทคัดย่อภาษาไทย

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากถั่งเช่า (*Cordyceps sinensis*), ผักเชียงดา (*Gymnema inodorum*) เมื่อใช้เดี่ยวๆและผสมกันของสารสกัดจากถั่งเช่าและผักเชียงดาต่อการยับยั้งการสร้างไขมันในเซลล์ (anti-adipogenesis) 3T3-L1 เซลล์ และการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูโมซันที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงด้วยอาหารไขมันสูง การสะสมไขมันภายในเซลล์ 3T3-L1 แอดิโพไซต์ ถูกตรวจสอบโดยการย้อม Oil Red O และการสังเกตสัญญาณวิทยาของหยดไขมัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากถั่งเช่า, สารสกัดผักเชียงดา เมื่อใช้เดี่ยวๆและผสมกันของสารสกัดถั่งเช่าและผักเชียงดา สามารถยับยั้งการสะสมของไขมันในเซลล์ได้ โดยเมื่อใช้ผสมกันสามารถแสดงการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์ทดสอบ นอกจากนี้ได้ใช้เทคนิค FTIR ไมโครสเปกโตรสโคปีเพื่อยืนยันผลการยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1 ของสารสกัดจากถั่งเช่าและผักเชียงดา เมื่อใช้เดี่ยวๆและผสมกัน ผลการทดลองพบว่าสัญญาณความเข้มและพื้นที่ใต้กราฟของไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรต ฟอสโฟไลปิด และสัดส่วนของไขมัน/โปรตีน ของเซลล์ทดสอบที่มีสารสกัดจากถั่งเช่า ผักเชียงดาเดี่ยวๆและสารสกัดผสมน้อยกว่าเซลล์ทดสอบที่ไม่ได้รับสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พีซีเอ สามารถแสดงให้เห็นการแยกสเปกตรัมออกเป็นหกคลัสเตอร์อย่างชัดเจน ตามการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเซลล์ทดสอบ การศึกษาในหนูโมซันไอซียัวร์เพสผู้เจ็ดในแปดกลุ่ม (ไม่รวมถึงกลุ่มควบคุมปกติที่ไม่ได้รับอาหารไขมันสูง) ได้รับ (กิน) อาหารไขมันสูงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในเจ็ดกลุ่ม, หกกลุ่ม (ไม่รวมกลุ่มที่กินเฉพาะอาหารไขมันสูงแต่ไม่ได้รับสารสกัด) ให้กินอาหารไขมันสูงเสริมด้วยสารสกัดจากถั่งเช่า (150 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักตัว) ต่อวัน), สารสกัดจากผักเชียงดา (150 หรือ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักตัว) ต่อวัน) หรือสารสกัดผสมจากถั่งเช่า (75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักตัว) ต่อวัน) กับ จากผักเชียงดา (75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักตัว) ต่อวัน) หรือ ไกลเบนคลาไมด์ หรือ ซิมวาสแตติน (10 หรือ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักตัว) ต่อวันตามลำดับ) จากนั้นระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด เอแอลที เอแอลพี ตรีเอทีนิน และการตรวจสอบความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (ซีบีซี) ถูกนำมาวิเคราะห์ พบว่าตัวบ่งชี้ น้ำตาลและไขมันในเลือด (คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ แอลดีแอล-คอเลสเตอรอล) ของสารสกัดจากถั่งเช่า สารสกัดจากผักเชียงดา เมื่อใช้เดี่ยวๆ และสารสกัดผสม มีผลทำให้ตัวบ่งชี้ น้ำตาลและไขมัน

ในเลือดทุกกลุ่มดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า สารสกัดจากถั่งเช่าผสมกับสารสกัดจากผักเชียงดา สามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการลดน้ำตาลในเลือดและคอเลสเตอรอล แอลดีแอล-คอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในหนูไม่ซ้ สารสกัดจากพืชเหล่านี้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อตับ ไต และซีบีซีต่อหนูไม่ซ้ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากถั่งเช่า สารสกัดผักเชียงดา เมื่อใช้เดี่ยวๆ และสารสกัดผสมมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพหรือยาสมุนไพรที่จะใช้ในการบำบัดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและไขมันในเลือดสูงหรือโรคอ้วน



บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The present study aimed to investigate the anti-adipogenesis and anti-hyperlipidemic effects of *Cordyceps sinensis* extract (CSE), *Gymnema inodorum* extract (GIE) alone and their combination on adipogenesis in 3T3-L1 cells and high-fat-diet-induced hyperlipidemia in mice. Intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes was determined by Oil Red O staining and observed the morphology of lipid droplets. The results demonstrated that CSE, GIE, alone and combined suppressed lipid accumulation. Moreover, this combination showed a synergistic effect on lipid accumulation inhibition in tested cells. FTIR microspectroscopy confirmed the inhibitory effects of CSE, GIE alone and in combination on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. The signal intensity and the integrated areas of glycogen and carbohydrate, the acyl chain of phospholipids and lipid/protein ratio of CSE, GIE, and CSE/GIE combination-treated 3T3-L1 adipocytes were significantly less than the untreated 3T3-L1 adipocytes ($p < 0.05$). PCA analysis showed six distinct clusters for the FTIR spectra of 3T3-L1 sample cells based on biomolecular changes. Seven of eight groups of ICR male mice (i.e., not including the normal group) were fed with a high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Of these seven groups, six (i.e., not including the HFD group) were administered a HFD supplemented with CSE (150 and 300 mg/kg BW/day), GIE (150 and 300 mg/kg BW/day), combination of CSE 75 mg/kg BW/day plus GIE 75 mg/kg BW/day, or glibenclamide or simvastatin (10 or 20 mg/kg BW/day, respectively). Blood sugar, serum lipid profiles, ALT, ALP, creatinine, and the complete blood count (CBC) were analyzed. The blood sugar and lipid profiles (cholesterol, triglyceride, and LDL-cholesterol) of all CSE, GIE, and CSE/GIE combination treated groups were significantly lower than those of untreated-HFD groups ($p < 0.05$). Moreover, this combination exhibited synergistic activity on blood sugar, cholesterol, LDL-cholesterol, and triglyceride reduction in mice. These plant extracts revealed non-toxic in liver, kidney, and CBC on mice. These results suggest that CSE, GIE alone and in combination have potential to develop to health supplement food or herbal medicine for the treatment of hyperglycemia, hyperlipidemia or obesity.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง
สารบัญ.....จ
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....1
วัตถุประสงค์ของ โครงการวิจัย.....3
สมมติฐานการวิจัย.....3
ขอบเขตการวิจัย.....3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....5
2.1 ผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดและการฟื้นฟูของบีตาเซลล์ ของ <i>Cordyceps</i> spp. และ <i>Gymnema</i> spp.....5
2.2 3T3-L1 cell lines.....9
2.3 ประสิทธิภาพการลดไขมันในเลือดของ <i>Cordyceps</i> spp. และ <i>Gymnema</i> spp.....10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1 วัสดุ.....	14
3.1.1 วัสดุคิบพีช และเชื้อรา และสารเคมี.....	14
3.2 วิธีการทดลอง.....	14
3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากพีช.....	14
3.2.1.1 การตรวจสอบทางพิษวิทยาเคมีเชิงคุณภาพเบื้องต้น.....	14
3.2.1.2 การตรวจสอบเชิงกึ่งปริมาณของสารประกอบทางเคมี.....	16
3.2.2 Cell culture.....	16
3.2.2.1 การเหนี่ยวนำการสร้างเซลล์ไขมันของ 3T3-L1 เซลล์.....	17
3.2.2.2 การทดสอบความคงอยู่ของเซลล์.....	17
3.2.2.3 การย้อม Oil Red O.....	18
3.2.2.4 Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR)	18
3.2.3 สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย, ขนาดตัวอย่าง, อาหาร, และการออกแบบ	
การทดลอง.....	20
3.2.3.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	20
3.2.3.2 ผลของ <i>C. sinensis</i> extract และ <i>G. inodorum</i> extract ต่อ	
การทดสอบความทนทานต่อน้ำตาลในหนูไมซ์	20
3.2.3.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง.....	20
3.2.3.2.2 การทดสอบความทนทานต่อน้ำตาล (OGTT).....	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3.2.3 การศึกษาการยับยั้งภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือด สูง ..21	..21
3.2.3.3 การวัดน้ำหนักตัว, การกินอาหาร และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์..... ..22	..22
3.2.3.4 โลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมีในเลือด..... ..23	..23
3.2.3.5 การทดสอบความเป็นพิษของอวัยวะสำคัญที่เกี่ยวข้อง..... ..23	..23
3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ..... ..23	..23
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... ..25	..25
4.1 การทดลองในหลอดทดลอง..... ..25	..25
4.1.1 การวิเคราะห์พฤษเคมีเบื้องต้น..... ..25	..25
4.1.2 การวัดการอยู่รอดของเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte..... ..26	..26
4.1.3 ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ต่อการ สะสมไขมัน ระหว่างกระบวนการสร้างไขมันใน 3T3-L1 cells..... ..27	..27
4.1.4 FTIR microspectroscopy..... ..29	..29
4.2 การศึกษาในสัตว์ทดลอง..... ..37	..37
4.2.1 การทดสอบความทนต่อน้ำตาล Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)..... ..37	..37
4.2.2 ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ต่อระดับ น้ำตาลและโปรไฟล์ของไขมันในเลือด..... ..38	..38
4.2.3 ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ต่อการ บริโภคอาหาร น้ำหนักตัว และน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้อง45	..45
4.2.4 พารามิเตอร์ทางชีวเคมีในซีรัม..... ..48	..48
4.2.5 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไขมัน ดับ และไต..... ..54	..54
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง..... ..66	..66

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	66
5.1.1 การศึกษาในหลอดทดลองของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ต่อกระบวนการadipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1.....	67
5.1.2 การศึกษาในสัตว์ทดลองของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ต่อการยับยั้งภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูงใน หนูไมซ์.....	68
5.2 สรุปผลการทดลอง.....	72
บรรณานุกรม.....	74
ภาคผนวก.....	84
Output ที่ได้จากโครงการวิจัย.....	87
ประวัติผู้วิจัย.....	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	การวิเคราะห์พหุขเคมีเบื้องต้นของสารสกัด <i>C. sinensis</i> และ <i>G. inodorum</i>	25
4.2	การกำหนดแถบความยาวคลื่นของ FTIR	34
4.3	น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์.....	48



สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	แผนภาพแบบแผนกระบวนการพัฒนาการของ adipocyte9
2.2	การเปลี่ยนแปลงของ 3T3-L1 preadipocytes.....10
2.3	แบบสมมุติฐานในการออกฤทธิ์ต่อ adipogenesis โดย cordycepin12
3.1	แผนภาพแสดงการออกแบบการทดลองความทนทานต่อน้ำตาล (OGTT)21
3.2	แผนภาพแสดงการออกแบบการทดลองการยับยั้งภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูง.....22
4.1	ความอยู่รอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอมบริโอจากหนูเมาส์ 3T3-L1 ในหลอดทดลอง.....26
4.2	ไขมันภายในเซลล์หลังจากการย้อมด้วย Oil Red O และ haematoxylin ของ 6 กลุ่มตัวอย่าง.....28
4.3	กราฟแสดงถึงผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อการสะสมไขมัน ภายในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes (%).....29
4.4	ค่าเฉลี่ยของ FTIR spectra.....32
4.5	เฉลี่ยสเปกตรัมอนุพันธ์ทุติยภูมิ.....33
4.6	(a) กราฟแท่งของพื้นที่รวมของกรดนิวคลีอิก ไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ และ (b) อัตราส่วนพื้นที่รวม CH ₂ /CH ₃ asymmetric stretching และ CH ₂ asymmetric stretching/amide I ของ 3T3-L1 preadipocytes, 3T3- L1 adipocytes, และ 3T3-L1 adipocytes หลังได้รับ simvastatin, CSE (10), GIE (500) เดี่ยวๆ หรือผสมกันของ CSE (10) กับ GIE (500) ที่วันที่ 10 หลังจากการเจริญของเซลล์.....35

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7	การวิเคราะห์ PCA ของ FTIR สเปกตรัม.....37
4.8	การประเมินความต้านทานต่อกลูโคส.....38
4.9	ผลของ CES, GIE เดี่ยวๆ และผสม ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูไมซ์.....40
4.10	ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับคอเลสเตอรอลในเลือด.....41
4.11	ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด.....42
4.12	ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับ LDL-cholesterol ในเลือด.....43
4.13	ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับ HDL-cholesterol ในเลือด.....44
4.14	ปริมาณอาหารและน้ำหนักตัว.....46
4.15	ภาพของอวัยวะภายในที่เกี่ยวข้องของหนู.....47
4.16	ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ creatinine ในซีรัม.....49
4.17	ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ ALT ในซีรัม.....50
4.18	ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ ALP ในซีรัม.....51
4.19	ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ WBC count.....52
4.20	ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ RBC count.....53

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.21	ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับเกล็ดเลือด.....54
4.22	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) non-HFD (หนูที่กินอาหารปกติ)55
4.23	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) HFD และได้รับ simvastatin56
4.24	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) HFD และได้รับ CSE57
4.25	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) HFD และได้รับ GIE58
4.26	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) non-HFD..... 59
4.27	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) HFD และได้รับ simvastatin.....60
4.28	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) HFD และได้รับ CSE.....61
4.29	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) HFD และได้รับ GIE.....62
4.30	ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อ epididymal adipose หนูทดลอง ภายหลังการได้รับ CSE.....63
4.31	กราฟแสดงผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และสารผสมของ CSE กับ GIE ต่อจำนวนของ adipocytes.....64
4.32	กราฟแสดงผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และสารผสมของ CSE กับ GIE ต่อค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ adipocytes.....65

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ความชุกของโรคอ้วนมีอัตราเพิ่มขึ้นในประเทศพัฒนาแล้ว และประเทศกำลังพัฒนาทั่วโลก องค์การอนามัยโลกของโรคอ้วน (Global burden of obesity) รายงานว่าใน พ.ศ. 2548 มีคนอ้วนมากถึง 396 ล้านคน และในปี พ.ศ. 2573 คาดการณ์ว่าจำนวนคนในวัยผู้ใหญ่ที่เป็นโรคอ้วนเพิ่มเป็น 573 ล้านคน (Kelly et al., 2008) ในขณะที่ในประเทศที่พัฒนาแล้ว โรคอ้วนจะมีความชุกมาก แต่โรคอ้วนก็แพร่กระจายขึ้นอย่างรวดเร็ว ในประเทศที่มีรายได้ปานกลางและต่ำ เช่น ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขถือเป็นหน่วยงานหลักที่รับผิดชอบในการส่งเสริมสนับสนุนควบคุมและประสานงานกิจกรรมด้านสุขภาพทั้งหมดเพื่อความเป็นอยู่ที่ดีของคนไทย ในช่วงระยะเวลา 23 ปีนับตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 4 ศูนย์มาตรฐานสุขภาพแห่งชาติเปิดเผยว่าที่ผ่านมาความชุกของโรคอ้วนในประเทศไทยเพิ่มขึ้นมากกว่า 2.5 เท่า ความชุกของโรคอ้วนดูเหมือนจะโตขึ้นในอัตราเดียวกับ GDP ของประชากรไทยต่อหัว ในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ประเมินผลกระทบด้านสุขภาพของโรคอ้วนในกลุ่มคนไทยในแง่ของส่วนของโรคอ้วนที่สะท้อนถึงสัดส่วนของอุบัติการณ์ของโรคในคนไทยที่เกิดจากโรคอ้วน นอกจากนี้โรคอ้วนมีส่วนทำให้เกิดโรคเบาหวาน 25% และ 52% ในเพศชายและเพศหญิงตามลำดับ (Teerawattananon and Luz, 2017) โรคอ้วนหมายถึงการสะสมไขมันที่มากเกินไปซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่รุนแรง เนื่องจากมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวานประเภท 2 ความดันโลหิตสูง และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Hu et al., 2014) ในบรรดาปัจจัยเสี่ยงหลายประการนี้ระดับไขมันในเลือดสูงขึ้นถือเป็นเรื่องที่น่าเป็นห่วงและเป็นที่แพร่หลายมาก อาการที่พบบ่อยของภาวะไขมันในเลือดสูง ได้แก่ ระดับคอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol), ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) และคอเลสเตอรอลที่มีความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein cholesterol; LDL-C) ทั้งไขมันทั้งสามชนิดเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการเป็นโรคหัวใจ อาทิเช่น โรคหลอดเลือดแดง และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Chronic heart disease; CHD) แม้ว่าการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย รวมถึงการแนะนำอย่างสม่ำเสมอสามารถป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูงแต่บุคคลที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูงกลับสูงขึ้น ซึ่งอาจจะจำเป็นต้องการรักษาที่มีประสิทธิภาพในการลดระดับไขมันเพื่อให้ระดับไขมันในเลือดลดลง (Guo et al., 2010) ข้อความนี้อ้างอิงจากการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลดัชนีมวลกาย (BMI, kg/m^2) ตั้งแต่เริ่มมาอุบัติการณ์โรคอ้วนได้เกิดขึ้นอีกในอัตราที่น่าตกใจและกลายเป็นความกังวลด้านสาธารณสุขที่

สำคัญที่มีค่าครองชีพที่ไม่สามารถคำนวณได้ แม้ว่าการเกิด DM จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องการรักษาที่มีประสิทธิภาพยังคงไม่สามารถควบคุมให้ได้ผลสมบูรณ์ เมื่อพิจารณาความหลากหลายของโรคเบาหวานและข้อจำกัดของเภสัชภัณฑ์สมัยใหม่ เช่น ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำที่มีการควบคุมไม่เพียงพอ ผลข้างเคียง และอัตราความล้มเหลวในการรักษาเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการกำหนดแนวทางยาใหม่สำหรับการป้องกันและรักษาโรคเมแทบอลิซึมที่มีประสิทธิภาพ (Hu et al., 2014) นอกจากนี้ยังมียารักษาโรคอ้วนจำนวนมากที่มีอยู่ในท้องตลาด หนึ่งในนั้นคือ statin (เช่น atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin) ซึ่งยับยั้ง HMG-CoA reductase ในการลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลและควบคุม receptor lipoprotein ความหนาแน่นต่ำ (LDL) ในเซลล์ตับและลดไตรกลีเซอไรด์ และยาอื่น ๆ คือ fibrates (เช่น fenofibrate, gemfibrozil) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา receptor alpha (PPAR- α) ที่รับ peroxisome proliferator ช่วยลดการหลั่งของ lipoproteins ความหนาแน่นต่ำ (VLDL) เพิ่ม lipoprotein lipase และเพิ่ม lipoproteins ความหนาแน่นสูง (HDL) อย่างไรก็ตามทั้งสองกลุ่มมีผลข้างเคียง ได้แก่ โรคกล้ามเนื้อ, ความผิดปกติของตับ ฯลฯ

ปัจจุบันนี้เนื่องจากข้อเสียของยาแผนปัจจุบันกับค่าใช้จ่ายสูงและผลข้างเคียงที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิต ศักยภาพของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในการรักษาโรคอ้วนจึงได้รับความสนใจ มีการสำรวจและนี่อาจเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการพัฒนาชาติที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคอ้วนในอนาคต (Barrett, 2011; Katzung, 2011; Mayer et al., 2009) พืชสมุนไพรที่ระบุจากพืชสมุนไพรแบบดั้งเดิมเป็นโอกาสอันน่าตื่นเต้นสำหรับการพัฒนาการรักษาใหม่สำหรับโรคอ้วนและโรคเมแทบอลิซึมอื่น ๆ (de Freitas Junior and de Almeida Jr, 2017) สารพฤกษเคมีมักเกิดขึ้นจากการรวมกัน ซึ่งการรวมกันของสารพฤกษเคมีอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพได้อย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดจากอาหารและยาแผนโบราณจาก *Cordyceps sinensis* และ *Gymnema inodorum* ในเอเชียที่ได้รับความสนใจอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา (Guo et al., 2010; Liao et al., 2013; Mall et al., 2009; Prabhu and Vijayakumar, 2014; Ramkumar et al., 2008) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าไตรเทอร์ปีนอยด์ใน *G. inodorum* มีผลทำให้ยับยั้งการดูดซึมกลูโคสจากลำไส้โดยอาศัย CH_2OH (Shimizu et al., 2001) นอกจากนี้การศึกษาล่าสุดยังได้ศึกษาถึงผลกระทบที่อาจเกิดจากการลดน้ำตาลและการเป็นสารบำรุงร่างกายของสารสกัดจาก *C. sinensis* โดยช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของบีตาเซลล์ การเพิ่มกิจกรรมของ NKA ของไตและการสะสมของคอลลาเจนที่ลดลงและการสะสมเมทแอนแทนนิซิมเมทริกซ์แสดงให้เห็นว่า *C. sinensis* อาจมีศักยภาพในการดำรงความสามารถในการทำงานของบีตาเซลล์ (Kan et al., 2012) นอกจากนี้การค้นพบก่อนหน้านี้พบว่า cordycepin จาก *C. militaris* ช่วยป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูงได้โดยการกระตุ้นโปรตีนไคเนสที่กระตุ้นด้วยสาร AMP (AMPK) และสามารถปรับปรุงความไวของอินซูลินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Guo et al.,

2010) การวิจัยการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน แสดงให้เห็นว่า ยาจากพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพเหล่านี้ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่อาจเทียบเท่าในการรักษาใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน โดยมีข้อดีเพิ่มเติมคือมีผลข้างเคียงน้อยหรือไม่มีเลยเมื่อเทียบกับยาสังเคราะห์ (Wagner, 2011)

อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลของการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันของสารสกัดจาก *C. sinensis* (CSE) และสารสกัดจาก *G. inodorum* (GIE) ต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 และการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจาก *C. sinensis* ร่วมกับสารสกัดจาก *G. inodorum* ต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 และการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงดังกล่าว นอกจากนี้จะมีการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดดังกล่าวต่อหนูทดลอง การศึกษานี้อาจทราบแนวทางในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ยาจากสมุนไพรรุ่นใหม่ เพื่อรักษาโรคเบาหวานและภาวะไขมันในเลือดสูง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจสอบผลของสารสกัดจากถั่งเช่า (*Cordyceps sinensis* extract; CSE) และผักเชียงดา (*Gymnema inodorum* extract; GIE) เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ผสมกันต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1

1.2.2 เพื่อตรวจสอบผลของสารสกัดจากถั่งเช่า (CSE) และผักเชียงดา (GIE) เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ผสมกันต่อการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ที่ถูกชักนำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง

1.2.3 สมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดไขมันในเลือดสูงในหนูทดลองดังกล่าว จะถูกนำมาทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในหนูไมซ์ โดยดูพยาธิสภาพของอวัยวะที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนตรวจสอบจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไขมันหน้าท้อง ตับและไต

สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดจาก *Cordyceps sinensis* และ *Gymnema inodorum* สามารถออกฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 และการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ที่ถูกชักนำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง

ขอบเขตการวิจัย

สมุนไพรที่มีประสิทธิภาพสูงจะได้รับการคัดเลือกเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรต่อหนูไมซ์ นอกจากนี้ยังมีการประเมินน้ำหนักแผ่นไขมันในช่องท้องและการตรวจพยาธิสภาพของอวัยวะที่เกี่ยวข้อง ประสิทธิภาพของสมุนไพรแต่ละชนิดที่ออกฤทธิ์ยังการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 ถูกนำมาเปรียบเทียบกับเทคนิค FTIR

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การผลการศึกษาทำให้เราทราบว่า สารสกัด *Cordyceps sinensis* และ *Gymnema inodorum* เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกัน สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างไขมันในเซลล์ 3T3-L1 และยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ที่ถูกชักนำให้มีภาวะไขมันในเลือดสูง โดยไม่พบพิษต่อเซลล์ preadipocyte 3T3-L1 และหนูไมซ์ สมุนไพรทั้งสองชนิดนี้อาจถูกพัฒนาเป็นยาต้านภาวะไขมันในเลือดสูงในอนาคตภายหลังการทำวิจัยเพิ่มเติมในอาสาสมัคร

บทที่ 2

บทบาทนวัตกรรมการ

โรคอ้วนเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญเนื่องจากมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวานชนิดที่สอง ความดันโลหิตสูง และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ นอกจากนี้ โรคเบาหวานเป็นโรคที่อาจทำให้เกิดความอ่อนแอต่อคุณภาพชีวิตและสุขภาพของประชาชนซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากความผิดปกติของเมแทบอลิซึมเรื้อรังที่ร่างกายไม่สามารถดำเนินการกระบวนการเกี่ยวกับกลูโคสได้อย่างถูกต้องสำหรับพลังงานเซลล์ที่เกิดจากความไม่เพียงพอของอินซูลินหรือการต่อต้านอินซูลินของร่างกาย นอกจากนี้ยังเกิดจากการทำลายภูมิคุ้มกันของการผลิตอินซูลินของบีตาเซลล์ในตับอ่อนทำให้เกิดการผลิตอินซูลินที่ลดลงหรือไม่มีการผลิต (Association, 2014) โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคเรื้อรังที่มีภาวะแทรกซ้อน เนื่องจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงหลังสาเหตุการเกิดร่วมกันของการต่อต้านอินซูลินและการหลั่งอินซูลินไม่เพียงพอและการหลั่งของกลูแคนด์มาก (Kadan et al., 2016)

2.1 ผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดและการฟื้นฟูของบีตาเซลล์ ของ *Cordyceps* spp. และ *Gymnema* spp.

Cordyceps militaris เป็นเชื้อราของสกุล *Cordyceps* และเป็นปรสิตของแมลงในระยะตัวอ่อน และจะพัฒนาเป็นโครงสร้างโผล่ขึ้นมาเหนือดินในตัวอ่อนแมลงหรือ pupae (Chou et al., 2014; Sung et al., 2007) *C. militaris* เป็นยาอายุวัฒนะและยาพื้นบ้านมานานแล้วกว่า 300 ปี (Nakamura et al., 2015) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า *C. militaris* มีสารเคมีเป็นส่วนประกอบในพืชหลายอย่างเช่น polysaccharide, nucleoside (cordycepin เป็นหนึ่งใน nucleosides ที่สำคัญทางชีวภาพจาก *Cordyceps* spp.) และสเตียรอยด์ นอกจากนี้ polysaccharide และ cordycepin ที่แยกได้จาก *C. militaris* พบว่ามีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (hypoglycemic) ลดไขมันในเลือด (hypolipidemic) คุณสมบัติต้านมะเร็ง (anticancer) ฤทธิ์ควบคุมการแบ่งตัว (antiproliferative) ทำให้เกิด apoptosis (proapoptotic) และฤทธิ์ลดการอักเสบ (anti-inflammatory) (Ma et al., 2015; Prasain, 2013; Yoon et al., 2015) การศึกษาในสัตว์ทดลอง Ma et al. แสดงให้เห็นว่า cordycepin มีฤทธิ์ป้องกันโรคไตและม้ามในหนูเบาหวาน นอกจากนี้ cordycepin มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญ โดยส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการสังเคราะห์น้ำตาลที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอาจใช้ cordycepin ในการรักษาโรคเบาหวาน (Ma et al., 2015) นอกจากนี้ค่าอินซูลินในซีรัมในหนูเบาหวานที่ชักนำโดยอาหารไขมันสูงเพิ่มขึ้นเกือบ 9 เท่าเมื่อเทียบกับหนูควบคุม โดยผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *C. militaris* อาจเป็นตัวช่วยในการรักษาโรคเบาหวาน

ชนิดที่ 2 โดยผ่านการลดระดับน้ำตาลในเลือด (Yu et al., 2015) *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) เป็นหนึ่งในยาจีนที่รู้จักกันดีที่สุดและเป็นอาหารเพื่อสุขภาพมีมูลค่าสูงที่ใช้ในการรักษาโรคที่ หลากหลาย และมีรายงานว่า *C. sinensis* มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ การค้นพบครั้งก่อนพบว่าทั้ง สารสกัดจากเส้นใยจากเชื้อรา *C. sinensis* มีศักยภาพและฤทธิ์โดยตรงในการต้านอนุมูลอิสระเป็น อย่างมาก (Dong and Yao, 2008) cordycepin จากสารสกัด *C. sinensis* ที่สกัดด้วยน้ำ แสดงผลการ ต้านมะเร็งผ่านการกระตุ้นของ adenosine A₃ receptor ตามด้วยการกระตุ้น glycogen synthase kinase (GSK)-3 β และการระงับ cyclin D₁ (Nakamura et al., 2015) Wang et al. ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัด *C. militaris* อาจเป็นแหล่งที่อาจเป็นประโยชน์ในการทดแทนสารสกัดจากน้ำของ *C. sinensis* เพื่อป้องกันและรักษาความเป็นพิษต่อตับ (Wang et al., 2012) นอกจากนี้การเสริม *C. sinensis* ที่มีหรือไม่มีสารออกกำลังกายช่วยเพิ่มความสามารถในการออกกำลังกายด้วยการกระตุ้น กลไกการเผาผลาญของกล้ามเนื้อและการตอบสนองต่อสารต้านอนุมูลอิสระ (Kumar et al., 2011) polysaccharide ของ *C. sinensis* เป็นอีกตัวหนึ่งที่มีผลต่อการเผาผลาญกลูโคสในตับของหนู ที่เป็นเบาหวานที่ถูกชักนำโดย STZ เนื่องจากมีผลต่อการทำงานของ glucokinase, hexokinase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase อย่างมีนัยสำคัญ (Kiho et al., 1996) ผลการวิจัยก่อนหน้านี้ รายงานว่า adenosine และ cordycepin อาจถูกใช้เป็นส่วนผสมในการสร้างดัชนีเพื่อแยก Cordyceps ออกจากสินค้าลอกเลียนแบบ (Wang et al., 2012) Li et al. รายงานว่าการให้ CSP-1 ซึ่งเป็น polysaccharide ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการแยกจาก *C. militaris* ที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลใน เลือด ปริมาณมากกว่า 200 มก./กก. ต่อวันเป็นเวลาเจ็ดวันทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมี นัยสำคัญ และระดับอินซูลินที่เพิ่มขึ้นในหนูเบาหวานซึ่งชี้ให้เห็นว่า CSP-1 อาจกระตุ้นการหลั่ง อินซูลินของตับอ่อนหรือลดเมแทบอลิซึมของอินซูลิน (Li et al., 2006) *C. sinensis* ช่วยทำให้มี อาการดีขึ้นของโรคเบาหวานที่ถูกชักนำโดยการลดความเข้มข้นของอินซูลินในซีรัมและ โรคเบาหวานที่ถูกชักนำโดยการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ลงโดยทำให้ ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง (Lo et al., 2006) Guo et al. พบว่า *C. sinensis* มีฤทธิ์ต้านอาการซึมเศร้า ดังนั้นพวกเขาจึงเสนอว่า *C. sinensis* ที่เติม vanadium อาจเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการรักษา ภาวะซึมเศร้าและโรคเบาหวานร่วมกับผลของ *C. sinensis* และ vanadium (Guo et al., 2010) Hu et al. แสดงให้เห็นว่า *C. sinensis* มีฤทธิ์ในลดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง โดยการซ่อมแซมปิตาเซลล์และ ส่งเสริม insulin-mediated signal transduction pathway ใน insulin-sensitive gastrocnemius และ เนื้อเยื่อไขมัน (Hu et al., 2014).

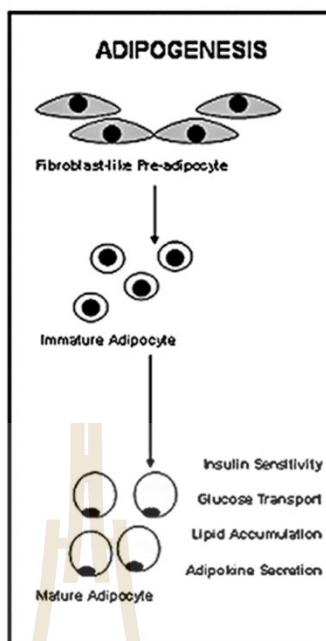
Gymnema sylvestre (R.Br) (Family: Asclepiadaceae) เป็นพืชสมุนไพรแบบดั้งเดิม สาร สกัดจากพืชถูกใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของน้ำตาลใน

เลือดผ่านการเพิ่มระดับอินซูลินในเลือด และผ่านการฟื้นฟูตับอ่อน มีรายงานว่า *G. sylvestre* ประกอบด้วย alkaloids, saponins, flavonoids, tannins และ gymnemic acid นอกจากนี้ Gymnemic acid จาก *G. sylvestre* ยังบดล็อกตัวรับกลูโคสในลำไส้เล็ก (Ahmed et al., 2010; Mitra et al., 1995) จากการศึกษาในหลอดทดลองของ El Shafey et al. ได้ตรวจสอบผลของสารสกัดจากใบ *G. sylvestre* ในหนูเบาหวาน ผลจากการศึกษาพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลงในหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัด เนื่องจากการลดระดับการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) ในหนูที่เป็นเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเปรียบเทียบกับหนูที่เป็นเบาหวานที่ไม่ได้รับสาร (El Shafey et al., 2013) การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าสารสกัดจากใบของ *G. sylvestre* ช่วยลดน้ำตาลในเลือดและไขมันในเลือด เช่น คอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์, HDL, LDL และ VLDL ในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน และ gymnemic acid สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสูงได้ (Ramkumar et al., 2008) นอกจากนี้สารสกัดของ *G. sylvestre* ยังทำให้เกิดการสร้างเซลล์ใหม่ (regenerate) ของบีตาเซลล์ในผู้ป่วยเบาหวานด้วย (Ahmed et al., 2010) ในการรักษาบีตาเซลล์ มีการกระตุ้น AMP และโปรตีนไคเนสแสดงให้เห็นถึงฟังก์ชันที่เป็นเอกลักษณ์หรือเชื่อมต่อสถานะพลังงานของเซลล์ไปสู่ความสามารถในการสังเคราะห์และการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินของเซลล์ (da Silva Xavier et al., 2003) ทำนองเดียวกันการค้นพบก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าผลยับยั้งของ triterpenoids ใน *G. inodorum* ช่วยในการดูดซึมกลูโคสจากลำไส้อาศัย CH_2OH (Shimizu et al., 2001) Fatma El Zahraa et al. แสดงให้เห็นว่า Cordyceps และ taurine มีประสิทธิภาพน้อยกว่า glibenclamide ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดการปรับปรุงการทำงานของบีตาเซลล์และเพิ่มระดับ HDL ในเลือด ในขณะที่เดียวกันการผสมกันมีผลดีกว่า glibenclamide ในการปรับปรุงความต้านทานต่ออินซูลินลดลงในเลือดและแสดงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ทั้งสองสารมีผลต่อระดับอินซูลิน, fructosamine, และ TG ในซีรัม การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับอ่อนที่แยกได้จากหนูเบาหวานที่ได้รับ Cordyceps และการรวมกันของ taurine มีผลต่อการป้องกันตับอ่อนมากขึ้น เนื่องจากมีการทำลายตับอ่อนน้อยลง (Fatma El Zahraa et al., 2012)

ไขมันในเนื้อเยื่อสัตว์เป็นคลังเก็บพลังงานของหยดไขมัน และไตรกลีเซอไรด์ที่เก็บไว้ใน adipocyte การเก็บสะสมไขมันส่วนเกินอยู่ในร่างกายนี้เป็นความเสี่ยงที่สำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาโรคเบาหวานประเภท 2 โรคหลอดเลือด ความดันโลหิตสูงและอัมพาต (Turner et al., 2014) โรคอ้วนหมายถึงส่วนเกินของน้ำหนักตัวซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการสะสมไขมันในร่างกายเพิ่มขึ้น เป็นสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคแทรกซ้อน เช่น การดื้อต่ออินซูลิน โรคเบาหวานประเภท 2 โรคไขมันในเลือด และโรคตับอักเสบ ไขมันที่เรียกว่าเป็นกลุ่มอาการเมแทบอลิซึม (metabolic syndrome) ซึ่งเป็นความท้าทายหลักสำหรับการค้นคว้าทาง

วิทยาศาสตร์ขั้นพื้นฐาน (Buettner et al., 2007) อุบัติการณ์ของโรคอ้วนและความผิดปกติที่เกี่ยวข้องมีเพิ่มขึ้นทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนา รายงานสถิติจากองค์การอนามัยโลก เผยแพร่ในปี พ.ศ. 2551 แสดงให้เห็นว่า 35% ของประชากรผู้ใหญ่อายุ 20 ปีขึ้นไปมีน้ำหนักเกิน ($BMI \geq 25$ กก./ตารางเมตร) นอกจากนี้ 10% ของผู้ชายและ 14% ของผู้หญิงทั่วโลกเป็นโรคอ้วน ($BMI \geq 30$ กก./ตารางเมตร) (World Health Organization, 2000) ผลกระทบด้านสุขภาพที่ไม่พึงประสงค์จากการมีน้ำหนักเกินและโรคอ้วนรวมถึงโรคเบาหวานประเภท 2 โรคหัวใจ คอเลสเตอรอลสูง และไตรกลีเซอไรด์ ภาวะแทรกซ้อนทางเดินหายใจและโรคข้อเข่าเสื่อม (Kopelman, 2000)

ภาวะไขมันในเลือดสูงเป็นความผิดปกติของการเผาผลาญที่มีความชุกทั่วโลกสูง โดยมีระดับคอเลสเตอรอลรวมสูง (TC) คอเลสเตอรอลที่มีความหนาแน่นต่ำ (LDL-C) และไตรกลีเซอไรด์ (TG) กับการลดลงของคอเลสเตอรอลที่มีความหนาแน่นสูง (HDL-C) ในเลือด ภาวะไขมันในเลือดสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักสำหรับการพัฒนาโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โรคหลอดเลือดแดง และโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวกับการเผาผลาญ (Yinrun Ding et al., 2016) มีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของพลาสมา LDL-C และ TC ถือเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการเป็นโรคหลอดเลือดแดง (Jialal and Devaraj, 1996) ดังนั้นการลดระดับ TC และ LDL-C จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการป้องกันหรือชะลอความก้าวหน้าของโรคหลอดเลือดและโรคอ้วน (Hansson, 2005) นอกจากนี้โรคอ้วนมีลักษณะการเพิ่มขึ้นของเนื้อเยื่อไขมันซึ่งเป็นผลมาจากทั้งจำนวนเซลล์ไขมันที่เพิ่มขึ้นและการเพิ่มขนาดของเซลล์ไขมัน (Couillard et al., 2000) ปริมาณของมวลเนื้อเยื่อไขมันสามารถควบคุมโดยการยับยั้ง adipogenesis จาก preadipocytes fibroblastic เมื่อ adipocytes เจริญเต็มที่และการก่อให้เกิด apoptosis ในเนื้อเยื่อไขมัน (Sorisky et al., 2000).

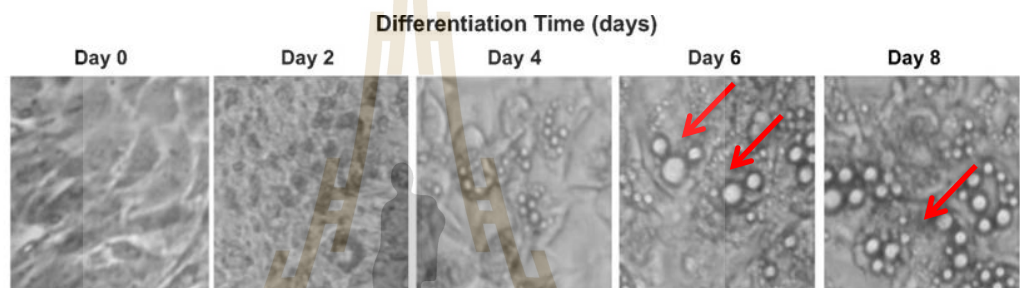


รูปที่ 2.1 แผนภาพแบบแผนของกระบวนการพัฒนาการของ adipocyte ปัจจุบันความเข้าใจเกี่ยวกับการพัฒนาการและความแตกต่างของ adipocyte บ่งชี้ว่าสารตั้งต้นของเซลล์ต้นกำเนิด pluripotent ก่อให้เกิดเซลล์เยื่อใยพหุคูณที่มีศักยภาพในการแยกแยะเป็น adipocytes การแปลง preadipocytes proliferative เป็น adipocytes ที่มีหยดไขมันขนาดใหญ่หลายแห่ง ก่อนเซลล์ adipocyte เซลล์ Clonal สายพันธุ์ได้รับการขยายระยะหลังการบรรจบกันและระยะแตกต่าง (Wood, 2008)

2.2 3T3-L1 cell lines

สายโคลนหนึ่งที่สร้างขึ้น 3T3-L1 เป็นเส้น preadipocytes เมื่อเซลล์เข้าสู่สถานะพักพร้อมใน รูปแบบ monolayers หรือการเพาะเลี้ยงแขวนลอยที่เสถียรด้วย methylcellulose โดยสะสมไขมันใน รูปของไตรกลีเซอไรด์และกลายเป็นเซลล์ไขมัน ความเข้มข้นของซีรัมสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่ม ความรวดเร็วและขอบเขตของการสะสมไขมัน การเปลี่ยนแปลงของไขมันอาจล่าช้าไปเรื่อยๆ ใน การเพาะเลี้ยงพื้นผิวโดยการเก็บเซลล์ไว้ในสภาพการเจริญเติบโต (Green and Meuth, 1974) เซลล์ที่มีความแตกต่างเป็นลักษณะเฉพาะของการทำงานซึ่งเป็นการแสดงออกของส่วนประกอบที่เป็นเอกลักษณ์ของโปรตีนเช่น เซลล์เม็ดเลือดแดงมีความโดดเด่นด้วยปริมาณฮีโมโกลบินและ myotubes ที่แตกต่างกันโดยโปรตีนหดตัวจำนวนมาก ในทำนองเดียวกัน adipocytes มีลักษณะเป็น เอนไซม์ lipogenic สูงซึ่งช่วยในการสังเคราะห์และการสะสมของไตรกลีเซอไรด์จำนวนมาก เซลล์ 3T3-L1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยของเซลล์ตัวอ่อนของตัวอ่อน 3T3-L1 ซึ่งได้รับการเพาะเลี้ยงใน

ลักษณะที่แตกต่างกันในการเลี้ยงและได้รับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ adipocytes หลายวันหลังจากที่เซลล์บรรจบกันเซลล์ 3T3-L1 จะเปลี่ยนรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของไฟโบรบลาสต์ มีการรวมตัวกันของเซลล์ และมีปริมาณมากขึ้นของไตรกลีเซอไรด์ในไซโตพลาสซึม เมื่อมีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังใน BALB C (athymic) ของตัวอ่อนหนูเมาส์ 3T3-L1 preadipocytes จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาสู่เนื้อเยื่อไขมันปกติ ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ 3T3-L1 ในอาหารการเพาะเลี้ยง การแสดงออกลักษณะของ adipocyte มีความเกี่ยวข้องกับ การตัดแปลงพันธุกรรมและการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่ควบคุมการเกิด lipogenesis และ lipolysis ใน adipocytes ที่เจริญเต็มที่ (Student et al., 1980)



รูปที่ 2.2 3T3-L1 preadipocytes มีความแตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเซลล์ ลูกศรชี้ว่ามีหยดไขมันใน cytoplasm (Miegeu et al., 2013)

2.3. ประสิทธิภาพการลดไขมันในเลือดของ *Cordyceps* spp. และ *Gymnema* spp.

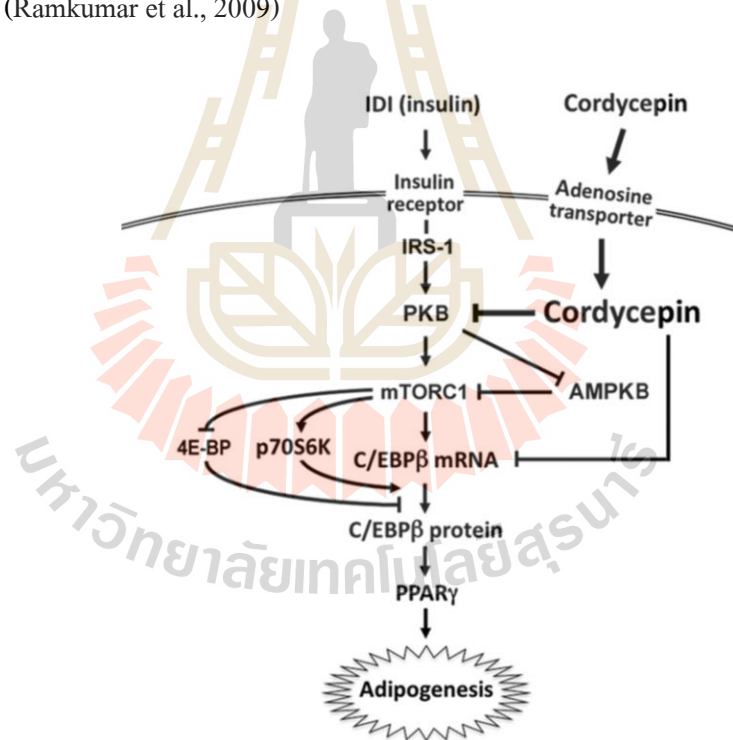
เมื่อเร็วๆ นี้ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความชุกของโรคอ้วนและปัญหาสุขภาพที่เกี่ยวข้อง ยาลดน้ำหนักได้ผลดีมากขึ้น อย่างไรก็ตามยาบางชนิดเช่น Sibutramine ถูกถอนโดย FDA เนื่องจากผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากยานี้ (Williams, 2010) ดังนั้นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหรืออนุพันธ์จึงกลายเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจสำหรับยาลดน้ำหนัก

Cordyceps militaris เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับการศึกษาสำหรับป้องกันการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูง การศึกษาวิจัยในหลอดทดลองของ Shimada และเพื่อนร่วมงานในปี พ.ศ. 2551 ระบุว่า *C. militaris* ถูกใช้ในการต้าน adipogenic โดยการใส่เซลล์ 3T3-L1 และพบว่าสารสกัดจาก *C. militaris* ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ 3T3-L1 preadipocytes สู่ adipocytes ในระยะเจริญเต็มที่ โดยไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามผลของการยับยั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่มีผลต่อ 1) การลดลงของไขมันสะสม 2) การเหนี่ยวนำของการสร้างไขมันลดลง ได้แก่ adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , และ CCAAT/enhancer binding protein alpha

และ 3) การแสดงออกที่ยั่งยืนของ preceptipocyte, monocyte chemoattractant protein-1 (Shimada et al., 2008) นอกจากนี้สารสกัดจากน้ำ *C. militaris* ที่แสดงให้เห็นถึงผลการป้องกันของ *C. militaris* ต่อเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นสาเหตุของ t-BHP อาจเป็นผลมาจากการลด ROS, การปรับ Bcl-2 และ Bax, mitochondrial membrane potential, caspase-3 และการควบคุมกลูตาไธโอนและกิจกรรม SOD ในเซลล์ตับที่ระดับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ *C. militaris* (Wang et al., 2012) การศึกษาในสัตว์ทดลองของกิมและเพื่อนร่วมงานแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมทางสรีรวิทยาของ *C. militaris* จากการบริโภคสารสกัดจากน้ำร้อนในการลดไขมันในเลือด เช่น คอเลสเตอรอลรวม (TC), ไตรกลีเซอไรด์ (TG), ฟอสโฟลิปิด (PL) และเอนไซม์การเผาผลาญ เช่น AST และ ALT ในซีรัมของหนูแรทที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง (Kim et al., 2012) นอกจากนี้ครั้งแรกที่ cordycepin ยับยั้งการกระจายตัวของไขมันและการสะสมของไขมันในระยะเจริญเต็มที่ของ adipocytes เนื่องจาก cordycepin สามารถสกัดกั้นทั้งการเปลี่ยนแปลงของ adipocyte และการสะสมของไขมัน และก็มีศักยภาพในการเป็นตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพสำหรับโรคอ้วนและความผิดปกติของโรคอ้วน (Takahashi et al., 2012)

เนื่องจากสาเหตุของระดับคอเลสเตอรอลในเลือดที่เป็นสาเหตุของผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภท 2 จึงทำให้นักวิจัยจำนวนมากพยายามที่จะค้นหาและแก้ปัญหานี้โดยการทดลองในหนูเบาหวาน การวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าการใช้สารสกัดจากใบ *G. montanum* ที่ระดับ 200 มก./กก. ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญและเพิ่มระดับอินซูลินในหนูเบาหวาน (Ananthan et al., 2003) ส่วนเกินของกรดไขมันอิสระในเลือดที่ผลิตโดย alloxan จะลดกระบวนการใช้กลูโคสโดยมีอินซูลินเป็นตัวกลางและส่งเสริมการเปลี่ยนกรดไขมันส่วนเกินเป็น phospholipids และคอเลสเตอรอลในตับ ทั้ง phospholipids และคอเลสเตอรอลพร้อมกับไตรกลีเซอไรด์ส่วนเกินที่เกิดขึ้นในเวลาเดียวกันในตับอาจจะถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือดในรูปแบบของ lipoprotein กลไกที่เป็นไปได้ที่สารสกัดจากใบ *G. montanum* อาจก่อให้เกิดการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ อาจเกิดจากการหลังอินซูลินจากเซลล์บีตาของ islets หรือเนื่องจากการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดไปสู่เนื้อเยื่อรอบนอก นี่เป็นหลักฐานที่ชัดเจนโดยระดับอินซูลินที่เพิ่มขึ้นในหนูที่เป็นเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใบ *G. montanum* (Latha and Pari, 2003) อย่างไรก็ตามบางส่วนของพีชชนิดอื่นๆ ยังมีรายงานว่ามิฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือดและลดการหลังอินซูลิน (Venkateswaran and Pari, 2002) Ananthan และเพื่อนร่วมงานได้แสดงให้เห็นการให้สารทางปากของใบ *G. montanum* กับหนูแรทที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วย alloxan มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการลดน้ำตาลในเลือดและปริมาณไขมัน กลไกที่เป็นไปได้ในการต่อต้านการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูงของใบ *G. montanum* อาจเกิดจากผลต่อการกระตุ้นอินซูลินจากเซลล์บีตาของ islets หรือเนื่องจากการทำปฏิกิริยากับ

อินซูลินโดยการเพิ่มการปล่อยกลูโคสจากพลาสมาไปสู่เนื้อเยื่อรอบนอก อย่างไรก็ตามในขณะที่การให้ใบของ *G. montanum* ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับอินซูลินในหนูปกติมากนัก ในขณะที่ในหนูเบาหวานจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Ramkumar et al., 2008) ความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของการเกิด peroxidation ของไขมัน โรคไตจากเบาหวานแสดงการลดการทำหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ SOD, CAT, GPx, GST และ GSH ซึ่งมีความสำคัญในการขจัดสารพิษที่เป็นตัวกลาง การลดลงของหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เหล่านี้อาจทำให้มีปริมาณ O_2 มากเกินไป และ H_2O_2 ในระบบชีวภาพซึ่งจะก่อให้เกิด $OH\cdot$ ส่งผลให้เกิดการเริ่มต้นและการแพร่กระจายของ lipid peroxidation (Kumthekar and Katyare, 1992) ในขณะที่การประเมินผลของสารสกัดเอทานอลจาก *G. montanum* ต่อความเสียหายของไตในหนูที่เป็นเบาหวานเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับยาลดน้ำตาลมาตรฐาน glibenclamide พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในไตของหนูเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ปริมาณ 200 มก./กก. ต่อมวลกาย เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (Ramkumar et al., 2009)



รูปที่ 2.3 แบบสมมุติฐานในการแทรกแซง adipogenesis โดย cordycepin, Cordycepin ขัดขวางการเกิด adipogenesis โดยการยับยั้ง C/EBP β and PPAR γ ในระหว่างการเกิด adipogenesis mTORC1 จะทำงานอย่างรวดเร็วผ่าน PKB pathway ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มการควบคุมของ C/EBP β and PPAR γ Cordycepin ยับยั้งการ phosphorylation ของ PKB และการกระตุ้น mTORC1 ตามมาซึ่งจะนำไปสู่การยับยั้ง C/EBP β (และ PPAR γ) ผ่านทาง p70S6K และ 4E-BP การกระตุ้นการทำงานของ

AMPK ผ่านการยับยั้ง PKB ยังอาจนำไปสู่การยับยั้งของ mTORC1 โดย Cordycepin นอกจากนี้ cordycepin อาจมีผลต่อการถอดรหัส C/EBP β (และ PPAR γ) โดยตรง เหตุการณ์เกี่ยวกับโมเลกุลเหล่านี้อาจเป็นผลมาจากการต่อต้าน adipogenic ของ cordycepin (Takahashi et al., 2012)

นอกจากนี้การค้นพบก่อนหน้านี้พบว่า cordycepin จาก *C. militaris* ช่วยป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูงโดยกระตุ้นการทำงานของ phosphor-AMP-activated protein kinase (AMPK) และสามารถเพิ่มความไวของอินซูลินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Guo et al., 2010)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลต่อการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากถั่งเช่า (*Cordyceps sinensis* extract; CSE) ร่วมกับสารสกัดจากผักเชียงดา (*Gymnema inodorum* extract; GIE) ต่อการลดไขมันและระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ชักนำด้วยอาหารไขมันสูงที่ทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ ดังนั้นรายงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจาก CSE ร่วมกับสารสกัดจาก GIE ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดและการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ด้วยการให้กินอาหารไขมันสูง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบพืช และเชื้อรา และสารเคมี

สารสกัดเชื้อราของถั่งเช่า (CSE) ได้รับการสนับสนุนโดยบริษัทคอร์ดีไบโอเทค (CordyBiotech), ประเทศไทย กรรมวิธีการสกัดเป็นความลับของทางบริษัทเนื่องจากได้ผ่านการจดอนุสิทธิบัตรร่วมกับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 11927 กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าที่เบต) (<http://www.cordythai.com/index.html>) ตัวอย่างพืชได้รับการรับรองจากนักพฤกษศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย) ใบของผักเชียงดา (*Gymnema inodorum*) จะคัดเลือกจากบริษัทสวนเกษตรอินทรีย์เชียงใหม่ (เชียงใหม่, ประเทศไทย) ตัวอย่างพืชได้รับการตรวจสอบโดย ผศ.ดร.สันติ วัฒนฐานะ อาจารย์และนักชีววิทยาพืชที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตัวอย่างพืชถูกเก็บไว้ที่สวนพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สารเคมีอื่นๆ ทั้งหมดใช้ Laboratory grade เซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocytes ซึ่งจาก ATCC, Methyl Isobutyl-methylxanthine (IBMX), dexamethasone, และ insulin reagent ซึ่งจาก Sigma (St. Louis, MO, USA).

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสกัดพืช

ผงผักเชียงดาบดละเอียดน้ำหนัก 250 กรัม ถูกแช่ใน 95% เอทานอล ปริมาณ 750 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และคนเป็นบางครั้ง หลังจากครบ 7 วัน สารสกัดเอทานอลจะถูกกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สารสกัดเอทานอลจะถูกระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ภายใต้อุณหภูมิ 50 °C สารสกัดเข้มข้นถูกเก็บในจานเลี้ยงเชื้อและตากให้แห้งเพื่อการระเหยของเอทานอลให้สมบูรณ์ สารสกัดกึ่งแข็งที่มีสีดำเขียวถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะมีการใช้งานต่อไป (Prabhu and Vijayakumar, 2014)

3.2.1.1 การตรวจสอบทางพิษวิทยาเคมีเชิงคุณภาพเบื้องต้น

การวิเคราะห์ตรวจสอบเบื้องต้นทางพิษวิทยาเคมีเชิงคุณภาพดำเนินการตามที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อยตามวิธีการของ Al-Daihan et al.; Savithramma et al.; Yadav

and Agarwala. สารสกัดที่ได้รับการตรวจสอบส่วนประกอบ ได้แก่ alkaloids, tannins, flavonoids, saponins, glycosides, และ steroids (Al-Daihan et al., 2013; Savithramma et al., 2011; Yadav and Agarwala, 2011).

ทดสอบ alkaloids

2 มิลลิลิตร จากสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้น 100 mg/ml ถูกเพิ่มใน 2 ml ของ 1% HCl และผสมให้เข้ากันดี จากนั้นเติม 100 ml ของ Mayer's or Wagner's reagents ลงในสารสกัด ถ้ามีอัลคาลอยด์จะปรากฏการตกตะกอนของสีน้ำตาล

ทดสอบ tannins

Ferric chloride

2 มิลลิลิตร จากสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้น 100 mg/ml ถูกผสมกับ 2 ml ของ 2% FeCl₃ การพัฒนาสีฟ้า - เขียว (catechic tannins) หรือสีฟ้า - ดำ (gallic tannins) ระบุว่าไม่มีแทนนิน

Gelatine test

2 มิลลิลิตร ของ 1% สารละลาย gelatin ที่ประกอบด้วย 10% NaCl ถูกเพิ่มใน 1 ml ของสารสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml การเกิดตะกอนขาวบ่งชี้ว่ามีแทนนิน

ทดสอบ flavonoids

Alkaline reagent

2 มิลลิลิตร จากสารสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml ถูกผสมกับ 2 ml ของ 2% NaOH การก่อตัวของสีเหลืองที่รุนแรงและเปลี่ยนเป็นไม่มีสีหลังจากที่เพิ่มไม่กี่หยดของกรดเจือจาง (1% HCl) แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของ flavonoids ใช้ Quercetin เป็นตัวควบคุมในเชิงบวก

Lead acetate test

2 มิลลิลิตร จากสารสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml ถูกผสมกับ 2 ml ของ 10% สารละลาย lead acetate การเกิดตะกอนสีเหลืองแสดงให้เห็นว่ามีฟลาโวนอยด์

ทดสอบ saponins

4 มิลลิลิตร จากสารสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml ถูกเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 15 นาที การผลิตโฟมแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาทีถือว่าเป็นของ saponin

ทดสอบ Glycosides

Liebermann's test

2 มิลลิลิตร จากสารสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml ถูกผสมกับ 2 ml ของคลอโรฟอร์มและ 2 ml ของกรดอะซิติก ผสมให้เย็นลงในน้ำแข็งและใส่ไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้มข้น 2-3 หยดลงไป การเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียวแสดงถึง glycosides

Salkowski's test

2 มิลลิลิตร จากสารสกัด ถูกเพิ่มใน 2 ml ของคลอโรฟอร์มแล้ว 2 ml ไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้มข้น ถูกเพิ่มส่วนผสมอย่างระมัดระวังและเขย่าเบา ๆ สีน้ำตาลแดงแสดงให้เห็นว่ามีไกลโคไซด์

ทดสอบ steroids

2 มิลลิลิตร จากสารสกัด ถูกผสมกับ 2 ml ของคลอโรฟอร์ม และไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้มข้น การผลิตสีแดงในชั้นล่างของคลอโรฟอร์มถือเป็นการดำรงอยู่ของสเตียรอยด์

3.2.1.2 การประมาณเชิงปริมาณของสารประกอบทางเคมี

การตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC)

ปริมาณฟีนอลิกรวมถูกตรวจสอบโดยใช้ Folin-Ciocalteu assay ซึ่งได้ศึกษามาก่อนหน้าโดย Chen and Li; Settharaksa et al. โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย (Chen and Li, 2007; Settharaksa et al., 2014) โดยสรุปดังนี้ แต่ละหลุมของ 96-well plate จะถูกเติมด้วย 100 μ l ของ 0.2 M ของ Folin-Ciocalteu และ 20 μ l ของ CSE หรือ GIE ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.015, 0.02, 0.0625 mg/ml ใน 100% เมทานอล) ของกรดแกลลิก แล้วเพิ่ม 80 μ l ของ 7.5% (w/v) sodium carbonate และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ค่าดูดกลืนแสงที่ใช้วัดที่ 765 nm โดยเครื่อง spectrophotometry ปริมาณฟีนอลิกรวมถูกตรวจสอบโดยใช้กรดแกลลิกเป็นกราฟมาตรฐาน ผลที่ได้แสดงเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g)

การตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC)

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถูกตรวจสอบด้วย aluminium chloride colourimetric assay ตามวิธีการของ Rupasinghe et al และ Singleton et al. (Rupasinghe et al., 2008; Singleton et al., 1999) โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อย พอสรุปได้ดังนี้ 125 μ l น้ำกลั่น, 25 μ l สารมาตรฐาน catechin ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/ml) หรือ CSE หรือ GIE และ 10 μ l ของ 5% NaNO_2 ถูกผสมในแต่ละ 96-well plate สารผสมถูกบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 15 μ l ของ 10% AlCl_3 จากนั้นบ่มต่อ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 50 μ l ของ 1 M NaOH และเขย่าใน microplate reader spectrophotometry เป็นเวลา 5 นาทีก่อนที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถูกตรวจสอบโดยใช้กราฟมาตรฐานของ catechin ผลที่ได้แสดงเป็น มิลลิกรัมแคทีชินต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (mg CE/g)

3.2.2 Cell culture

3T3-L1 Mouse Embryonic Fibroblasts ซึ่งได้จาก American Type Culture Collection (ATCC, USA) เซลล์ 3T3-L1 preadipocytes ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) กับ น้ำตาลกลูโคสสูง และเสริมด้วย 10% v/v ของ bovine calf serum (BCS), 100 U/mL ของ penicillin และ 100 µg/mL ของ streptomycin จากนั้นเลี้ยงจนมีการบรรจบกัน ประมาณ 70-80% (2 วัน) เซลล์ถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 5% CO₂ และ ความชื้น 95% โปรโตคอลมาตรฐานได้ปฏิบัติตามแนวทางของ ATCC

3.2.2.1 การเหนี่ยวนำการสร้างเซลล์ไขมันของ 3T3-L1 เซลล์ (ตามแนวทางของ ATCC)

การเตรียม

ส่วนประกอบของอาหารที่เพิ่มการขยายตัวของ Pre-adipocyte: 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 10% Bovine Calf Serum

ส่วนประกอบของอาหารที่เร่งการเปลี่ยนแปลงจาก Pre-adipocyte เป็น adipocyte: 90% of DMEM, 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1.0 µM Dexamethasone, 0.5 mM Methylisobutylxanthine (IBMX), และ 1.0 µg/mL insulin

ส่วนประกอบของอาหารที่รักษาสภาพของเซลล์ adipocyte: 90% DMEM, 10% Fetal Bovine Serum, และ 1.0 µg/mL insulin

เมื่อเซลล์ 3T3-L1 บรรจบกัน 70-80% เซลล์เหล่านี้ได้รับการเก็บเกี่ยวโดยวิธี trypsinization ตามคำแนะนำที่เกี่ยวข้องกับ subculture ที่ระบุไว้ใน Product Sheet for ATCC® CL-173™ เซลล์ 3T3-L1 preadipocytes จะถูกเก็บรักษาในอาหารที่เพิ่มการขยายตัวของ Pre-adipocyte เป็นเวลา 2 วัน (นับวันแรก ถึงวันที่ 2) การเปลี่ยนแปลงจนถึงกระบวนการสุดท้ายของเซลล์ถูกชักนำด้วยอาหารที่เร่งการเปลี่ยนแปลงจาก Pre-adipocyte เป็น adipocyte เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่รักษาสภาพของเซลล์ adipocyte เป็นเวลา 6 วัน อาหารรักษาสภาพถูกเปลี่ยน ทุก 2 วัน จนกระทั่งเซลล์สามารถใช้งานได้ สารสกัดจากพืชถูกละลายด้วย 100% DMSO เพื่อใช้เป็นสต็อกและเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C แล้วสต็อกของสารสกัดถูกเพิ่มในอาหารและอาหารรักษา สภาพที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลาที่แตกต่างกันไปจนกว่าจะเก็บเกี่ยวเซลล์ ความเข้มข้นที่ใช้ ของ DMSO ในแต่ละอาหารเป็น 0.1% v/v การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแต่ละสารสกัดทำได้โดยการวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้ 3(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Life Technology, Thailand) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต

3.2.2.2 การทดสอบความคงอยู่ของเซลล์

ผลความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชหรือ simvastatin ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ถูกตรวจสอบโดย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ก่อนการรวมตัวกันของ 3T3-L1 preadipocytes ถูกฝังใน 96-well plates ที่ความหนาแน่นที่ 5×10^3 cells/well หลังจากเซลล์รวมตัวเป็นเวลา 2 วัน เซลล์ถูกรักษาด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด (ปริมาณเดียว; *C. sinensis* extract (CSE) 5 $\mu\text{g/ml}$ - 40 $\mu\text{g/ml}$; *G. inodorum* extract (GIE) 250 $\mu\text{g/ml}$ - 2000 $\mu\text{g/ml}$, ปริมาตรร่วมกัน; CSE (10 $\mu\text{g/ml}$) ร่วมกับ GIE (500 $\mu\text{g/ml}$)) หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการรักษา (48 ชั่วโมง) ความคงอยู่ของเซลล์ถูกตรวจสอบโดย MTT assay พอสรุปได้ดังนี้ MTT assay ถูกดำเนินการโดยการบ่มเซลล์กับ 100 μl ของ MTT solution (0.5 mg/ml ใน phosphate buffer saline [PBS]) ที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากบ่มสารละลาย MTT ทั้งหมดจะถูกดูดออกแล้ว ผลึก Formazan ที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่มีชีวิตถูกละลายใน DMSO 100% การทดลองถูกดำเนินการในห้องมืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย microplate spectrophotometer (Benchmark Plus, Bio-Rad, Japan) ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละปริมาณถูกคำนวณโดยการลบการดูดกลืนแสงของหลุมเปล่าที่ไม่มีเซลล์ เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ formazan ถูกคำนวณเพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ใช้ปริมาณที่ไม่เป็นพิษในการวิเคราะห์ต่อไป

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของ control-blank of control}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของ extract-blank of extract}} \times 100$$

3.2.2.3 การย้อม Oil Red O

การวัดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์ใน adipocyte ระยะเจริญเต็มที่กำหนดโดยการย้อมสี Oil Red O ตามคำอธิบายก่อนหน้านี้โดยมีการปรับเปลี่ยนบางส่วน (Ramirez-Zacarias et al., 1992) ในวันที่ 10 เซลล์ใน 24-well plates ที่ความหนาแน่นที่ 3×10^4 cells/well ถูกล้างด้วย PBS 2 ครั้ง และตรึงกับ 1 ml/well ของ 10% (v/v) formalin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากการตรึง เซลล์ถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งและ 0.5% Oil Red O solution ใน 60:40 (v/v) isopropanol:น้ำกลั่น ถูกใช้ในการย้อมหยดไขมันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเซลล์ถูกล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และหยดไขมันถูกตรวจสอบภายใต้ microscope และ photographed เพื่อตรวจสอบการสะสมของไขมัน ไขมันถูกสกัดโดยการล้างด้วย 60% isopropanol ตามด้วย 100% isopropanol แล้วดูดใส่ใน 96-well plates อันใหม่ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer

3.2.2.4 Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR microspectroscopy เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายเซลล์ในการศึกษาโดยช่วยให้สามารถแสดงลักษณะของกลุ่มที่แตกต่างกันเช่น lipids, proteins, nucleic acids และ polysaccharides ในโครงสร้างทางชีววิทยาที่ซับซ้อน (Siriwong et al., 2016) การวัดองค์ประกอบทางชีวเคมีและปริมาณของส่วนประกอบในเซลล์ 3T3-L1 ถูกกำหนดโดยเทคนิค FTIR ในวันที่ 10 หลังจากการเลี้ยงเซลล์ เซลล์ 3T3-L1 ถูกคัดเลือกและปั่นที่ $400\times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเซลล์ถูกล้างด้วย 0.85% NaCl และปั่นอีกครั้งที่ $400\times g$ เป็นเวลา 5 นาที แล้วเซลล์ถูกหยดลงบน window slides (MirrIR, Kevley Technologies) แล้วทำให้แห้งในโถสุญญากาศเป็นเวลา 30 นาที เซลล์ที่แห้งแล้วถูกเก็บในโถสุญญากาศเพื่อรอวิเคราะห์ FTIR

FTIR spectra ถูกบันทึกโดย spectroscopy facility ที่ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) (Synchrotron Light Research Institute (Public Organization)), ประเทศไทย FTIR spectra ได้มาจาก Bruker Vertex 70 spectrometer ติดกับ Bruker Hyperion 2000 microscope (Bruker Optics Inc., Ettlingen, Germany) ติดตั้งกับ nitrogen cooled MCT (HgCdTe) detector กับ $36 \times$ IR สเปกตรัมที่ได้รับเป็นโหมมภาพสะท้อนที่มีช่วงเลขคลื่นที่ $400-4,000 \text{ cm}^{-1}$ ใช้ขนาดรูรับแสงที่ $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ที่มีความละเอียดที่ 6 cm^{-1} แต่ละสเปกตรัมถูกเลือกที่ 64 สแกน OPUS 7.2 software (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany) ถูกใช้รับข้อมูลสเปกตรัม FTIR และระบบควบคุม

สเปกตรัมของ non-differentiated cells, differentiated cell, และ treated cells ถูกระบุด้วย Principal Component Analysis (PCA) ใช้ความแปรปรวนของ Unscrambler 9.7 software (CAMO Software AS, Oslo, Norway) ช่วงคลื่นของการตรวจวัดคือ $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$ และ $1800-850 \text{ cm}^{-1}$ ถูกใช้สำหรับกลุ่มทดลอง ก่อนการประมวลผลของสเปกตรัมได้ดำเนินการโดยการแปลงอนุพันธ์อันดับที่สองโดยใช้ Savitzky-Golay algorithm และปรับให้ปกติด้วย extended multiplicative signal correction (EMSC) วิธีนี้ใช้เพื่อระบุการทับซ้อนกันของสองหรือมากกว่าการดูดซึมที่คลดความผันแปรระหว่างการทำซ้ำสเปกตรัมและการแก้ไขสำหรับการเปลี่ยนแปลงพื้นฐาน แปลงข้อมูลคะแนน (2D) และแปลงการโหลด (Load Plots) เพื่อแสดงข้อมูลและความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ ของชุดข้อมูลตามลำดับ

การรวบรวมพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างถูกวิเคราะห์โดยใช้ OPUS 7.2 software (Bruker) ด้วยช่วงสเปกตรัมที่ $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$ และ $1750-1730 \text{ cm}^{-1}$ (lipid spectra), และ $1300-850 \text{ cm}^{-1}$ (nucleic acid spectra) การรวบรวมพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมไขมัน ($1700-1590 \text{ cm}^{-1}$) ถูกคำนวณจากค่าที่เหมาะสมของสเปกตรัมเดิมของแต่ละตัวอย่าง

3.2.3 สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย, ขนาดตัวอย่าง, อาหาร, และการออกแบบการทดลอง

3.2.3.1 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

สูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง : (Charan and Kantharia, 2013)

$$\text{ขนาดตัวอย่าง} = 2 \text{SD}^2(Z^{\alpha/2} + Z^{\beta})^2/d^2$$

เมื่อ

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = จากการศึกษาก่อนหน้าหรือการศึกษานำร่อง

$$Z^{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = Z_{0.025} = 1.96 \text{ (จากตาราง Z) ที่ความคาดเคลื่อนที่ 1 ของ 5\%}$$

$$Z^{\beta} = Z_{0.20} = 0.842 \text{ (จากตาราง Z) ที่ 80\% } d = \text{effect size} = \text{ความแตกต่างระหว่างค่ากลาง}$$

$$\text{ดังนั้นขนาดตัวอย่าง} = 2 \times 20.12^2 \times (1.96 + 0.842)^2 / 30^2 = 7.06$$

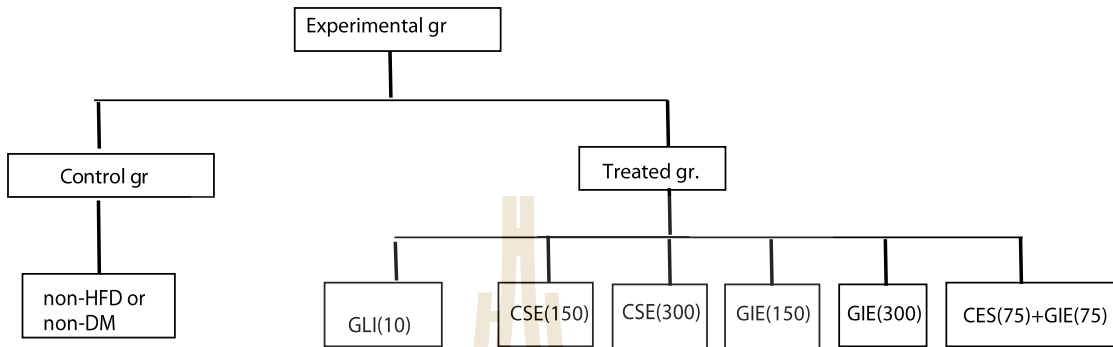
3.2.3.2 ผลของ CSE และ GIE ต่อการทดสอบความทนทานต่อน้ำตาลในหนูไม่ซ้

3.2.3.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

การทดลองในสัตว์ทดลองใช้หนูเมาส์เป็นแบบจำลองในการศึกษา หนูไม่ซ้เพศผู้ 49 ตัว (ICR เมาส์) อายุประมาณ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 30-40 กรัม ได้รับจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเลี้ยงและทำการทดลองที่อาคารสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา ประเทศไทย สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงในกรงสแตนเลส ในห้องควบคุมแสงและอุณหภูมิ (เปิดไฟ 06.00-20.00 น.) อุณหภูมิ $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ การทดลองทำตามหลักเกณฑ์ในการดูแลและใช้สัตว์ทดลองและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการการดูแลและใช้สัตว์ (ACUC) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สัตว์ทุกตัวได้รับอาหารเม็ดมาตรฐาน (Chakan Oil Mills, Sangli) และน้ำสำหรับสัตว์ทดลองแบบไม่จำกัด (Prabhu and Vijayakumar, 2014)

3.2.3.2.2 การทดสอบความทนทานต่อน้ำตาล (OGTT)

หนูไม่ซ้ถูกแบ่งเป็น 7 กลุ่ม มี 7 ตัวในแต่ละกลุ่ม หนูปกติถูกใช้ในการทดสอบความทนทานต่อน้ำตาลในกลุ่มควบคุม (Con), กลุ่มอื่นๆ ได้แก่ CSE (150) = CSE 150 mg/kg/BW; CSE (300) = CSE 300 mg/kg/BW; GIE (150) = GIE 150 mg/kg/BW; GIE (300) = GIE 300 mg/kg/BW; กลุ่มผสม CSE (75) + GIE (75) = CSE 75 mg/kg/BW ร่วมกับ GIE 75 mg/kg/BW; และ glibenclamide ที่ปริมาณ 10 mg/kg/BW, ถูกใช้เป็น positive control (GIB), ตามลำดับ ทุกกลุ่มถูกอดอาหารและน้ำข้ามคืน หลังจากนั้นทุกกลุ่มถูกป้อนน้ำตาล 2 g/kg D-glucose และสารสกัดทางปาก แล้วเริ่มวัดระดับน้ำตาลในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือดถูกวัดด้วย glucose oxidase strips (Ito et al., 2001).



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการออกแบบการทดลอง; GLI = Glibenclamide 10 mg/kg/BW; CSE (150) = *Cordyceps sinensis* extract 150 mg/kg/BW; CSE (300) = *Cordyceps sinensis* extract 300 mg/kg/BW; GIE (150) = *Gymnema inodorum* extract 150 mg/kg/BW; GIE (300) = *Gymnema inodorum* extract 300 mg/kg/BW และ Combination CSE (75) + GIE (75) = การผสมกันของ CSE 75 mg/kg/BW ร่วมกับ GIE 75 mg/kg/BW

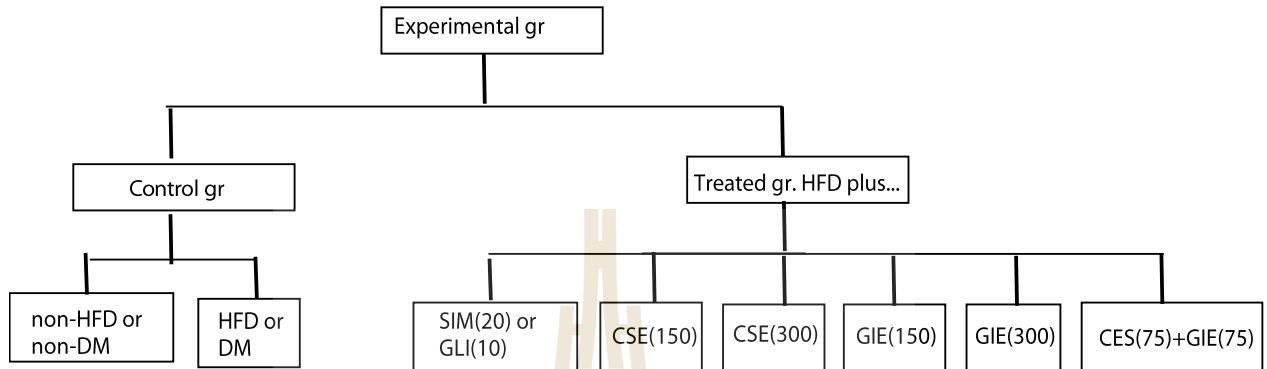
3.2.3.2.3 การศึกษาการยับยั้งภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูงในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย

High Fat Diet (HFD)

หนูได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) (มีไขมัน 60%) เพื่อเหนี่ยวนำภาวะไขมันในเลือดสูง โปรโตคอลทดลองได้รับการอนุมัติตามแนวปฏิบัติสำหรับการดูแลและการใช้สัตว์ในห้องปฏิบัติการโดยคณะกรรมการการดูแลและการใช้สัตว์ (ACUC), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (Zhang et al., 2011)

การศึกษการยับยั้งภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูงครั้งนี้ แต่ละการทดสอบหนูถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม (7 ตัว/กลุ่ม) กลุ่มแรกได้รับอาหารปกติและ 5% tween 80 และใช้เป็น negative control (Untreated-HFD), กลุ่มทดลองได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ *Cordyceps sinensis* extract 150 mg/kg BW/day = CSE (150), *Cordyceps sinensis* extract 300 mg/kg BW/day = CSE (300), *Gymnema inodorum* extract 150 mg/kg BW/day = GIE (150), *Gymnema inodorum* extract 300 mg/kg BW/day = GIE (300), การผสมกันของ CSE 75 mg/kg/BW ร่วมกับ GIE 75 mg/kg/BW = CSE (75) + GIE (75), การทดลองการยับยั้งน้ำตาลในเลือดสูงจะใช้ GIB (10) = Glibenclamide 10

mg/kg BW/day เป็น positive control ส่วนการทดสอบภาวะไขมันในเลือดสูงใช้ simvastatin ที่ ปริมาณ 20 mg/kg BW/day = Sim (20) ใช้เป็น positive control ตามลำดับ ทุกกลุ่มได้รับอาหารและ น้ำแบบไม่จำกัดเป็นเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 3.2 แผนผังแสดงการออกแบบการทดลอง; HFD = High-fat diet; SIM (20) = Simvastatin 20 mg/kg BW/day; GLI (10) = Glibenclamide 10 mg/kg BW/day; CSE (150) = *Cordyceps sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *Cordyceps sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *Gymnema inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *Gymnema inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ Combination CSE (75) + GIE (75) = การผสมกันของ CSE 75 mg/kg BW/day ร่วมกับ GIE 75 mg/kg BW/day.

ก่อนการทดสอบ (Pre-treatment) หนูทุกตัวในแต่ละกลุ่มถูกเก็บเลือดสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี (FBS, HDL, LDL, Cholesterol, Triglyceride, Creatinine, Alanine transaminase, Alkaline Phosphatase และ Complete Blood Count) เพื่อเปรียบเทียบกับหลังการทดสอบ (Post-treatment) และเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม การทดสอบฤทธิ์การลดน้ำตาลในเลือด หนูทดลองจะถูกอดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมงก่อนเก็บเลือดไปวิเคราะห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับการเมตตาตามาต เลือดถูกเก็บสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี (FBS, HDL, LDL, Cholesterol, Triglyceride, Creatinine, Alanine transaminase, Alkaline Phosphatase และ Complete Blood Count)

3.2.3.3 การวัดน้ำหนักตัว, การกินอาหาร และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

น้ำหนักตัวของหนูเมาส์แต่ละตัวถูกวัดทุกสัปดาห์ สำหรับหนูเมาส์แต่ละตัวได้รับการคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณอาหารที่บริโภคในแต่ละวัน ในวันสุดท้ายของการทดลองอวัยวะที่สำคัญ

ทั้งหมดถูกชั่งน้ำหนัก และคำนวณน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมของหนูเมาส์แต่ละตัวจะคำนวณดังนี้: (Zhou et al., 2009)

$$\text{น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์} = \frac{\text{น้ำหนักของอวัยวะ (g)}}{\text{น้ำหนักตัวในวันสุดท้ายของการทดลอง (g)}} \times 100$$

3.2.3.4 โลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมีในเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองตัวอย่างเลือดถูกเก็บโดยการเจาะที่หัวใจภายใต้การดมยาสลับอีเทอร์ และใช้ในการตรวจทางโลหิตวิทยา จากส่วนที่เหลือซีรัมถูกเตรียมโดยปั่นที่ 1000×g เป็นเวลา 30 นาที และเก็บที่ -20 °C เพื่อวิเคราะห์ทางเคมี ประกอบด้วย HDL, LDL, Cholesterol, Triglyceride, Alanine transaminase (ALT), Alkaline Phosphatase (ALP) และ Complete Blood Count (CBC) ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบวิเคราะห์แบบอัตโนมัติที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (Cherdshewasart et al., 2008)

3.2.3.5 การทดสอบความเป็นพิษของอวัยวะสำคัญที่เกี่ยวข้อง

ในวันทดลองวันสุดท้ายหนูจะได้รับอนุญาตให้บริโภคอาหารสามในสี่ของวันก่อนหน้า และเมตตาฆาต โดยการฉีด Sodium Thiopental และ/หรือการให้ดม CO₂ เป็นเวลา 15-30 นาที หลังจากหยุดการหายใจ แผ่นไขมันถูกนำออกและวัดน้ำหนักเปียก นอกจากนี้หลังจากการสุ่มตัวอย่างเลือด หัวใจ ตับ ม้าม และไตถูกนำออกและชั่งน้ำหนัก ใช้น้ำหนักตัวในการหาค่า น้ำหนักสัมพันธ์ของอวัยวะภายใน อวัยวะทั้งหมดถูกเก็บรักษาในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เนื้อเยื่อไขมันถูกฝังอยู่ในพาราฟินและถูกเตรียมไว้สำหรับการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ และใช้ haematoxylin และ eosin (H & E) ในการย้อมสี การตรวจพยาธิวิทยาของสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะถูกตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อประเมินความเป็นพิษทางจุลพยาธิวิทยาจะดำเนินการตาม (Kang et al., 2012).

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดถูกนำเสนอเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (mean ± SEM) ความแตกต่างระหว่างความสัมพันธ์ของแผ่นไขมันข้างตัว (epididymal fat pads) และน้ำหนักอวัยวะ (organ weight) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองได้รับการวิเคราะห์โดย ANOVA และ Tukey's HSD post hoc test ความแตกต่างระหว่างค่าโลหิตวิทยาและสารชีวเคมีในเลือดระหว่าง pre- และ post-treatment ถูกเปรียบเทียบโดย Paired student T-test และความแตกต่าง

ระหว่างกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดย ANCOVA ใช้ Tukey's HSD post-hoc test ตามลำดับ ค่า $p < 0.05$ ได้รับการพิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (Wang et al., 2012; Zhang et al., 2011)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารทดสอบสองตัวถูกประเมินโดยการคำนวณความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (Fractional Efficacy Concentration Index; FECCI) โดยดูว่าค่าความเข้มข้นของสารตัวนั้นภายหลังการผสมที่แสดงประสิทธิภาพเท่ากับหรือดีกว่ากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับสารนั้นเดี่ยวๆ ค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECCI) คำนวณจาก; สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร A (FEC of A) = ความเข้มข้นสาร A ที่แสดงประสิทธิภาพในสารผสม/ความเข้มข้นสาร A ที่แสดงประสิทธิภาพเมื่อใช้เดี่ยวๆ; สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร B (FEC of B) = ความเข้มข้นสาร B ที่แสดงประสิทธิภาพในสารผสม/ความเข้มข้นสาร B ที่แสดงประสิทธิภาพเมื่อใช้เดี่ยวๆ; ดังนั้น ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECCI) = สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร A (FEC of A) + สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร B (FEC of B) การแปลผลภายหลังการคำนวณ ถ้าได้ค่าความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECCI) < 1.0 แสดงว่าสารสองตัวนั้นแสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism); ถ้าได้ค่า FECCI = 1.0 แสดงว่าสารสองตัวนั้นไม่แสดงอันตรกิริยาต่อกัน (no interaction or zero-interaction); ถ้าได้ค่า FECCI > 1.0 แสดงว่าสารสองตัวนั้นออกฤทธิ์หักล้างกัน (antagonism) (Eumkeb et al., 2017; Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009).

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดลองในหลอดทดลอง

4.1.1 การวิเคราะห์พฤกษเคมีเบื้องต้น

สารสกัดเอทานอลของ *G. inodorum* ถูกทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง และถูกชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัด โดยเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่ได้คือ 17.43% (w/w) ผลการวิเคราะห์พฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัด *C. sinensis* และ *G. inodorum* พบว่าพืชทั้งสองชนิดมี flavonoids ในขณะที่สารสกัด *C. sinensis* พบว่ามี alkaloids, tannins และ saponin และสารสกัด *G. inodorum* พบว่ามี terpenoids และ glycoside, ในขณะที่ steroids ถูกพบว่าไม่มีในทั้งสองพืช (ตารางที่ 4.1) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC) ของสารสกัด *C. sinensis* และ *G. inodorum* เป็น 8.79 ± 2.46 mg CE/g ของน้ำหนักแห้ง และ 4.99 ± 0.63 mg CE/g ของน้ำหนักแห้ง, ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC) ของสารสกัด *C. sinensis* และ *G. inodorum* เป็น 0.14 ± 0.01 mg GAE/g ของน้ำหนักแห้ง และ 0.81 ± 0.01 mg GAE/g ของน้ำหนักแห้ง, ตามลำดับ สารออกฤทธิ์ในถั่งเช่าที่บริษัท CordyBiotech วิเคราะห์ด้วย HPLC ได้แก่ สารคอร์ไดซิปีน (cordycepin), สารอะดีโนซีน (adenosine), สารโพลีแซคคาไรด์ (cordyceps polysaccharide) (<http://www.cordybiotech.com/index.html>).

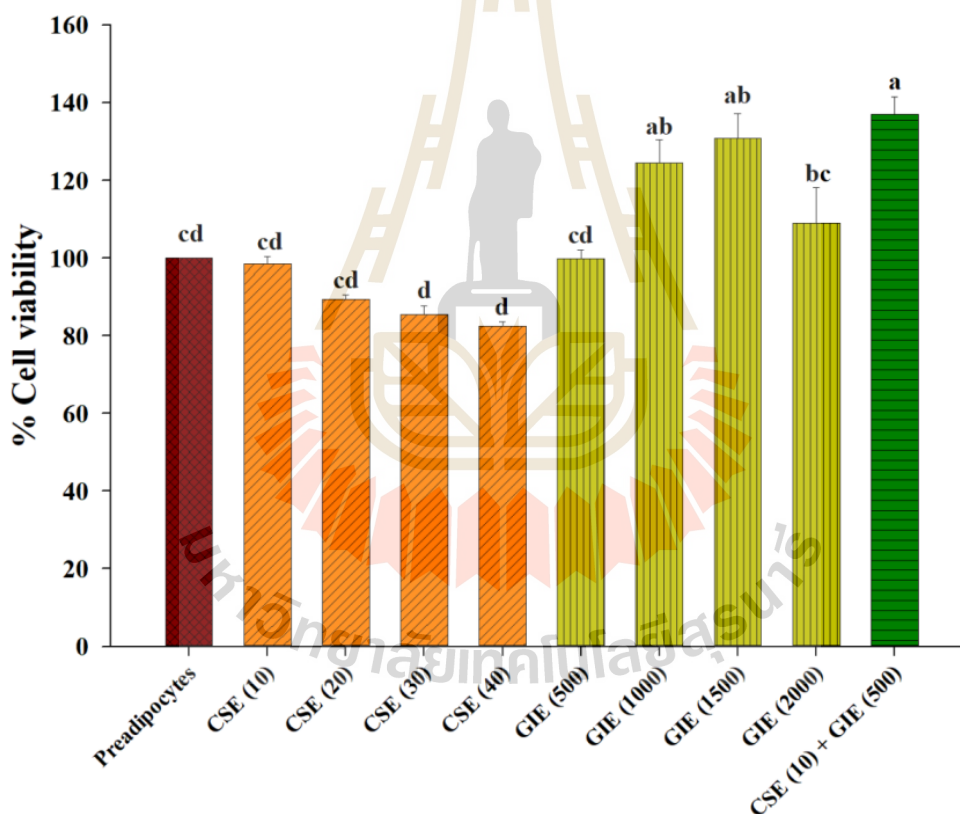
ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์พฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัด *C. sinensis* และ *G. inodorum*

Phytochemical compounds	<i>Cordyceps sinensis</i>	<i>Gymnema inodorum</i>
Alkaloids	+	-
Flavonoids	+	+
Tannins	+	-
Terpenoids	-	+
Saponin	+	-
Glycoside	-	+
Steroids	-	-

(+) = มี; (-) = ไม่มี

4.1.2 การวัดการอยู่รอดของเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes

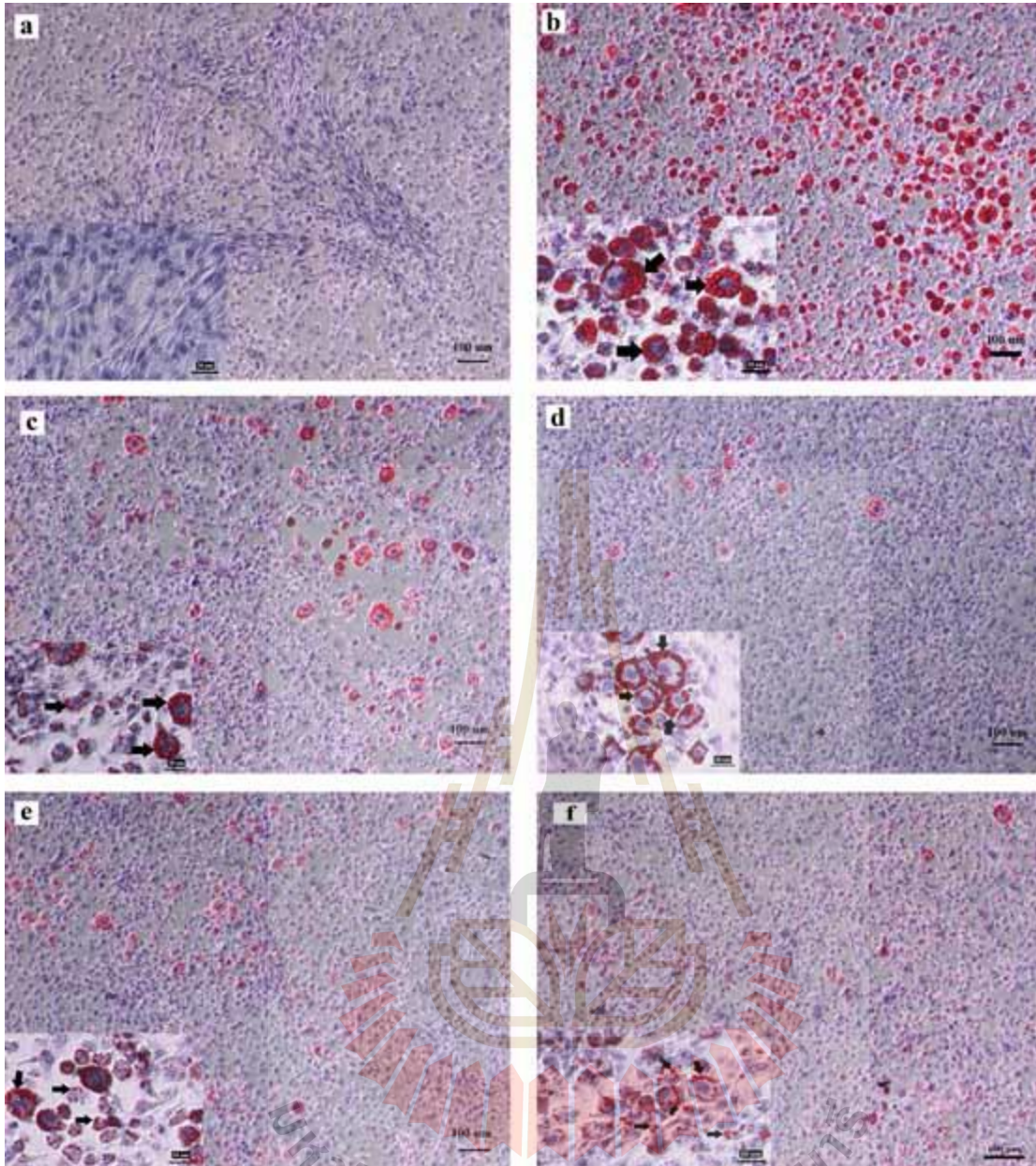
ผลของ CSE และ GIE ต่อเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes แสดงในรูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นสาเหตุการตาย 50% ของเซลล์ (50% Lethal Concentration (LC_{50})) ถูกคำนวณจากเส้นอัตราการตอบสนองของปริมาณ โดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น LC_{50} จากผลของ CSE และ GIE ต่อการดำเนินการเพิ่มจำนวนของเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes เป็น $112.23 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$ และ $2691.99 \pm 3.76 \mu\text{g/ml}$, ตามลำดับ ความอยู่รอดของเซลล์ 3T3-L1 พบว่า preadipocytes ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก CSE (10) – CSE (40) และ GIE (500) ($p < 0.05$) ในขณะที่ GIE (1000), GIE (1500) และ CSE (10) + GIE (500) มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก preadipocytes ($p < 0.05$) ดังนั้น ความเข้มข้นของ CSE (10), GIE (500) และ CSE (10) + GIE (500) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ 3T3-L1 จึงถูกเลือกสำหรับการทดลองต่อไป



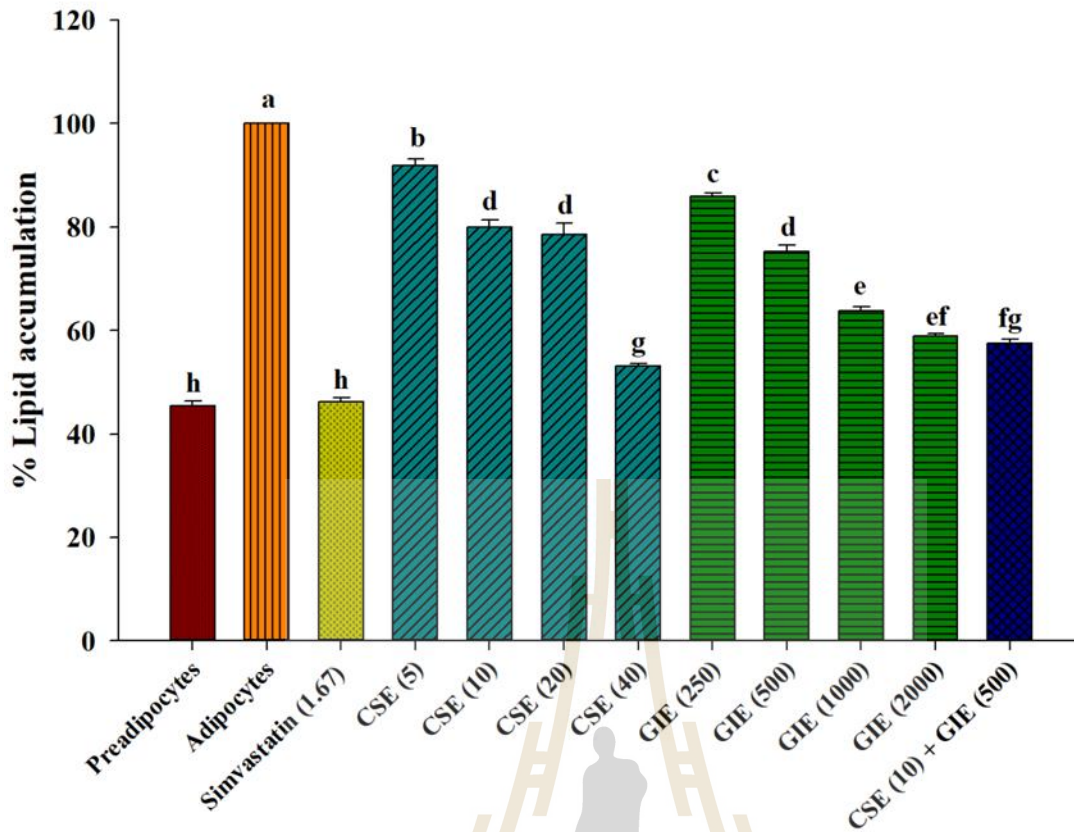
รูปที่ 4.1 ความอยู่รอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหนูเมาส์ 3T3-L1 ในหลอดทดลอง CSE = สารสกัด *C. sinensis*; GIE = สารสกัด *G. inodorum* ตัวเลขในวงเล็บคือความเข้มข้นของสารสกัด หน่วยที่ใช้วัดเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิตของการทดลองซ้ำสามครั้ง (Mean \pm SEM) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA โดยใช้ Tukey's HSD ($p < 0.05$).

4.1.3 ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผลสมกันของ CSE กับ GIE ต่อการสะสมไขมัน ระหว่างกระบวนการสร้างไขมันใน 3T3-L1 cells

ผลการศึกษาฤทธิ์ของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผลสมกันของ CSE (10) กับ GIE (500) ต่อการสะสมไขมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงจาก 3T3-L1 preadipocytes เป็น adipocytes ช่วง 10 วัน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ที่ถูกย้อมด้วย Oil Red O และ haematoxylin แสดงให้เห็นว่า CSE (10) – CSE (40), GIE (250) - GIE (2000) เมื่อใช้เดี่ยวๆ และผลสมกันของ CSE (10) กับ GIE (500) ลดปริมาณสะสมไขมันใน adipocytes ในระยะที่เจริญเต็มที่อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว (Untreated 3T3 adipocytes) ($p < 0.05$; รูปที่ 4.2) ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อวิเคราะห์ ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (Fractional Efficacy Concentration Index; FECCI) ที่ CSE (10) + GIE (500) พบว่า ความเข้มข้นสาร CSE ที่แสดงประสิทธิภาพในสารผสมเท่ากับ 10 และความเข้มข้นสาร CSE ที่แสดงประสิทธิภาพเมื่อใช้เดี่ยวๆ เท่ากับ 20 ดังนั้น สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร CSE (FEC of CSE) จึงเท่ากับ $10/20 = 0.50$ ส่วนความเข้มข้นสาร GIE ที่แสดงประสิทธิภาพในสารผสมเท่ากับ 500 และความเข้มข้นสาร GIE ที่แสดงประสิทธิภาพเมื่อใช้เดี่ยวๆ เท่ากับ 2000 ดังนั้น สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร GIE (FEC of GIE) จึงเท่ากับ $500/2000 = 0.25$ เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECCI) CSE + GIE จึงเท่ากับ $0.50 + 0.25 = 0.75$ ซึ่งมีค่า < 1.0 แสดงว่าสารสองตัวนี้แสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) นอกจากนั้นแล้วกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบทุกกลุ่มแสดงการลดลงของการสะสมไขมันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-3T3-L1 adipocyte cells ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.3) จากการคำนวณพบว่าการสะสมของไขมันภายในเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 54 ± 1.37 ในกลุ่มที่ได้รับยา simvastatin ขนาด 1.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-3T3-L1 adipocyte cells ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.3).



รูปที่ 4.2 ภาพแสดงไขมันภายในเซลล์หลังจากการย้อมด้วย Oil Red O และ haematoxylin ของ 6 กลุ่มตัวอย่างของ 3T3-L1 adipocytes ได้รับการทดสอบด้วย (a) 3T3-L1 preadipocytes, (b) untreated 3T3-L1 adipocytes, (c) 1.67 $\mu\text{g/ml}$ ของ simvastatin, (d) CSE ที่ 10 $\mu\text{g/ml}$, (e) GIE ที่ 500 $\mu\text{g/ml}$, และ (f) สารผสมของของ CSE 10 $\mu\text{g/ml}$ กับ GIE 500 $\mu\text{g/ml}$ (กำลังขยายภาพใหญ่ด้านหลังที่ 100 \times , scale bar; 100 μm และภาพเล็กที่แทรกที่ 400 \times , scale bar; 20 μm).



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงถึงผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อการสะสมไขมันภายในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes (%) หลังจากการย้อมด้วย Oil Red O; Preadipocytes = non-differentiated cells, Adipocytes = Differentiated 3T3-L1 adipocytes (untreated adipocytes), CSE = *C. sinensis* extract treated adipocytes, GIE = *G. inodorum* extract treated adipocytes, Simvastatin = Simvastatin treated adipocytes; จำนวนภายในวงเล็บคือความเข้มข้นของสารทดสอบ โดยหน่วยที่ใช้วัดเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำสามครั้ง (Mean \pm SEM) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างโดย Tukey's HSD ($p < 0.05$).

4.1.4 FTIR microspectroscopy

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy ถูกใช้ในการศึกษาทางชีวโมเลกุลในหลอดทดลอง (Mantsch et al., 1986) ในการศึกษาครั้งนี้ เทคนิค FTIR microspectroscopy ถูกนำมาใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes โดยกลุ่มทดสอบประกอบด้วย 3T3-L1 preadipocytes, untreated 3T3-L1 adipocytes, และเซลล์ 3T3-L1 adipocytes ที่ถูกทดสอบด้วย 1.67 $\mu\text{g/ml}$ simvastatin, 10 $\mu\text{g/ml}$ CSE, 500 $\mu\text{g/ml}$ GIE ผสมกับ CSE 10 $\mu\text{g/ml}$ ในวันที่ 10 หลังการเปลี่ยนแปลงของ

เซลล์ (นับจากวันเริ่มต้น) ค่าเฉลี่ย FTIR spectra ของตัวอย่างในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 3000^{-1} - 950 cm^{-1} แสดงในรูปที่ 4.4 ข้อมูลสเปกตรัมอินฟราเรดของเซลล์ 3T3-L1 ภายใต้งีเอ็มไอที่แตกต่างกันสามารถแบ่งได้เป็นสามช่วง; (1) ช่วงไขมัน (3000 - 2800 cm^{-1}), (2) ช่วงโปรตีน (1700 - 1500 cm^{-1}), (3) ช่วงของคาร์โบไฮเดรตและกรดนิวคลีอิก (1300 - 950 cm^{-1}) อย่างไรก็ตาม ช่วงของสเปกตรัมเหล่านี้ก็ยากที่จะสังเกตความแตกต่างระหว่างชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกันโดยการตรวจสอบข้อมูลดิบของสเปกตรัมเพียงอย่างเดียว เพื่อให้ได้ตำแหน่งพีคของแถบที่ชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น สเปกตรัมของข้อมูลดิบถูกใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้นในการทำกรวิเคราะห์อนุพันธ์ที่สอง (Second derivative) ในช่วงสเปกตรัม 3000 - 2800 cm^{-1} และ 1800 - 950 cm^{-1} โดยแสดงในรูปที่ 4.5a และ b, ตามลำดับ การกำหนดแถบของ IR spectra ของตัวอย่างได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.2 ความแตกต่างของสเปกตรัมยังพบได้ในช่วงหลักของไขมัน (3000 - 2800 cm^{-1}) โดยพีคมีความเข้มข้นสูงสุดที่ 2923 cm^{-1} และ 2854 cm^{-1} สอดคล้องกับ CH_2 asymmetric (ช่วงหลักของไขมัน, กับบางส่วนของโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, กรดนิวคลีอิก) และ ความถี่การยืดแบบสมมาตร (symmetric stretching frequency) (ส่วนใหญ่เป็นไขมัน, กับบางส่วนของโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, กรดนิวคลีอิก, ตามลำดับ) (Aksoy and Severcan, 2012) การเพิ่มขึ้นในความเข้มของสัญญาณและพื้นที่ของพีค (ที่ 2923 cm^{-1} และ 2854 cm^{-1}), ซึ่งสะท้อนให้เห็นสัดส่วนของ lipoproteins และมีส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและกรดนิวคลีอิกเล็กน้อยของ untreated adipocytes 3T3-L1 โดยมีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ (Figure 4.5a) (Dritsa, 2012; Garip et al., 2009; Krilov et al., 2009) $\text{C}=\text{O}$ stretching ของ lipid esters ของกลุ่ม untreated 3T3-L1 ที่ความยาวคลื่น 1735 cm^{-1} แสดงความเข้มของสัญญาณสูงสุดและแถบพื้นที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ (รูปที่ 4.5b) นอกจากนี้ ความเข้มของสัญญาณและพื้นที่ของพีคของกลุ่ม 3T3-L1 preadipocytes, simvastatin, CSE (10), และ CSE (10) + GIE (500)-treated 3T3-L1 adipocytes ที่ความยาวคลื่น 1157 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลมาจากการดูดกลืนพีคของการสั่นสะเทือนจาก $\text{C}-\text{O}$ จากไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ (Cao et al., 2013) พบว่าน้อยกว่ากลุ่ม untreated adipocytes 3T3-L1 อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.5b) ความเข้มของสัญญาณและพื้นที่ของพีคของกลุ่ม 3T3-L1 preadipocytes, simvastatin, GIE (500) และ CSE (10) + GIE (500)-treated 3T3-L1 adipocytes ที่ความยาวคลื่น 1650 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} , และ 1234 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลมาจากการดูดกลืนพีคของ protein amide I alpha-helix (ศูนย์กลางอยู่ที่ 1650 cm^{-1}), amide II (ศูนย์กลางอยู่ที่ 1542 cm^{-1}), และหมู่ฟังก์ชันของ PO_2 stretching mode ส่วนมากจากกรดนิวคลีอิกและบางส่วนของฟอสโฟลิปิด (ที่ 1234 cm^{-1}) ตามลำดับ มีค่ามากกว่ากลุ่ม untreated adipocytes 3T3-L1 (รูปที่ 4.5b) (Cao et al., 2013; Heraud et al., 2010).

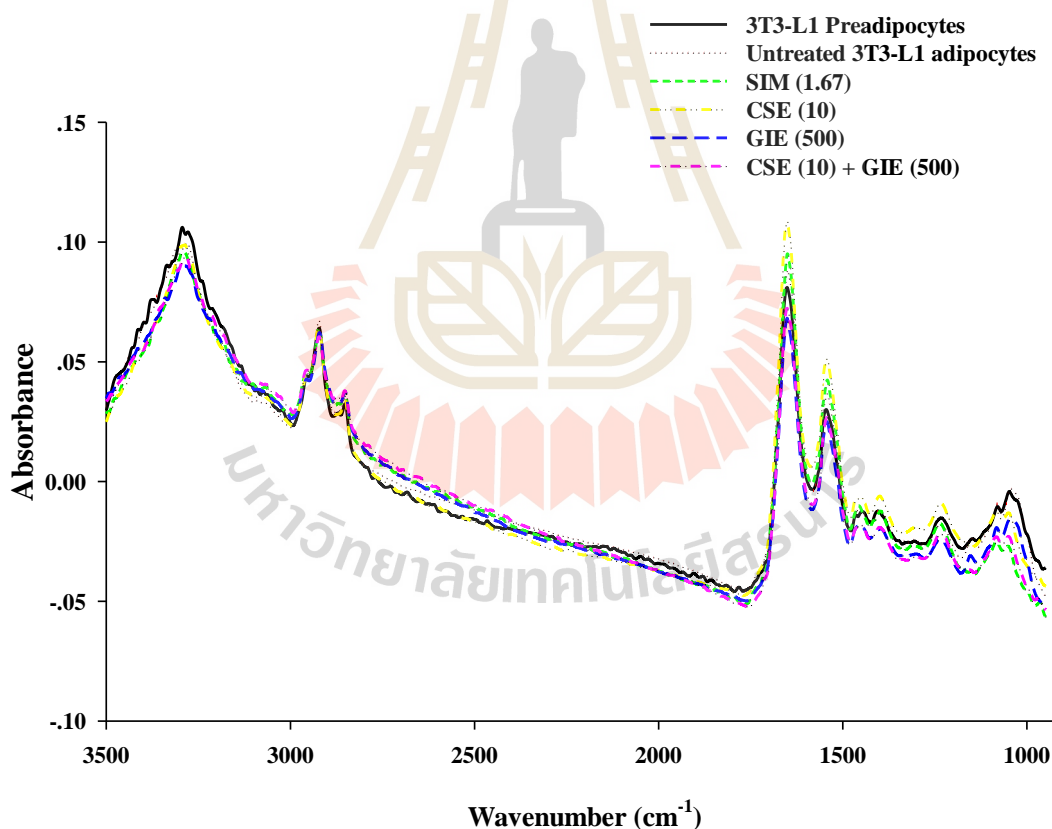
เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลของทุกกลุ่มการทดลอง 3T3-L1 preadipocytes, untreated, simvastatin, CSE (10), GIE (500) และ CSE (10) + GIE (500)-treated 3T3-L1 adipocytes คณะผู้วิจัยได้ทำการคำนวณพื้นที่ใต้พีคของแถบกรดนิวคลีอิก (1313 - 1294 cm^{-1} และ 1165 - 1142 cm^{-1}) แถบไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ (1255 - 1208 cm^{-1} , 1096 - 1073 cm^{-1} และ 1054 - 1000 cm^{-1}) และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีค

ของหลายหมู่ฟังก์ชันประกอบด้วย CH_2 ($2938\text{-}2907\text{ cm}^{-1}$)/ CH_3 ($2973\text{-}2954\text{ cm}^{-1}$) asymmetric stretching และ CH_2 asymmetric stretching ($2938\text{-}2907\text{ cm}^{-1}$)/amide I ($1673\text{-}1624\text{ cm}^{-1}$) ที่อยู่ในไขมันและโปรตีน (Baloglu et al., 2015) ผลการคำนวณพบว่าพื้นที่ใต้พีคของแถบไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ในกลุ่ม 3T3-L1 preadipocytes, simvastatin, CSE (10), GIE (500) และ CSE (10) + GIE (500) มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม untreated 3T3-L1 adipocytes อย่างมีนัยสำคัญกับ ($p < 0.05$; รูปที่ 4.6a) นอกจากนี้ พื้นที่ใต้พีคของกรดนิวคลีอิกในกลุ่ม GIE (500) สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$; รูปที่ 4.6a) นอกจากนี้ อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของ CH_2/CH_3 asymmetric stretching ที่สัมพันธ์กับปริมาณของโซ่ความยาวของ lipid acyl ของไขมัน (Baloglu et al., 2015) สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม untreated 3T3-L1 adipocytes เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆทั้งหมด ($p < 0.05$; รูปที่ 4.6b) การวิเคราะห์อื่นๆ พบว่า พื้นที่ใต้พีคของ CH_2 asymmetric stretching/amide I ในกลุ่ม 3T3-L1 preadipocytes, simvastatin, CSE (10), GIE (500), และ CSE (10) + GIE (500) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม untreated 3T3-L1 adipocytes ($p < 0.05$; รูปที่ 4.5b)

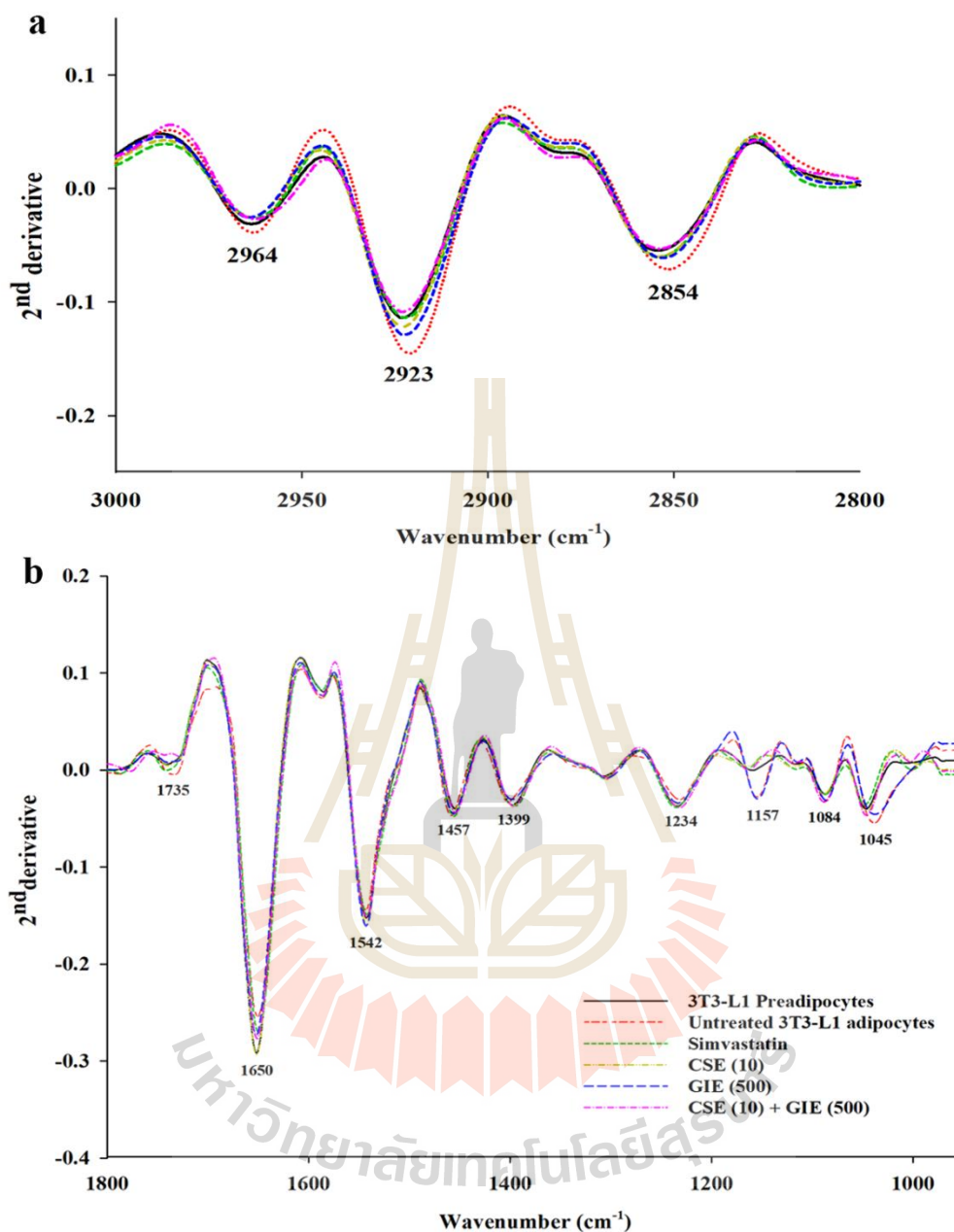
สเปกตรัมอนุพันธ์ที่สอง (The second derivative spectra) ของหกกกลุ่มที่แตกต่างกันของการทดลอง ถูกวิเคราะห์โดย Principal Component Analysis (PCA) การวิเคราะห์สเปกตรัมของ FTIR ได้กลายเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการกำหนดคุณสมบัติของสเปกตรัมของตัวอย่างทางชีววิทยาโดยให้ข้อมูลชีวโมเลกุลที่แตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของโมเลกุลที่สะท้อนโดยการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนของแถบในสเปกตรัมของ FTIR แถบการดูดกลืนใน molecular fingerprint-region ของ IR spectrum ใน mid-IR range ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) ได้มาจากพันธะเคมีแต่ละอันเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและรูปแบบ ลักษณะของโมเลกุลทางชีวภาพจาก FTIR spectra (Dunkhunthod et al., 2017) PCA เป็นวิธีการลดข้อมูลทางสถิติซึ่งจะแปลงชุดข้อมูลเดิมของตัวแปรให้เป็นชุดตัวแปรใหม่ที่ต้องแก้ไขซึ่งรู้จักกันในชื่อ PC, PCA ช่วยในการระบุว่าตัวเลขคลื่นใดในสเปกตรัม FTIR ที่ซับซ้อนมีความสำคัญสำหรับรูปแบบสเปกตรัมที่ใหญ่ที่สุดภายในตัวอย่าง การใช้การวิเคราะห์หลายตัวแปรโดยเฉพาะอย่างยิ่ง PCA ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล biospectroscopic ดังนั้นการสังเกตการจับกลุ่มของสเปกตรัมที่คล้ายกันภายในชุดข้อมูลและการระบุตัวแปร (แถบสเปกตรัมที่เป็นตัวแทนของกลุ่มโมเลกุลต่างๆภายในกลุ่มตัวอย่าง) สามารถสังเกตได้ การแบ่งกลุ่มสเปกตรัมที่แตกต่างกันของ 6 กลุ่มประชากรของเซลล์มีความชัดเจนมากที่สุดในการสร้างกราฟ 2 มิติ PC1 กับ PC2 จากแบบจำลอง PCA (รูปที่ 4.7a) PCA score plot แสดงให้เห็นว่ากลุ่มของ Untreated 3T3-L1 adipocytes และ GIE (500) แยกออกจากกลุ่ม Preadipocytes, simvastatin, CSE (10) เมื่อดูที่ PC1 (28%) ในทำนองเดียวกันกลุ่มของ untreated 3T3-L1 adipocytes และ simvastatin แยกจาก CSE (10) และ GIE (500) เมื่อดูที่ PC2 (22%) PCA loading plots (รูปที่ 4.7b) ถูกใช้เพื่อระบุขอบเขตของสเปกตรัมซึ่งส่วนใหญ่มีส่วนร่วมในการจัดกลุ่ม (รูปที่ 4.7a) การแยกแยะตาม PC1 สามารถอธิบายได้จาก positive loading ใน C-H stretching region (centred at 2834 cm^{-1}), C-O vibrations จาก ไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ (centred

at 1064 cm^{-1}), ซึ่งได้แยก negative score plot ของ spectra ของ 3T3-L1 preadipocytes, simvastatin, CSE จาก positive score plot ของ untreated 3T3-L1 adipocytes และ GIE ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า untreated 3T3-L1 adipocytes มีความจุของ lipoproteins, lipid acyl chain ของไขมันจากเมมเบรน และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ สูงกว่า 3T3-L1 preadipocytes, simvastatin, CSE (10) และสารผสมของ CSE (10) + GIE (500)

การแยกแยะตาม PC2 ระหว่าง positive score plot ของสเปกตรัมของ untreated 3T3-L1 adipocytes, simvastatin และ สารผสมของ CSE (10) + GIE (500) และ negative score plot ของสเปกตรัมของ 3T3-L1 preadipocytes, CSE และ GIE สามารถอธิบายได้โดย positive loading PC2 ใน C-H stretching region (centred ที่ 2935 cm^{-1}) และที่ 1662 cm^{-1} (ประกอบด้วย Amide I), ขณะที่ negative loading PC2 ใน C-H stretching region (centred ที่ 2915 cm^{-1} และ 2850 cm^{-1}) และที่ 1639 cm^{-1} (ประกอบด้วย Amide I)



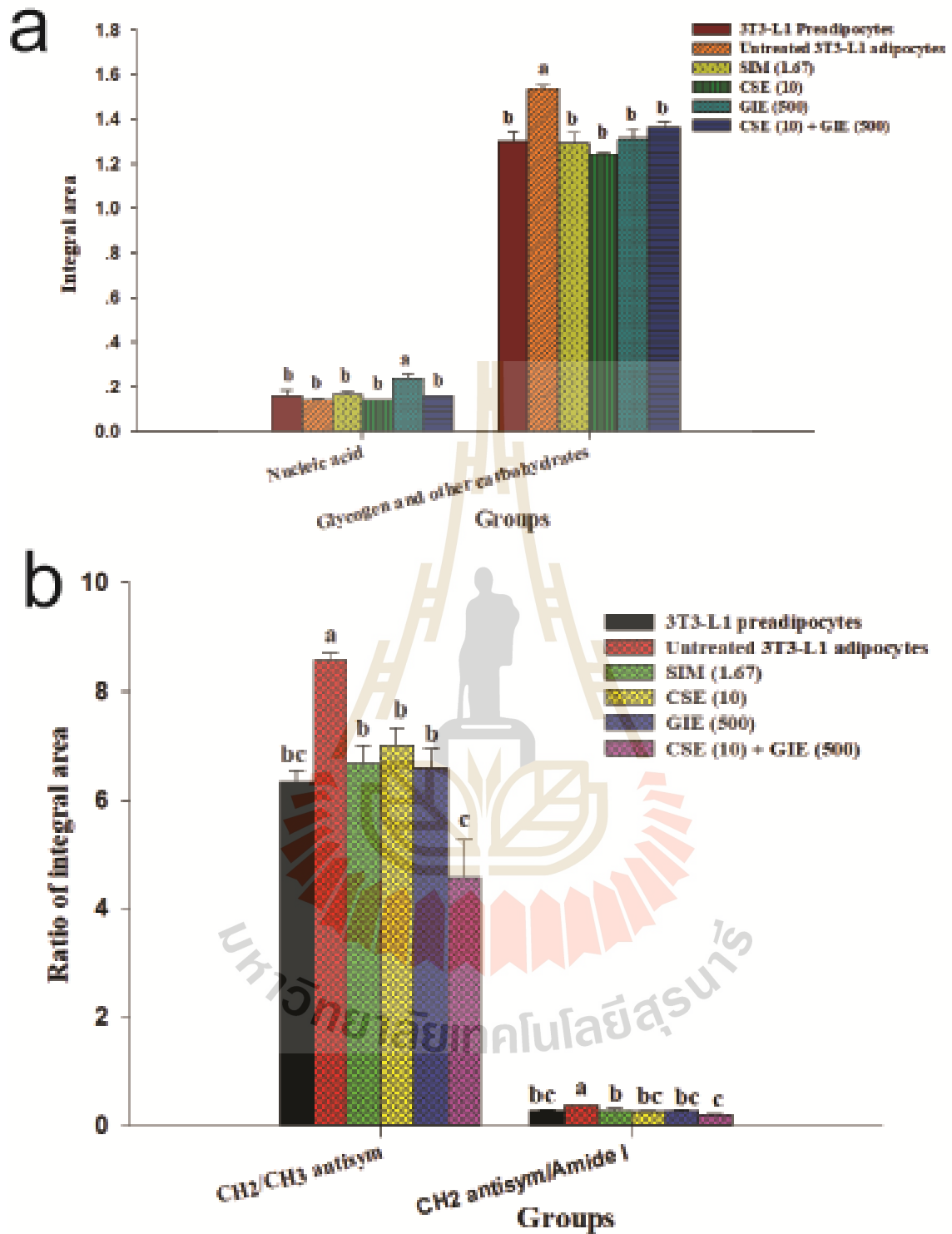
รูปที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของ FTIR spectra ในภาพรวม ($3000\text{--}950\text{ cm}^{-1}$) ได้จาก 3T3-L1 preadipocytes ($n = 41$), Untreated 3T3-L1 adipocytes ($n = 39$), และ 3T3-L1 adipocytes ที่ทดสอบด้วย simvastatin ที่ $1.67\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($n = 49$), CSE (10) = CSE ที่ $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($n = 98$), GIE (500) = GIE ที่ $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($n = 76$), และสารผสมของ CSE (10) กับ GIE (500) ($n = 97$) ในวันที่ 10 หลังจากการเจริญของเซลล์



รูปที่ 4.5 เกล็ดสเปกตรัมอนุพันธ์ทุติยภูมิของ 3T3-L1 preadipocytes, Untreated 3T3-L1 adipocytes, และ 3T3-L1 adipocytes ที่ได้รับ simvastatin ที่ 1.67 $\mu\text{g/ml}$, CSE (10) = CSE ที่ 10 $\mu\text{g/ml}$, GIE (500) = GIE ที่ 500 $\mu\text{g/ml}$, และสารผสมของ CSE (10) กับ GIE (500) ที่วันที่ 10 หลังจากการเจริญของเซลล์ ข้อมูลถูกแสดงในสองส่วน: (a) บริเวณไขมัน (3000–2800 cm^{-1}) และ (b) โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ (1800–950 cm^{-1})

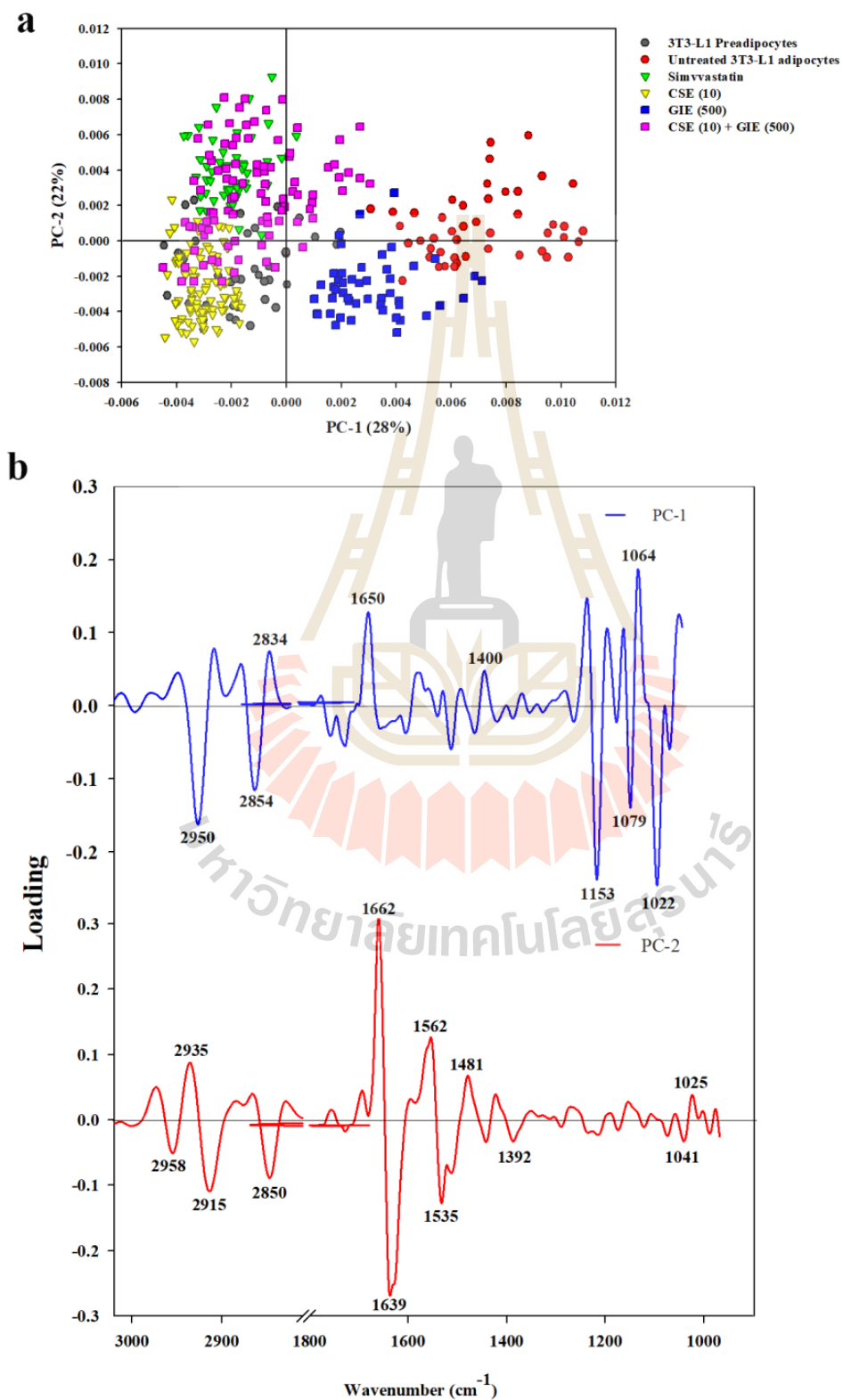
ตารางที่ 4.2 การกำหนดแถบความยาวคลื่นของ FTIR

แถบตำแหน่ง (cm ⁻¹)	การกำหนดแถบ 2nd derivative spectra
2964	CH ₃ asymmetric stretch เนื่องจาก methyl terminal ของ phospholipids เมมเบรน: ส่วนใหญ่คือไขมัน
2923	CH ₂ asymmetric stretch ของ methylene group ของ phospholipids เมมเบรน: ส่วนใหญ่คือไขมัน, มีส่วนร่วมจาก โปรตีนคาร์โบไฮเดรตกรดนิวคลีอิก
2854	CH ₂ symmetric stretching: ส่วนใหญ่คือไขมัน, มีส่วนร่วมจาก โปรตีนคาร์โบไฮเดรตกรดนิวคลีอิก
1735	C=O stretching vibrations ของไขมัน (triglycerides และ cholesterol esters)
1650	Amide I: C=O (80%) และ C-N (10%) stretching, N-H (10%) bending vibrations: proteins α -helix
1542	Amide II: N-H (60%) bending และ C-N (40%) stretching vibrations: proteins α -helix
1457	CH ₂ bending vibrations: ไขมันและโปรตีน
1399	COO-symmetric stretching และ CH ₃ bending vibrations: ไขมัน, โปรตีน
1234	PO ₂ -asymmetric stretching vibrations: RNA, DNA, และ phospholipids
1084	PO ₂ -symmetric stretching vibrations: RNA, DNA
1157	C-O vibrations จากไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ
1045	C-O vibrations จากไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ



รูปที่ 4.6 (a) กราฟแท่งของพื้นที่รวมของกรดนิวคลีอิก ไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ และ (b) อัตราส่วนพื้นที่รวม CH_2/CH_3 asymmetric stretching และ CH_2 asymmetric stretching/amide I ของ 3T3-L1 preadipocytes, Untreated 3T3-L1 adipocytes, และ 3T3-L1 adipocytes ที่ได้รับ simvastatin ที่ 1.67

$\mu\text{g/ml}$, CSE (10) = CSE ที่ $10 \mu\text{g/ml}$, GIE (500) = GIE ที่ $500 \mu\text{g/ml}$, และสารผสมของ CSE (10) กับ GIE (500) ที่วันที่ 10 หลังจากการเจริญของเซลล์ ข้อมูลจะแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean \pm SEM) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Tukey test, $p < 0.05$)

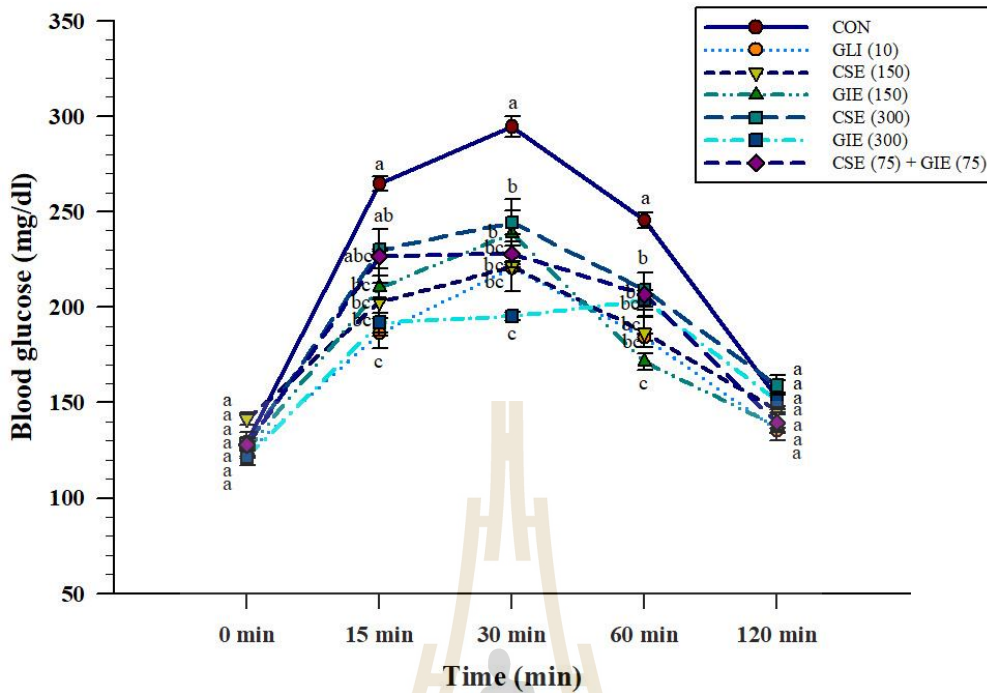


รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์ PCA ของ FTIR สเปกตรัมช่วง $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ และ $1800\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ ให้ PCA score plot (a) และ PCA loading plot (b); PCA score plots แสดงให้เห็นถึงการจัดกลุ่มที่แตกต่างกันระหว่าง 3T3-L1 preadipocytes, Untreated 3T3-L1 adipocytes, และ 3T3-L1 adipocytes ที่ได้รับ simvastatin ที่ $1.67\text{ }\mu\text{g/ml}$, CSE (10) = CSE ที่ $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, GIE (500) = GIE ที่ $500\text{ }\mu\text{g/ml}$, และสารผสมของ CSE (10) กับ GIE (500) ที่วันที่ 10 หลังจากการเจริญของเซลล์ PCA loading plots ระบุความแตกต่างของ biomarker ในช่วงสเปกตรัมของตัวอย่าง

4.2 การศึกษาในสัตว์ทดลอง

4.2.1 การทดสอบความทนทานต่อน้ำตาล Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

ผลของ CSE และ GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมต่อระดับน้ำตาลในเลือดในหนูปกติจะแสดงในรูปที่ 4.8 Glibenclamide 10 mg/kg BW ถูกใช้เป็นตัวควบคุมบวก ทุกกลุ่มที่ได้รับการสารทดสอบแสดงระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 15, 30 และ 60 นาทีหลังจากได้รับสารสกัด ($p < 0.05$) ในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม Glibenclamide ที่ 10 mg/kg BW , GIE ที่ 300 mg/kg BW , GIE ที่ 150 mg/kg BW , CSE ที่ 150 mg/kg BW เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบผสม ($p < 0.05$) หลังจากที่ย้อนสาร 15 นาทีที่เวลา 30 นาทีหลังการป้อน ระดับน้ำตาลในเลือดในทุกกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากหนูที่ได้รับ glibenclamide ยกเว้นกลุ่ม GIE ที่ได้รับปริมาณสูงสุด (300 mg/kg BW) มีการลดลงของระดับน้ำตาลต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ Glibenclamide อย่างมีนัยสำคัญ หลังจากได้รับสารสกัด 60 นาที พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบทุกกลุ่มยังคงลดลงมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ระดับความเข้มข้นของกลูโคสทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 120 นาที อย่างไรก็ตามสารผสมของ CSE ที่ 75 mg/kg BW กับ GIE at 75 mg/kg BW ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ CSE ที่ 300 mg/kg BW ในช่วงตลอดเวลาที่ทดสอบ

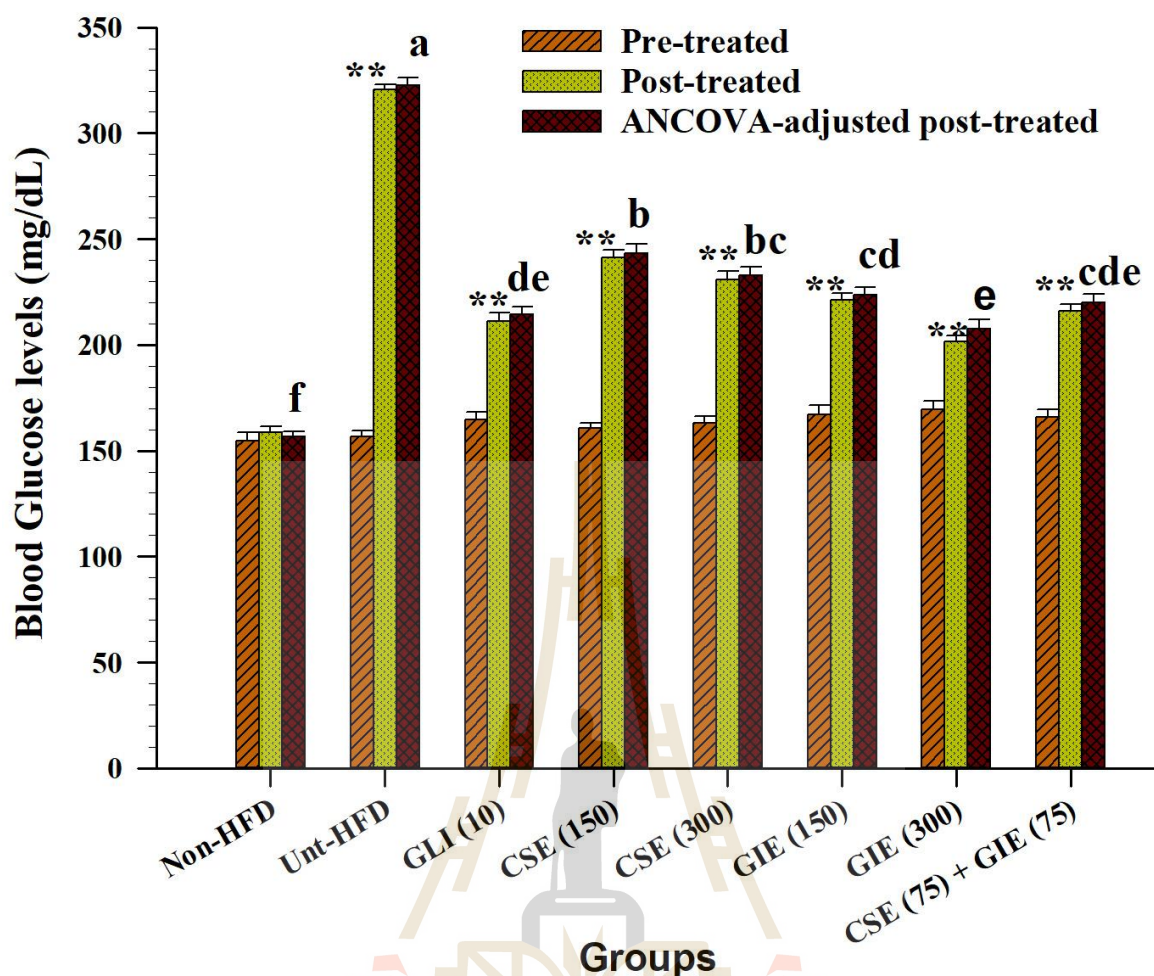


รูปที่ 4.8 การประเมินความทนทานต่อกลูโคส แสดงระดับน้ำตาลในเลือดตามเวลาที่ได้รับสารทดสอบ, ● Control group; ● Glibenclamide 10 mg/kg BW; ▼ *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW; ▲ *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW; ■ *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW; ■ *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW and ◆ สารผสม CSE 75 mg/kg BW ร่วมกับ GIE 75 mg/kg BW, OGTT ใช้เวลาในการอดอาหารข้ามคืนเพื่อการเก็บตัวอย่างเลือดและในที่สุด D-glucose 2 กรัม/กิโลกรัม และสารสกัดถูกป้อนทางปากเพื่อหาระดับกลูโคสที่ 0, 15, 30, 60 และ 120 นาที ข้อมูลที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean ± SEM) ($n = 7$), ตัวอักษรที่เวลาเดียวกันที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างของระดับกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$, Tukey's test).

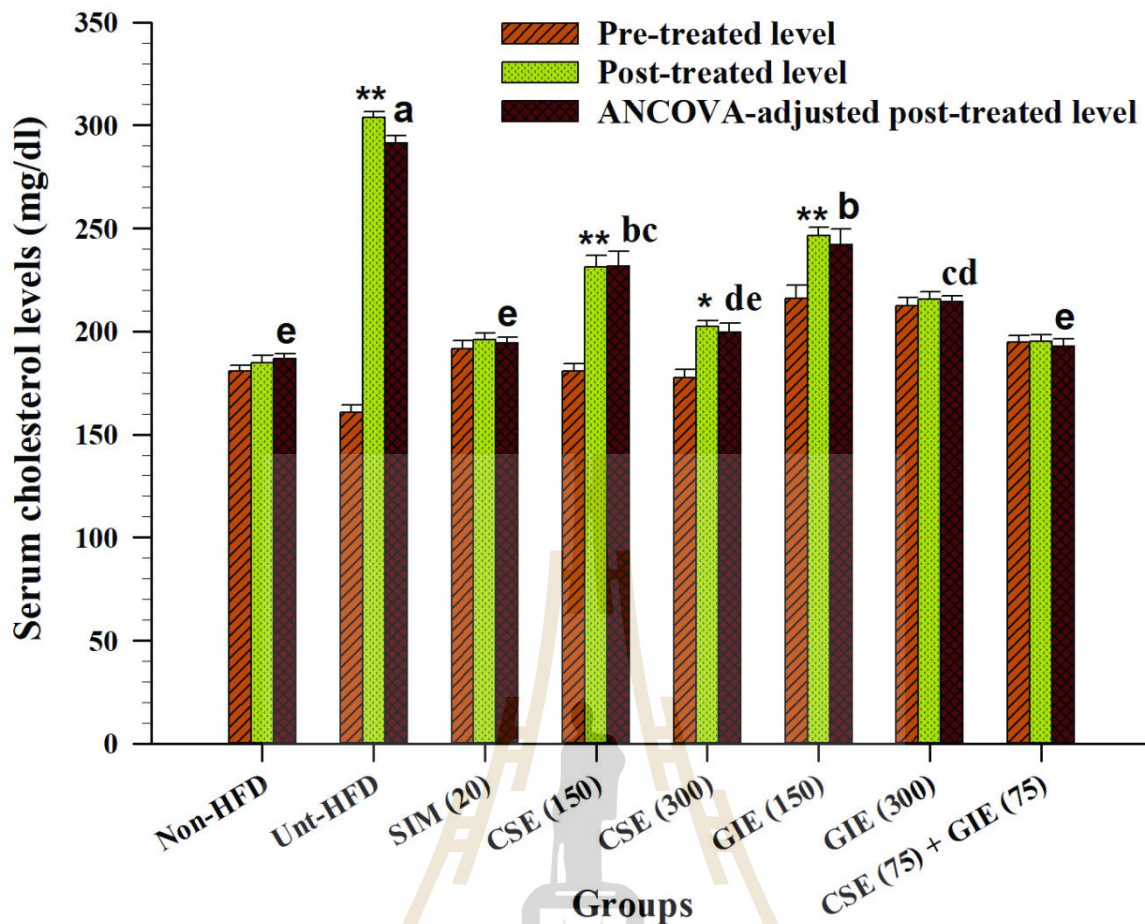
4.2.2 ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับน้ำตาลในเลือดและโปรไฟล์ไขมันในเลือดหนู

ในการตรวจสอบผลของ CSE และ GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับน้ำตาลในเลือดและโปรไฟล์ไขมันในหนูเมาส์เต็มวัยที่ให้อาหารปกติ, อาหารไขมันสูง (HFD), อาหารไขมันสูงร่วมกับ CSE 150 mg/kg BW/day (CSE (150)), CSE 300 mg/kg BW/day CSE (300)), GIE 150 mg/kg BW/day (GIE (150)), GIE 300 mg/kg BW/day (GIE (300)), สารผสมของ CSE 75 mg/kg BW/day กับ GIE 75 mg/kg BW/day (CSE (75) + GIE (75)), หรือ อาหารไขมันสูงร่วมกับ Glibenclamide 10 mg/kg BW/day หรือ simvastatin 20 mg/kg BW/day (SIM (20)) ผลการทดลองพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสาร

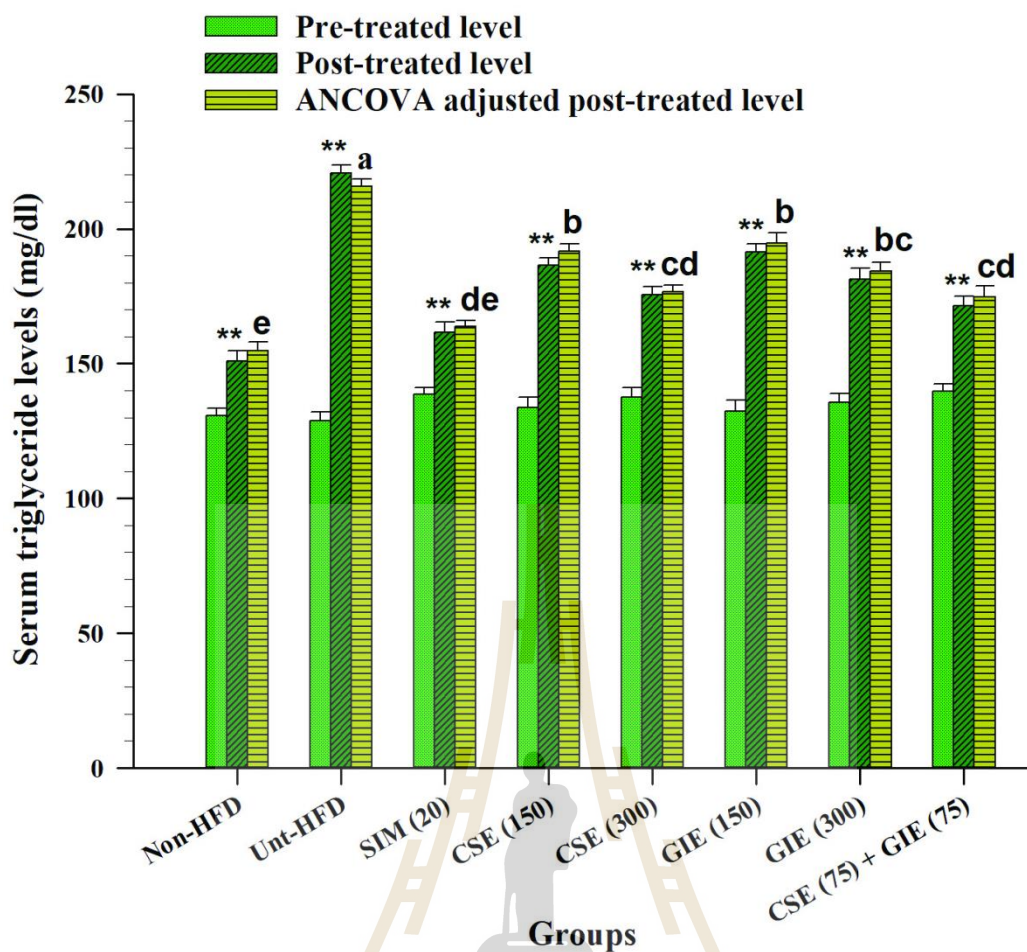
ทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD (Non-HFD) ($p < 0.05$; รูปที่ 4.9) เมื่อคำนวณสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร CSE (FEC of CSE) ได้เท่ากับ $75/300 = 0.25$ ในขณะที่สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร GIE (FEC of GIE) ได้เท่ากับ $75/150 = 0.50$ เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECI) CSE + GIE จึงเท่ากับ $0.25 + 0.50 = 0.75$ ซึ่งมีค่า < 1.0 แสดงว่าสารสองตัวนี้แสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ยิ่งไปกว่านั้นผลของสารสกัดต่อคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์และ LDL-cholesterol ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$; รูปที่ 4.10, 4.11, 4.12, ตามลำดับ) เมื่อเราวิเคราะห์ว่าการใช้สารผสมของ CSE และ GIE จะออกฤทธิ์เสริมกันหรือไม่ เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECI) ที่ CSE (75) + GIE (75) ต่อระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์และ LDL-cholesterol ในซีรัมพบว่า ความเข้มข้นสาร CSE และ GIE ที่แสดงประสิทธิภาพในสารผสมของทั้งสามพารามิเตอร์เท่ากับ 75 และ 75 ตามลำดับ CSE ที่แสดงประสิทธิภาพเมื่อใช้เดี่ยวๆ เท่ากับ 300 ดังนั้น สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร CSE (FEC of CSE) จึงเท่ากับ $75/300 = 0.25$ และความเข้มข้นสาร GIE ที่แสดงประสิทธิภาพเมื่อใช้เดี่ยวๆ เท่ากับ 300 ดังนั้น สัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสาร GIE (FEC of GIE) จึงเท่ากับ $75/300 = 0.25$ เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECI) CSE + GIE จึงเท่ากับ $0.25 + 0.25 = 0.50$ ซึ่งมีค่า < 1.0 แสดงว่าสารสองตัวนี้แสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) เมื่อวิเคราะห์ค่า HDL-cholesterol พบว่าระดับ HDL-cholesterol ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$; รูปที่ 4.13) นอกจากนั้นการได้รับสารผสมของ CSE (75) + GIE (75) ทำให้ระดับของ HDL-cholesterol ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ได้รับ CSE (150, 300) หรือ GIE (150, 300) เดี่ยวๆ แต่อย่างใด ($p > 0.05$)



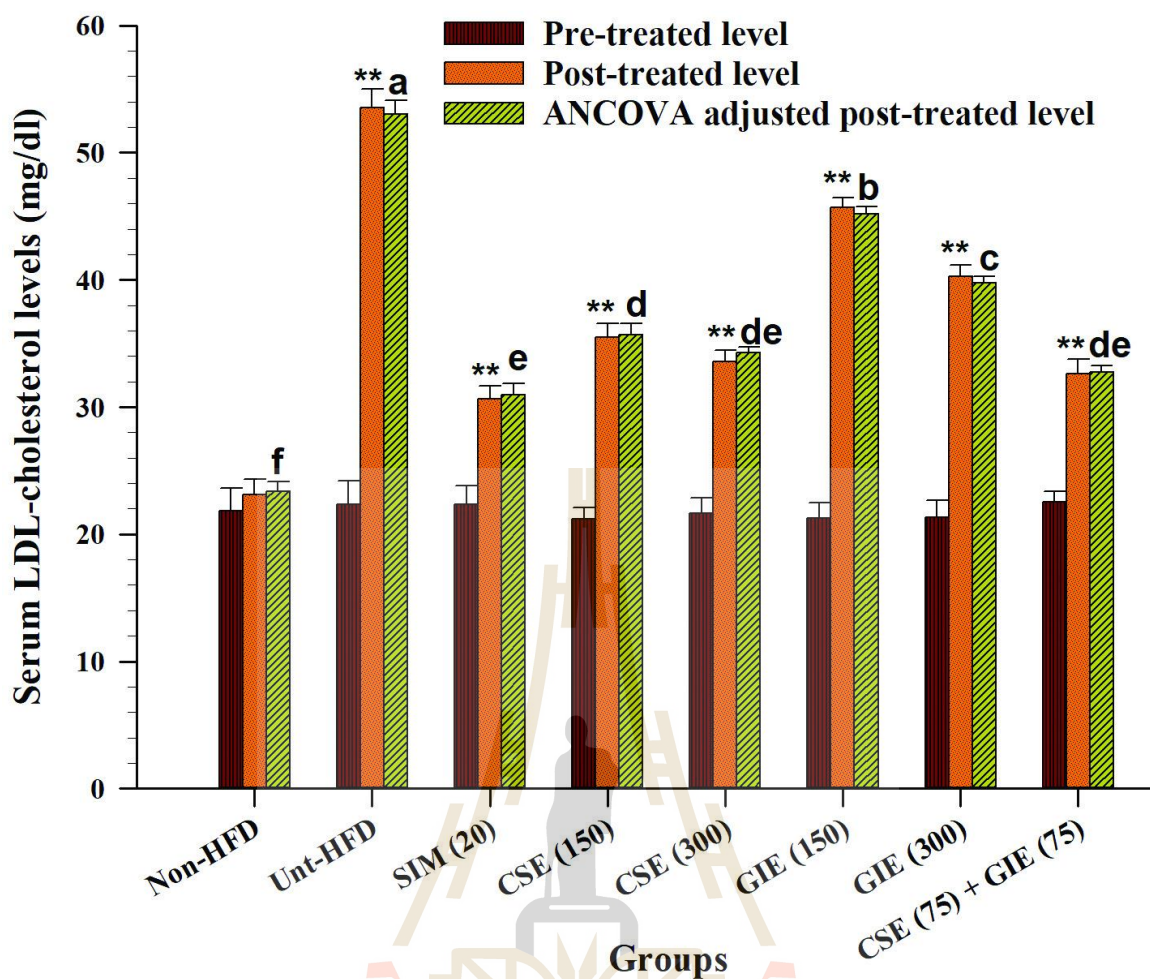
รูปที่ 4.9 ผลของ CES, GIE เดี่ยวๆ และผสม ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูไมซ์; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group ที่ไม่ได้รับสาร; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = สารผสม *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $** p < 0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$.



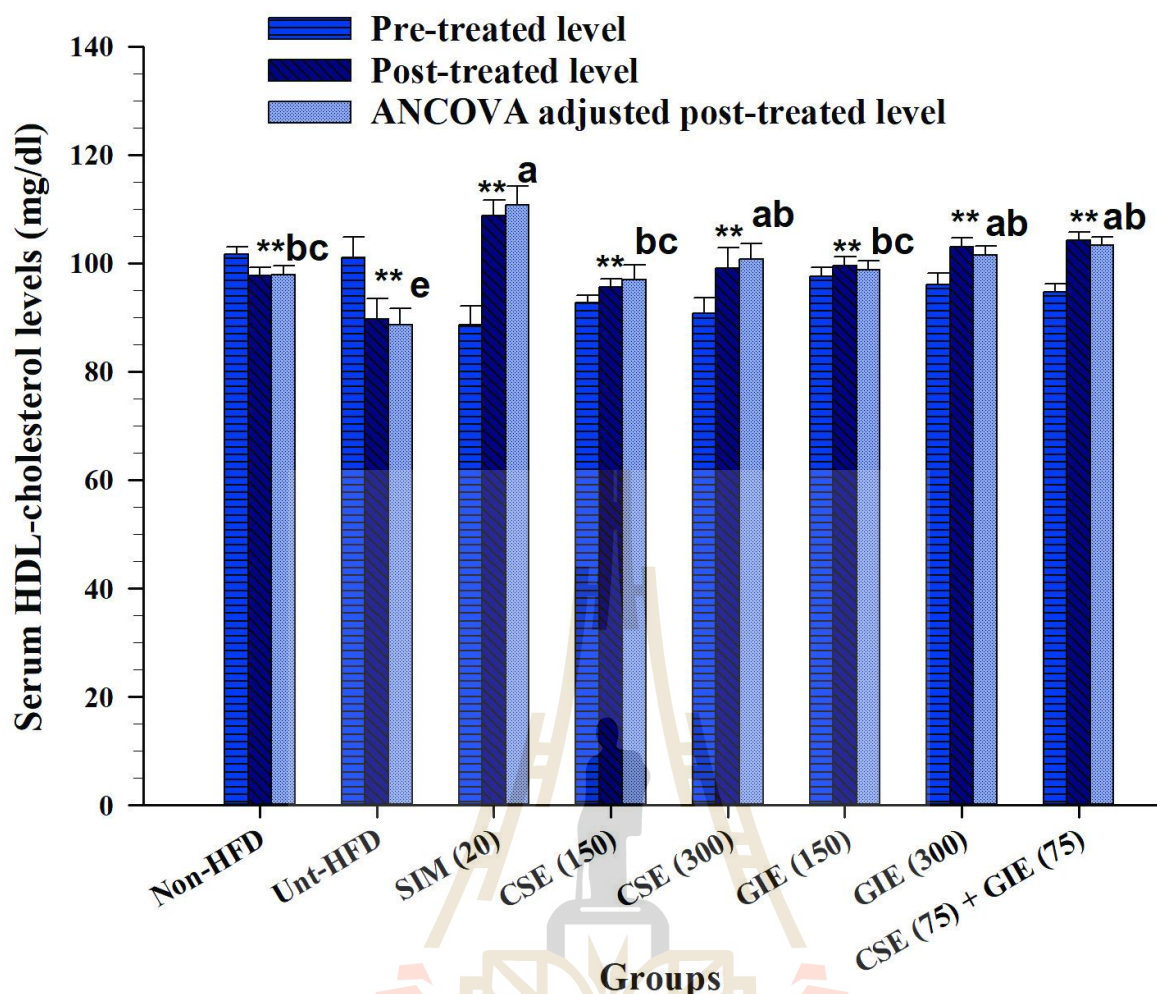
รูปที่ 4.10 ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของหนูไม่ซ้; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day ผสมกับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม โดย ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$.



รูปที่ 4.11 ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูไม่ซ้; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day ผสมกับ *G. inodorum*-extract 75 mg/kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $** p < 0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$.



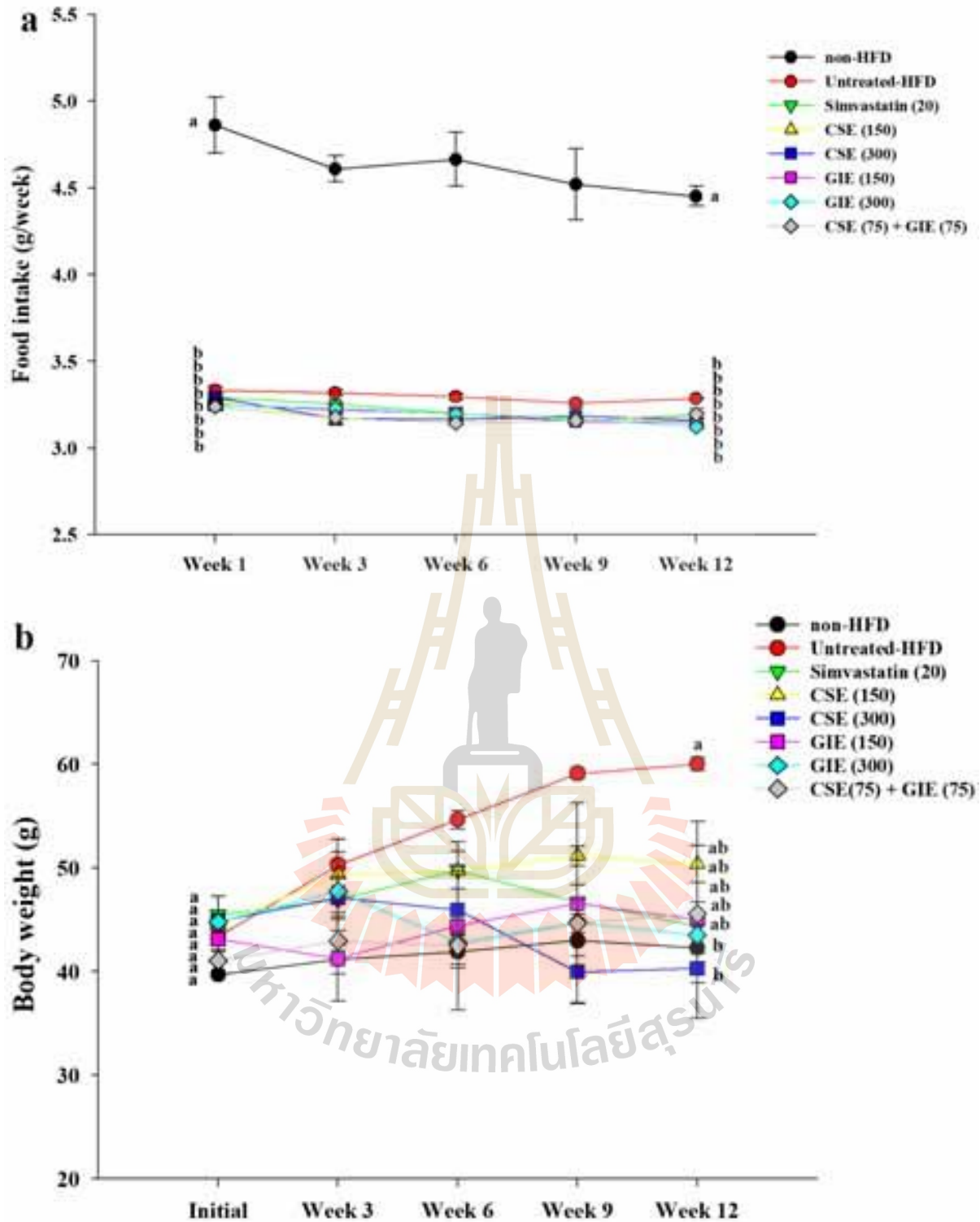
รูปที่ 4.12 ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับ LDL-cholesterol ในเลือดของหนูไมซ์; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day ผสมกับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $p < 0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม โดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$.



รูปที่ 4.13 ผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือผสมกันต่อระดับ HDL-cholesterol ในเลือดของหนูไมซ์; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day ผสมกับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $p < 0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$.

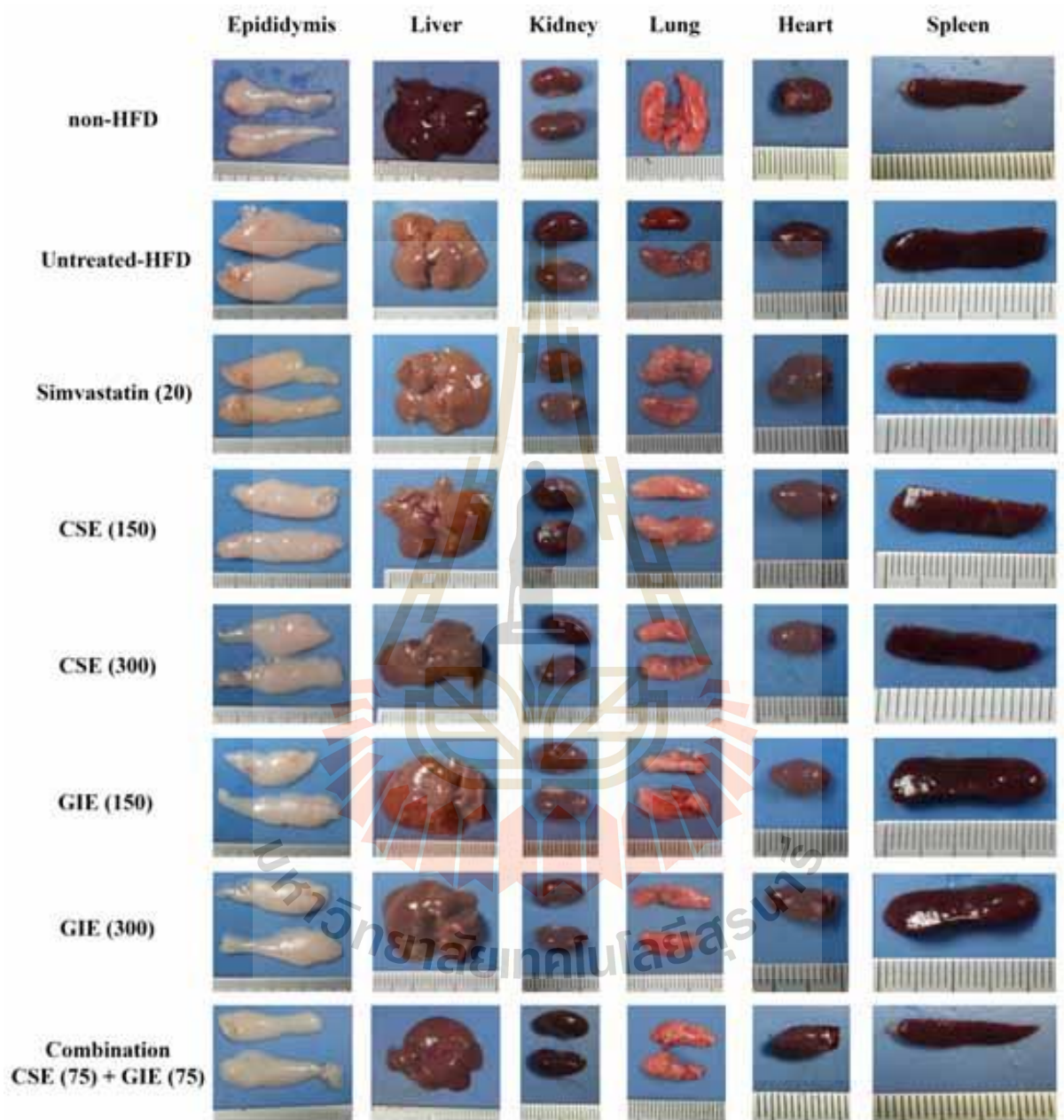
4.2.3 ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อการบริโภคอาหาร น้ำหนักตัว และน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้อง

รูปที่ 4.14 แสดงผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อปริมาณอาหาร (a) และน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของหนูในกลุ่มให้อาหารที่แตกต่างกัน (b) ผลการทดลองพบว่าปริมาณอาหารที่บริโภคในทุกกลุ่มที่ได้รับ HFD ทั้งไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated-HFD) และได้รับสารทดสอบ (treated-HFD) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (non-HFD) ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม HFD ที่ได้รับสารทดสอบทุกกลุ่ม ($p > 0.05$; รูป 4.14a) ผลของอาหารและสารที่ได้รับต่อน้ำหนักตัวได้แสดงในรูปที่ 4.14b หลังจากช่วงกินอาหาร 12 สัปดาห์น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกลุ่มที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated-HFD) มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ HFD (non-HFD) และกลุ่ม CSE (300) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ HFD และสารทดสอบทุกกลุ่มที่เหลือทั้งหมดอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$; รูปที่ 4.14b) ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันอน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ของหนูแสดงไว้ในตารางที่ 4.3 พบว่ากลุ่ม non-HFD, simvastatin, CSE (150), และ สารผสม CSE (75) กับ GIE (75) แสดงน้ำหนักของ epididymis adipose tissue ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) นอกจากนั้นแล้วน้ำหนักสัมพันธ์ของตับ, หัวใจ, ไต, ปอด และม้าม ของกลุ่ม untreated-HFD, simvastatin, CSE, GIE, และสารผสม CSE กับ GIE ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม non-HFD ($p > 0.05$) ภาพของอวัยวะภายในที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เนื้อเยื่อไขมันจากหน้าท้อง, ตับ, หัวใจ, ไต, ปอดและม้ามของหนูได้แสดงในรูปที่ 4.15 ทุกกลุ่มมีลักษณะปกติเมื่อเทียบกับอวัยวะเดียวกันจากกลุ่ม non-HFD จากภาพจะเห็นว่า ขนาดของ epididymis adipose tissue ในกลุ่ม untreated-HFD มีขนาดใหญ่กว่าทุกๆ กลุ่มที่เหลือ ซึ่งข้อมูลนี้สอดคล้องกับผลในตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.14 ปริมาณอาหารและน้ำหนักตัว (a); ปริมาณอาหาร (b); น้ำหนักตัว ● non-HFD; ● Untreated-HFD; ▼ Simvastatin 20 mg/kg BW/day; ▲ *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; ■ *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; ■ *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; ◆ *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day; ◇ CSE 75 mg/kg BW ผสม GIE 75 mg/kg BW ข้อมูลแสดงเป็น

ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean \pm SEM) ($n = 7$) ตัวอักษรที่อยู่ในสัปดาห์เดียวกันที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์โดยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.15 ภาพของอวัยวะภายในที่เกี่ยวข้องของหนูที่ได้รับ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกัน Simvastatin 20 mg/kg BW/day; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract

300 mg/kg BW/day; Combination CSE (75) + GIE (75) = สารผสมของ *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

กลุ่ม	น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (กรัม/100 กรัม น้ำหนักตัว)					
	Epididymis	ตับ	หัวใจ	ไต	ปอด	ม้าม
non-HFD	3.41 ± 0.52 ^b	4.18 ± 0.08 ^a	0.42 ± 0.07 ^a	1.72 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.07 ^a	0.37 ± 0.06 ^a
HFD	5.37 ± 0.33 ^a	4.15 ± 0.12 ^a	0.45 ± 0.06 ^a	1.43 ± 0.13 ^a	0.46 ± 0.03 ^a	0.45 ± 0.01 ^a
SIM (20)	3.66 ± 0.41 ^b	4.16 ± 0.10 ^a	0.49 ± 0.06 ^a	1.54 ± 0.19 ^a	0.60 ± 0.04 ^a	0.43 ± 0.17 ^a
CSE (150)	3.56 ± 0.58 ^b	3.60 ± 0.75 ^a	0.42 ± 0.03 ^a	1.34 ± 0.16 ^a	0.43 ± 0.06 ^a	0.49 ± 0.14 ^a
CSE (300)	4.03 ± 0.28 ^{ab}	3.63 ± 0.14 ^a	0.50 ± 0.04 ^a	1.72 ± 0.19 ^a	0.63 ± 0.17 ^a	0.40 ± 0.17 ^a
GIE (150)	4.23 ± 0.48 ^{ab}	3.72 ± 0.20 ^a	0.51 ± 0.11 ^a	1.48 ± 0.35 ^a	0.51 ± 0.08 ^a	0.44 ± 0.03 ^a
GIE (300)	3.86 ± 1.06 ^{ab}	3.67 ± 0.26 ^a	0.49 ± 0.08 ^a	1.43 ± 0.16 ^a	0.59 ± 0.15 ^a	0.53 ± 0.07 ^a
Combination	3.61 ± 0.25 ^b	3.56 ± 0.30 ^a	0.42 ± 0.03 ^a	1.42 ± 0.16 ^a	0.56 ± 0.05 ^a	0.34 ± 0.02 ^a

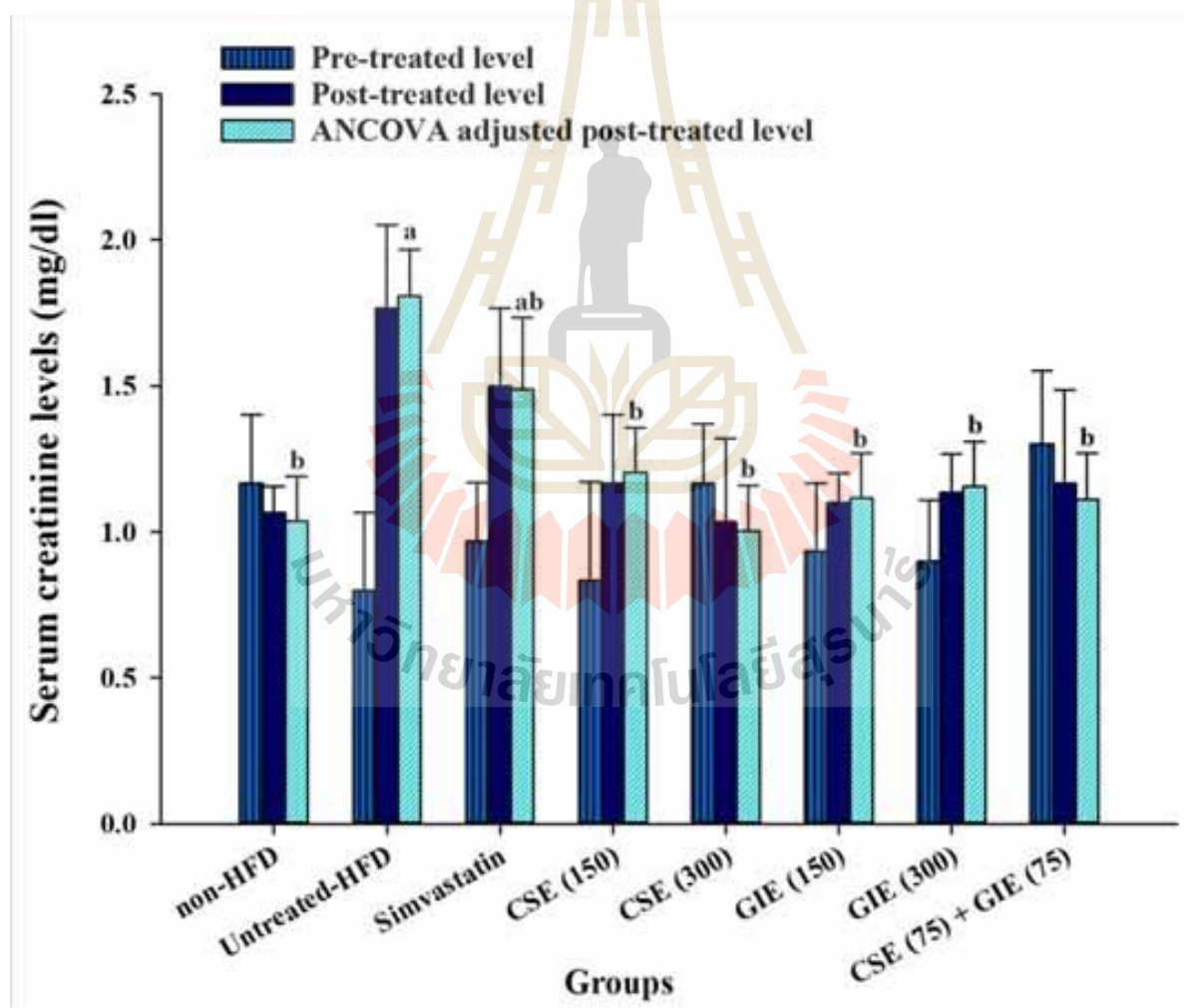
ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean ± SEM) (n = 7) ความหมายตัวย่อ non-HFD = Normal control; HFD = Untreated-HFD; SIM (20) = Simvastatin 20 mg/kg BW/day; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day; Combination = สารผสมของ CSE 75 mg/kg BW/day กับ GIE 75 mg/kg BW/day. ตัวอักษรที่อยู่ในอวัยวะเดียวกันที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์โดยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD ($p < 0.05$)

4.2.4 พารามิเตอร์ทางชีวเคมีในซีรัม

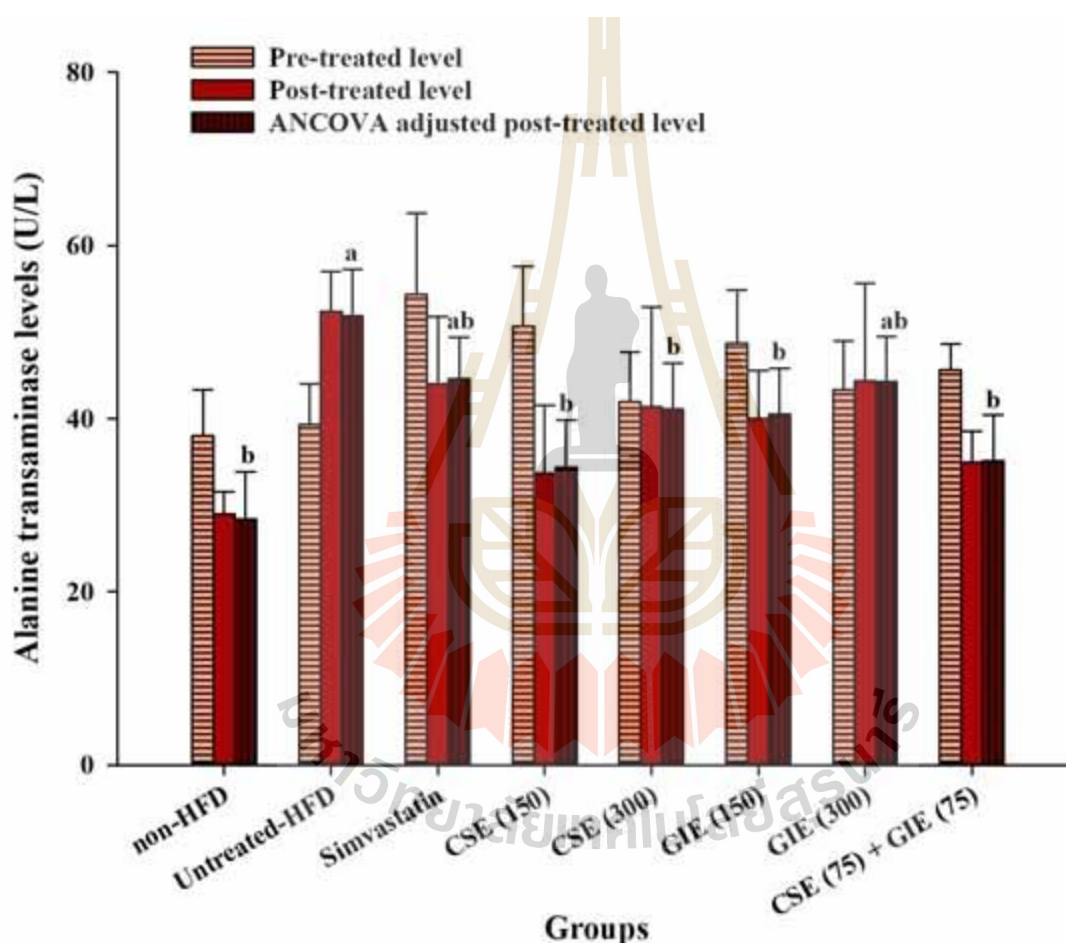
พารามิเตอร์ทางชีวเคมีในซีรัมของ non-HFD, untreated-HFD และ HFD-treated with CSE, GIE เดี่ยวๆ หรือสารผสม CSE กับ GIE พบว่าระดับครีเอทีนินในซีรัมของกลุ่ม non-HFD มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับ HFD ทั้งหมดที่ได้รับสารทดสอบมีระดับครีเอทีนินในซีรัมไม่แตกต่างจากกลุ่ม non-HFD ($p > 0.05$; รูปที่ 4.16) ผลการศึกษานี้แสดงว่า CSE, GIE เดี่ยวๆ หรือสารผสม CSE กับ GIE ไม่แสดงความเป็นพิษต่อไต นอกจากนั้นแล้วระดับ alanine transaminase (ALT) ในเลือด และระดับ alkaline phosphatase (ALP) ในเลือด ในกลุ่ม untreated-HFD มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม non-HFD ($p < 0.05$; รูปที่ 4.17 และ 4.18) นอกจากนี้ระดับ ALT

ของกลุ่ม untreated-HFD สูงกว่าทุกกลุ่มที่ได้รับ HFD และ สารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยกเว้น กลุ่มที่ได้รับ simvastatin หรือ GIE (300) จากผลของ ALT แสดงให้เห็นว่า CSE (150), GIE (150) และ CSE (75) และ GIE (75) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อตับ

การนับเม็ดเลือด (Complete Blood Count; CBC) เป็นพารามิเตอร์การวินิจฉัยที่แพร่หลายมากที่สุดในการดูแลทางคลินิกและมีการวิเคราะห์เป็นประจำเพื่อประเมินสุขภาพของผู้ป่วย โดยทั่วไปการทดสอบ CBC จะให้ข้อมูลที่สำคัญเกี่ยวกับเซลล์หลักสามชนิดในเลือดคือการนับเม็ดเลือดแดง (RBC count), การนับเม็ดเลือดขาว (WBC count) และเกล็ดเลือด (Platelets) ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ RBC, WBC, และ Platelets ในกลุ่ม non-HFD พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ได้รับ HFD ทั้งไม่ได้รับสารทดสอบและได้รับสารทดสอบทั้งหมด ($p > 0.05$) (รูปที่ 4.19, 4.20 และ 4.21) ผลการทดลองบ่งชี้ว่า CSE, GIE ทั้งเดี่ยวๆและผสมไม่ทำให้ CBC ผิดปกติ

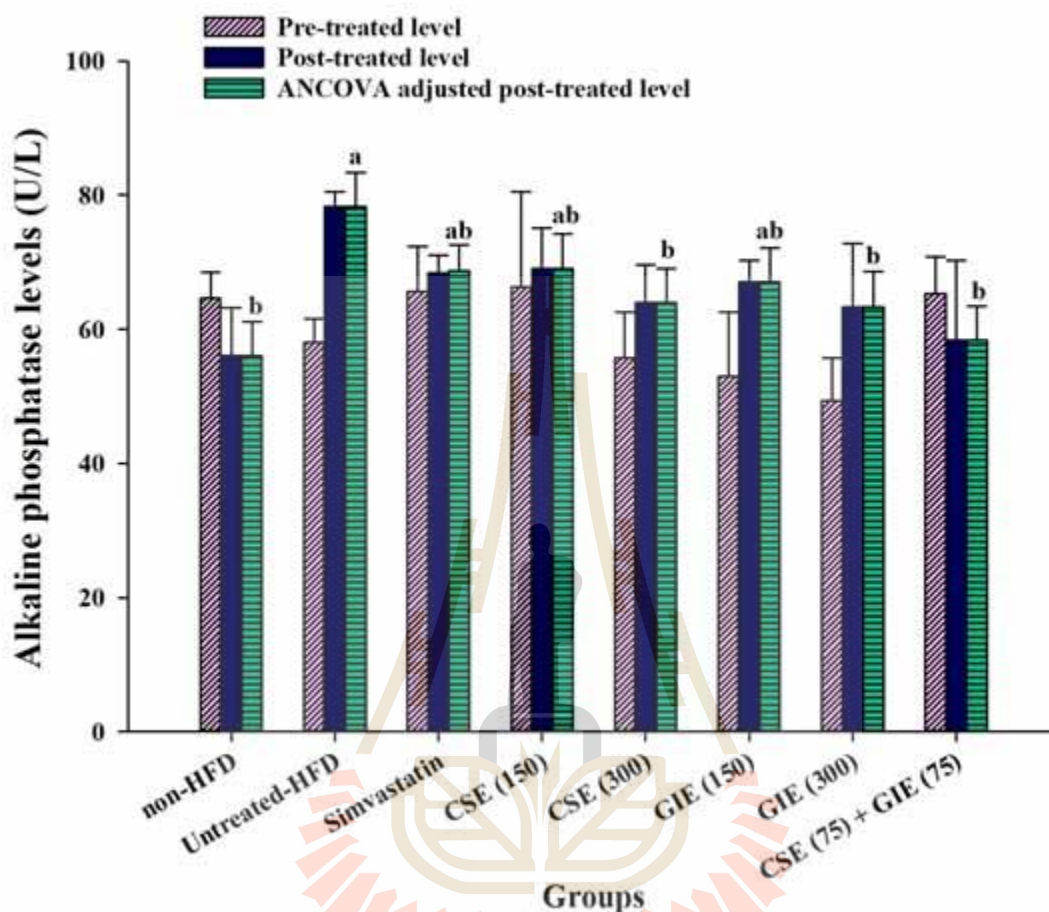


รูปที่ 4.16 ผลของ CSE, GIE, เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ creatinine ในซีรัม; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group ที่ไม่ได้รับสาร; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = สารผสม *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มจากการวิเคราะห์โดย ANCOVA โดยทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD post hoc test ที่ $p < 0.05$.

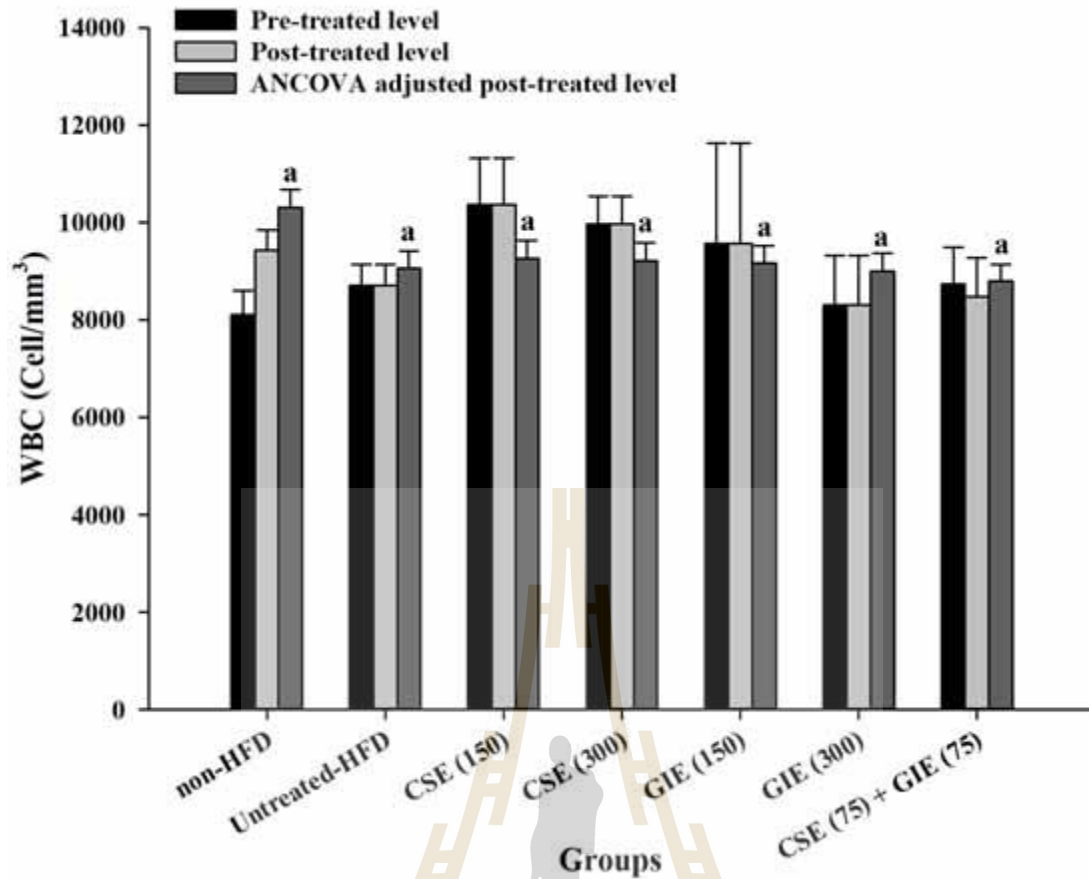


รูปที่ 4.17 ผลของ CSE, GIE, เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ ALT ในซีรัม; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group ที่ไม่ได้รับสาร; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = สารผสม *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ตัวอักษรที่แตกต่าง

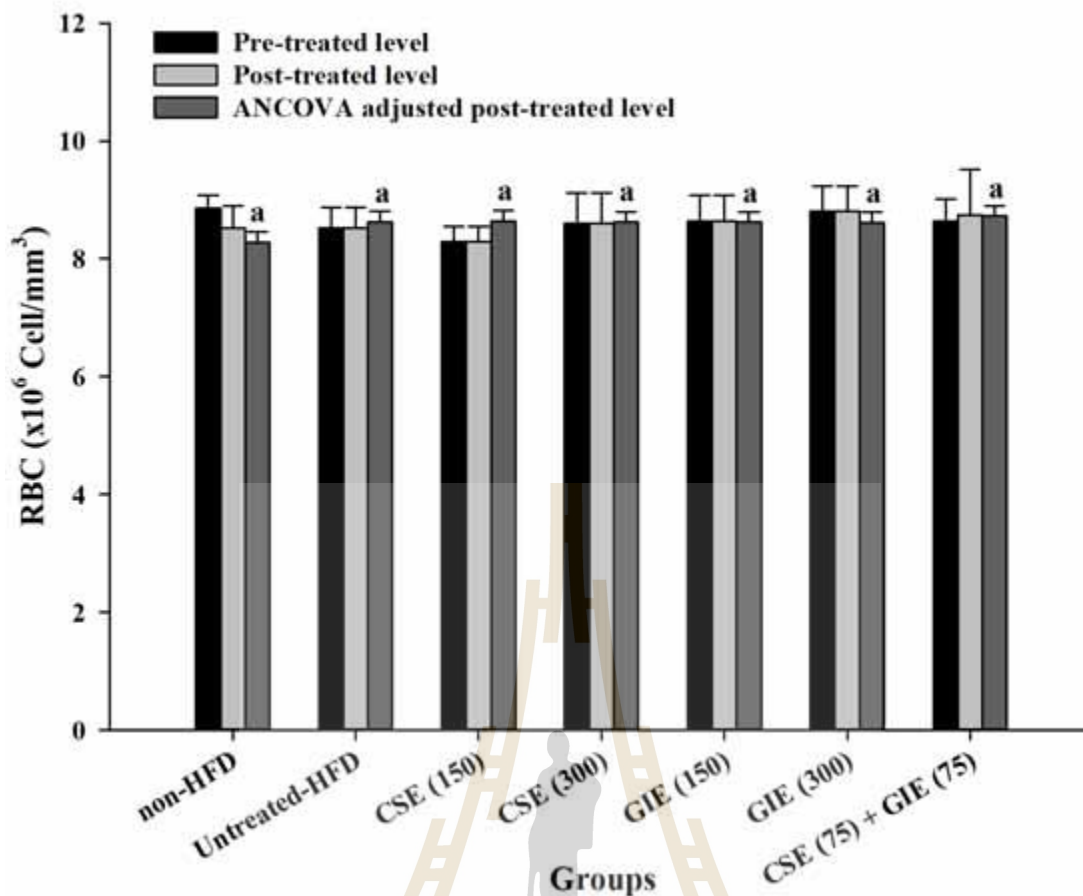
กันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มจากการวิเคราะห์โดย ANCOVA โดยทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD post hoc test ที่ $p < 0.05$.



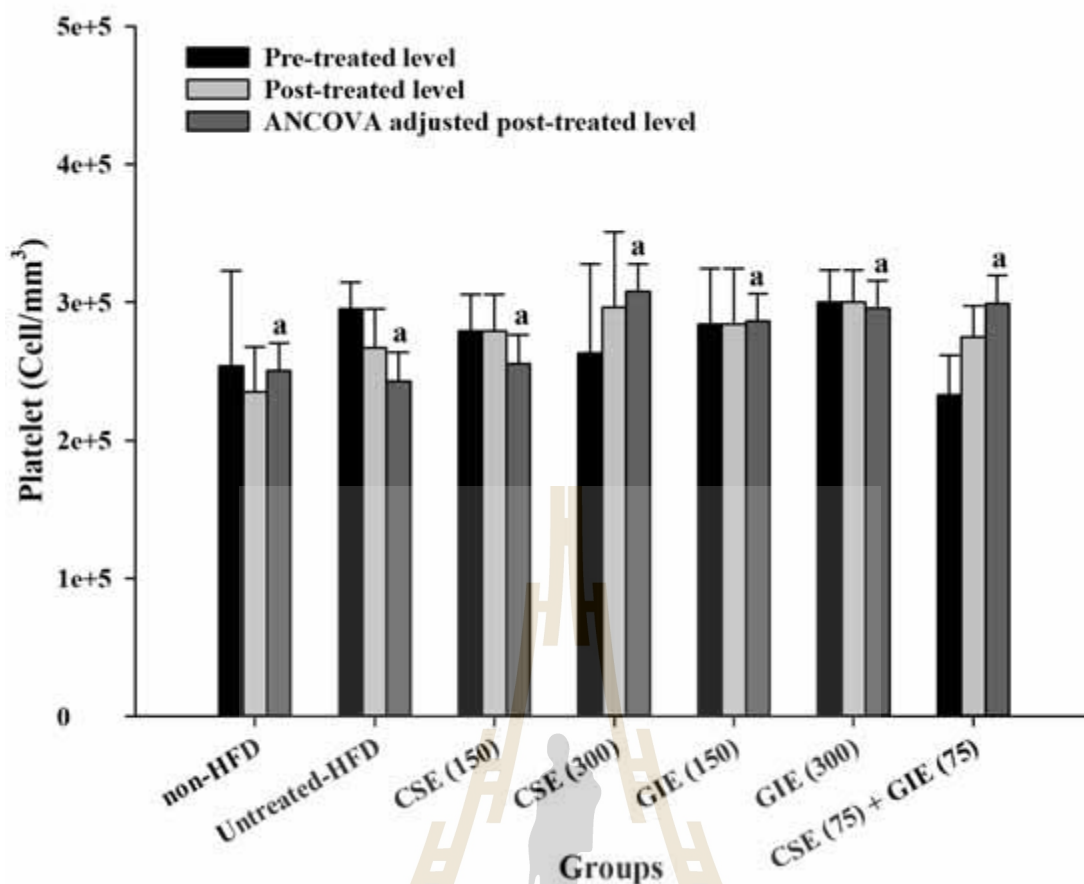
รูปที่ 4.18 ผลของ CSE, GIE, เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ ALP ในซีรัม; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group ที่ไม่ได้รับสาร; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = สารผสม *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มจากการวิเคราะห์โดย ANCOVA โดยทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD post hoc test ที่ $p < 0.05$.



รูปที่ 4.19 ผลของ CSE, GIE, เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ WBC ในเลือด; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group ที่ไม่ได้รับสาร; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = สารผสม *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มจากการวิเคราะห์โดย ANCOVA โดยทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD post hoc test ที่ $p < 0.05$.



รูปที่ 4.20 ผลของ CSE, GIE, เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ RBC ในเลือด; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group ที่ไม่ได้รับสาร; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = สารผสม *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มจากการวิเคราะห์โดย ANCOVA โดยทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD post hoc test ที่ $p < 0.05$.

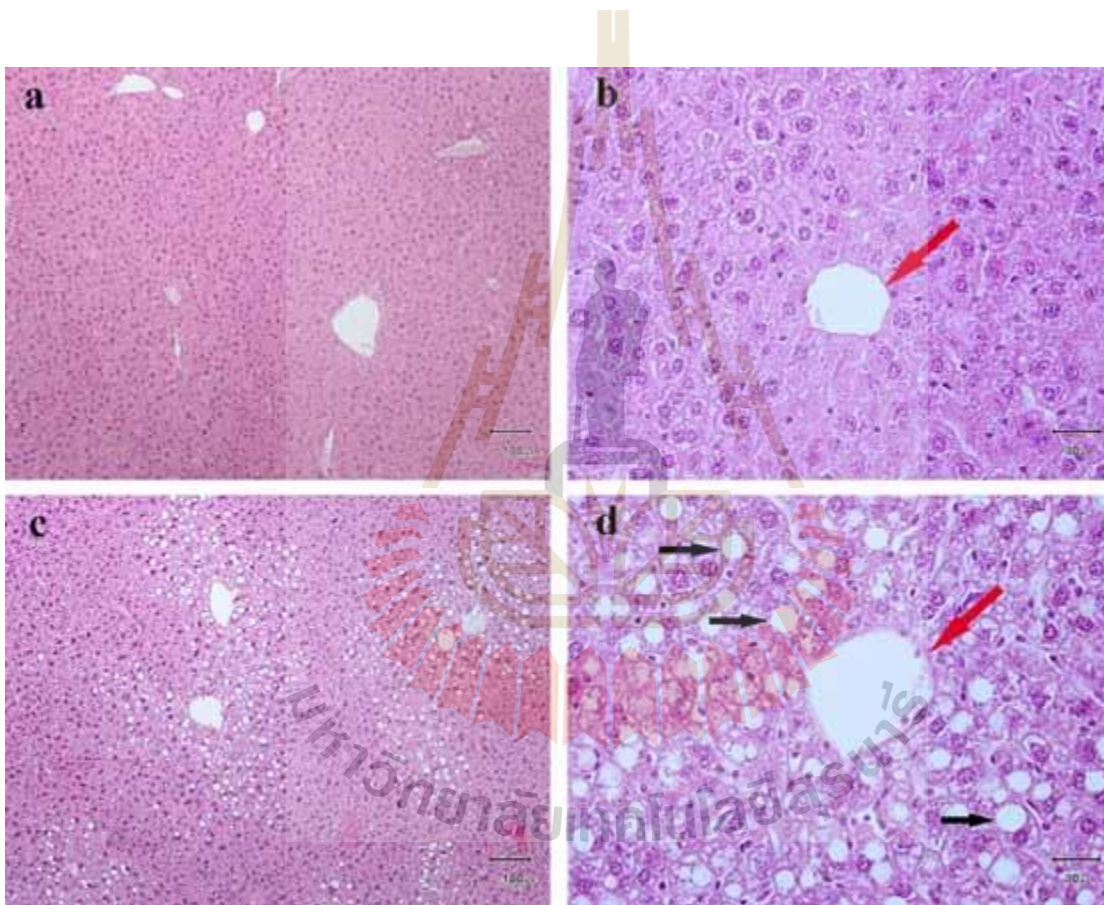


รูปที่ 4.21 ผลของ CSE, GIE, เดี่ยวๆ และผสมกันต่อระดับ Platelet ในเลือด; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group ที่ไม่ได้รับสาร; CSE (150) = *C. sinensis* extract 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = *C. sinensis* extract 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = *G. inodorum* extract 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = *G. inodorum* extract 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = สารผสม *C. sinensis* extract 75 mg/kg BW/day กับ *G. inodorum* extract 75 mg/kg BW/day ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มจากการวิเคราะห์โดย ANCOVA โดยทดสอบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD post hoc test ที่ $p < 0.05$.

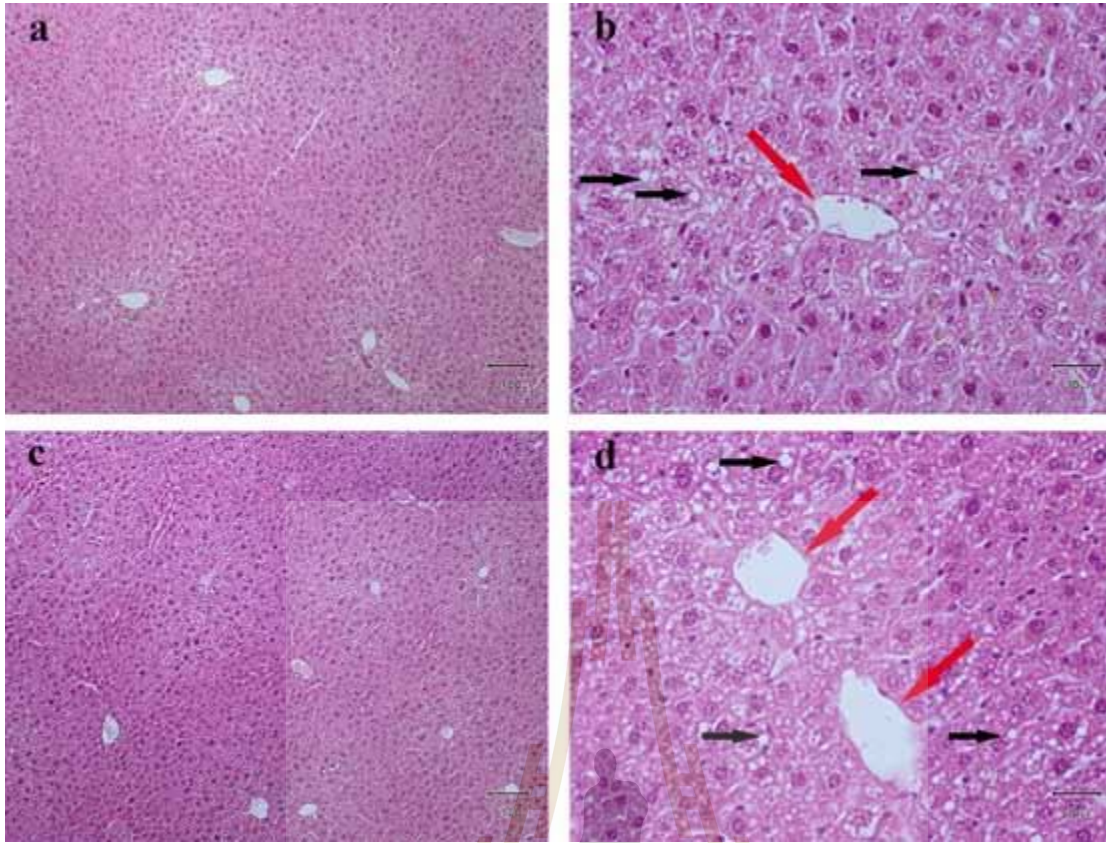
4.2.5 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อไขมัน ตับ และไต

ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อตับ ไขมันและเนื้อเยื่อไขมัน (epididymal adipose tissues) ถูกตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทางจุลกายวิภาค ผลการตรวจค้นพบว่า ตับของหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) แสดงให้เห็นว่ามี cytoplasmic vacuoles ขยายขึ้นและมี steatosis สูง (ลูกศรสีดำ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสาร simvastatin, CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE (รูปที่ 4.22-4.25) ผลการตรวจสอบพยาธิวิทยาของไตพบว่าไตของหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) แสดง

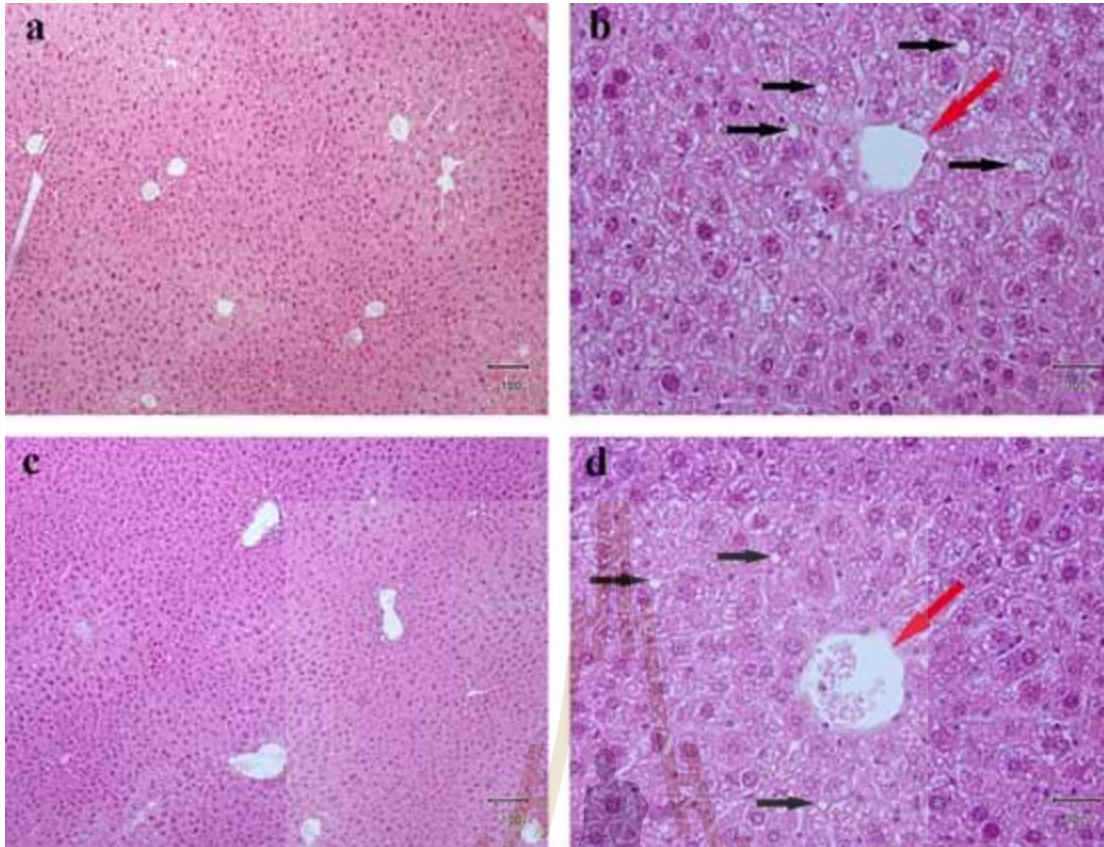
ให้เห็นว่ามี mild mesangial cells และ glomerulus capillaries เปลี่ยนแปลงระดับปานกลาง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสาร simvastatin, CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ที่พบว่าโครงสร้างดังกล่าวปกติ (รูปที่ 4.26-4.29) การตรวจสอบเนื้อเยื่อไขมันที่ย้อมด้วย H & E แสดงให้เห็นว่าขนาดของ adipocyte ในหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่ม non-HFD และกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสารทุกกลุ่ม ($p < 0.05$; รูปที่ 4.30-4.32) ยิ่งไปกว่านั้น กลุ่ม non-HFD และกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสารทุกกลุ่ม มีจำนวน adipocytes ต่อพื้นที่ที่ส่องดูบน Slide มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$; รูปที่ 4.32)



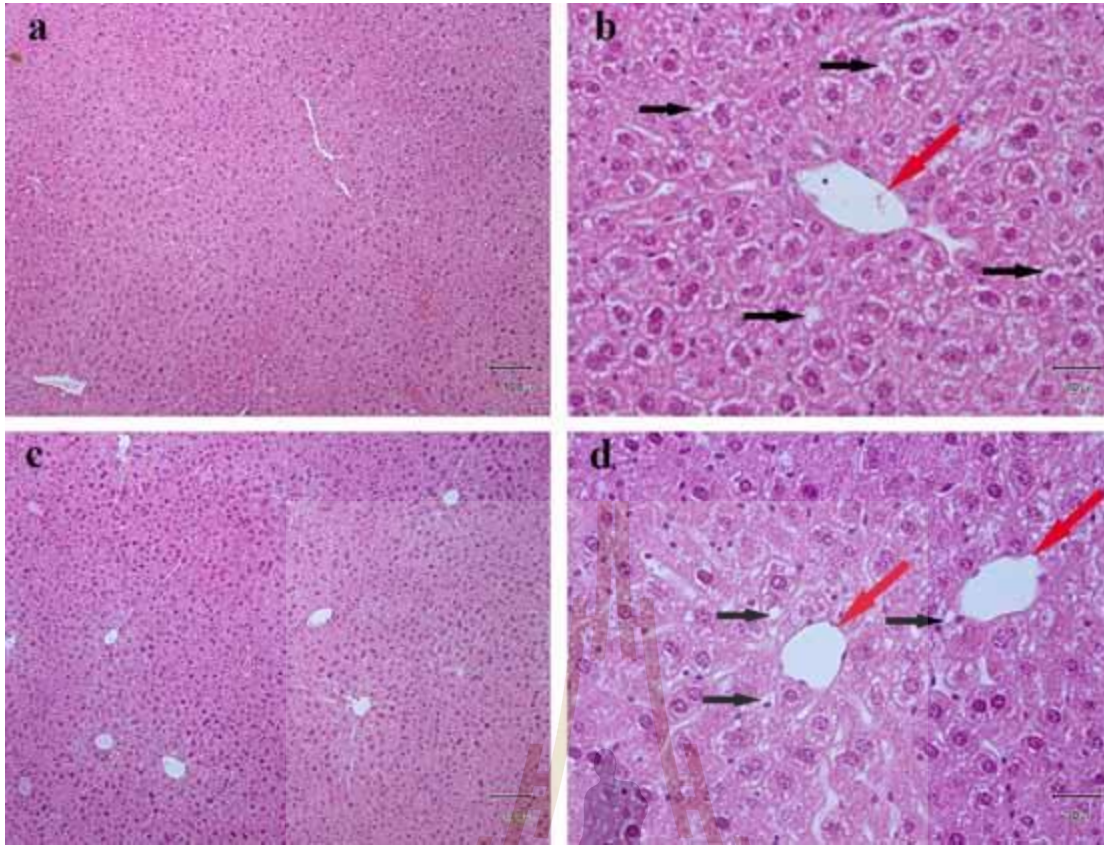
รูปที่ 4.22 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) non-HFD (หนูที่กินอาหารปกติ) และ (c-d) untreated-HFD (หนูที่กินอาหาร High-fat-diet). ลูกศรสีแดงชี้ไปที่ central vein และลูกศรสีดำชี้ไปที่ lipids droplet. ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



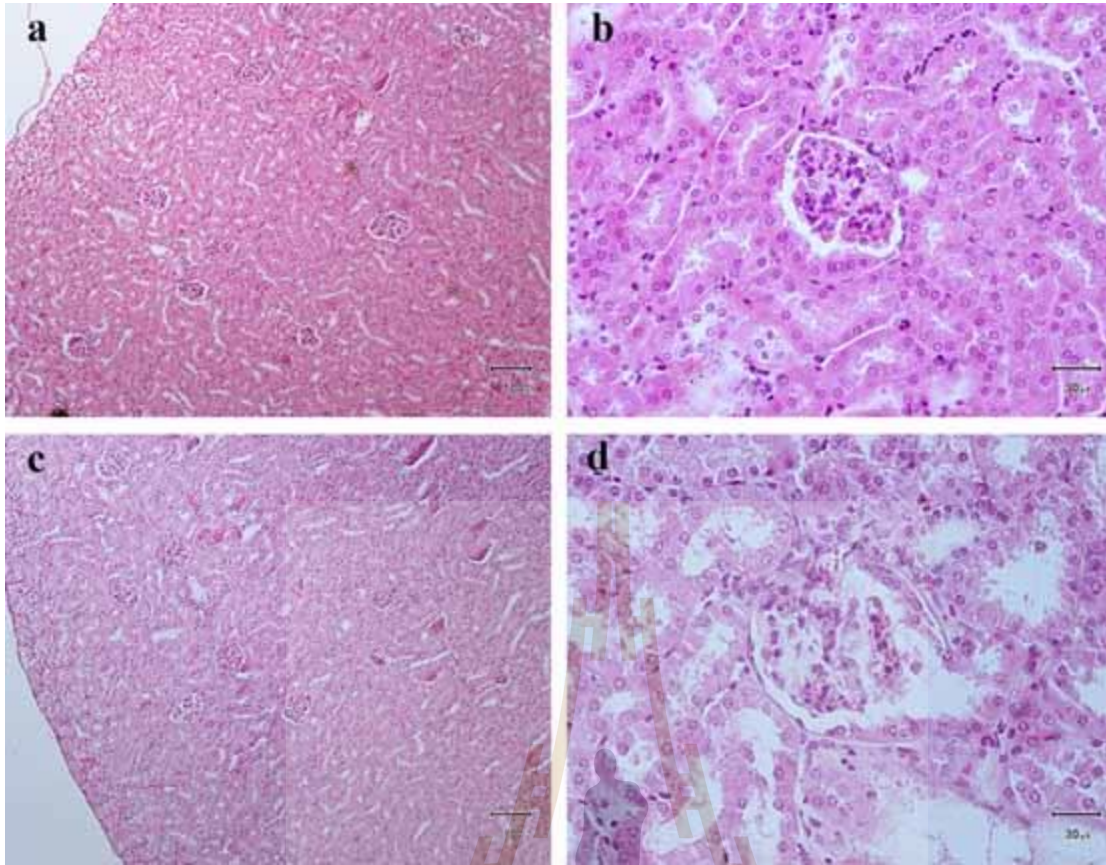
รูปที่ 4.23 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) HFD และได้รับ simvastatin และ (c-d) HFD และได้รับสารผสม CSE + GIE. ลูกศรสีแดงชี้ไปที่ central vein และลูกศรสีดำชี้ไปที่ lipids droplet. ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



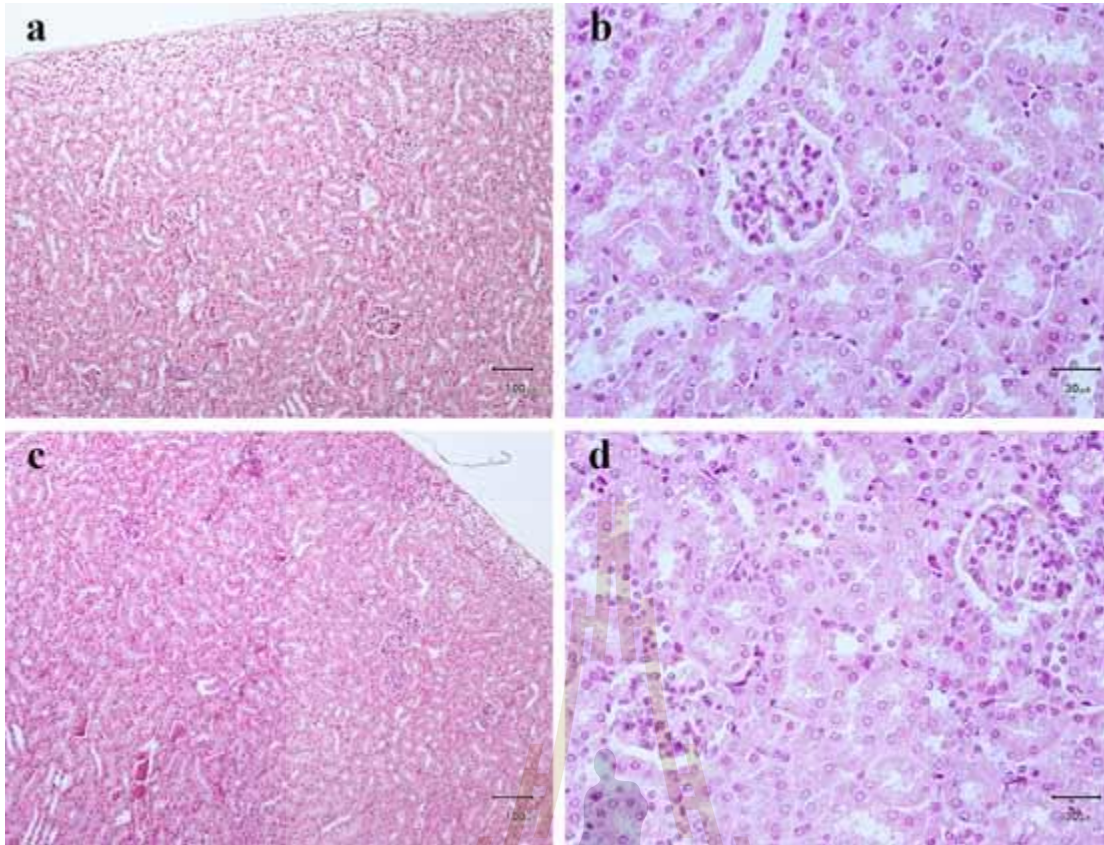
รูปที่ 4.24 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) HFD และได้รับ CSE ที่ 150 mg/kg BW/day และ (c-d) HFD และได้รับ CSE ที่ 300 mg/kg BW/day. ลูกศรสีแดงชี้ไปที่ central vein และลูกศรสีดำชี้ไปที่ lipids droplet. ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



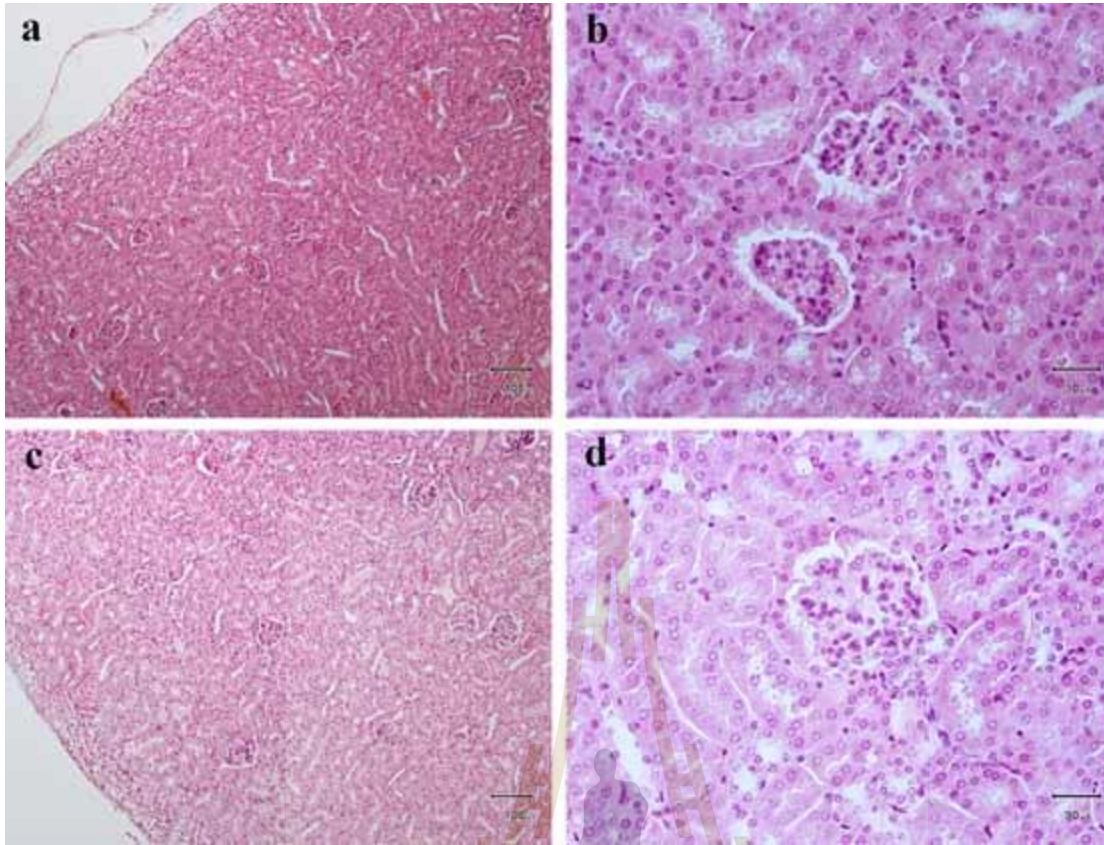
รูปที่ 4.25 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อตับหนูทดลอง; (a-b) HFD และได้รับ GIE ที่ 150 mg/kg BW/day และ (c-d) HFD และได้รับ GIE ที่ 300 mg/kg BW/day. ลูกศรสีแดงชี้ไปที่ central vein และลูกศรสีดำชี้ไปที่ lipids droplet. ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



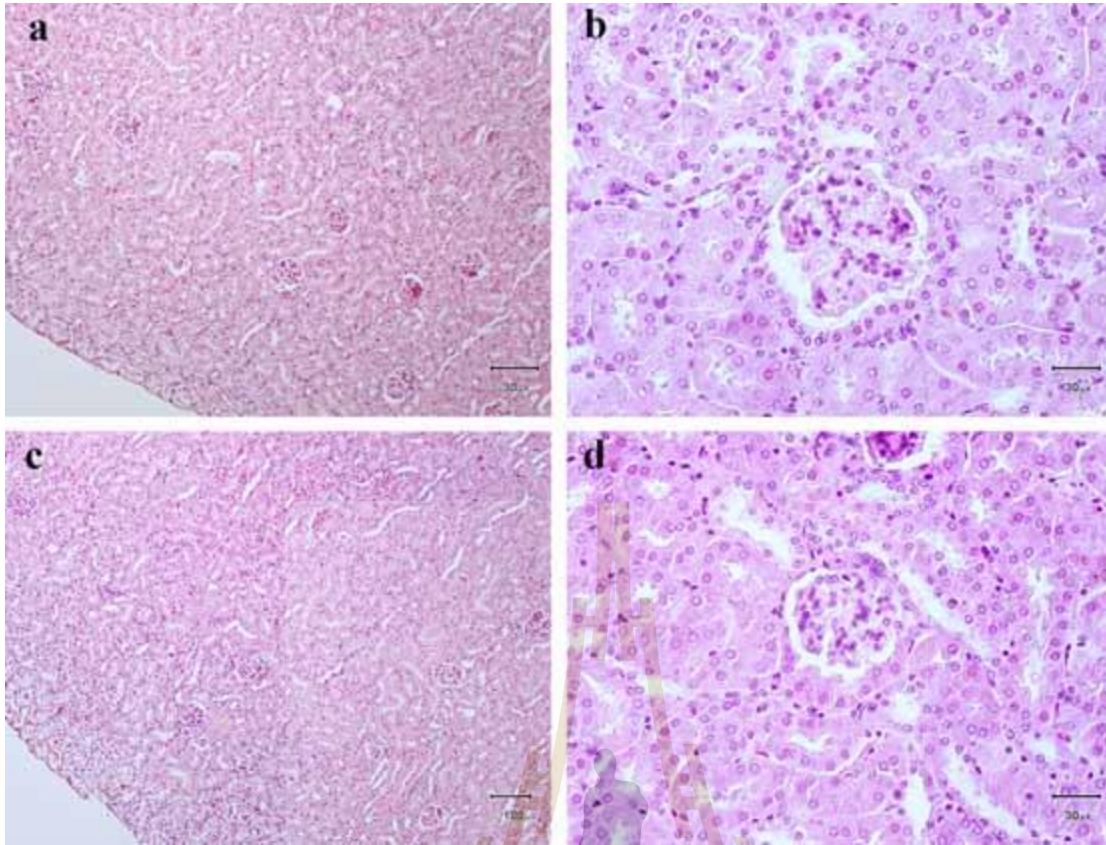
รูปที่ 4.26 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) non-HFD (หนูที่กินอาหารปกติ) และ (c-d) untreated-HFD (หนูที่กินอาหาร High-fat-diet). ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



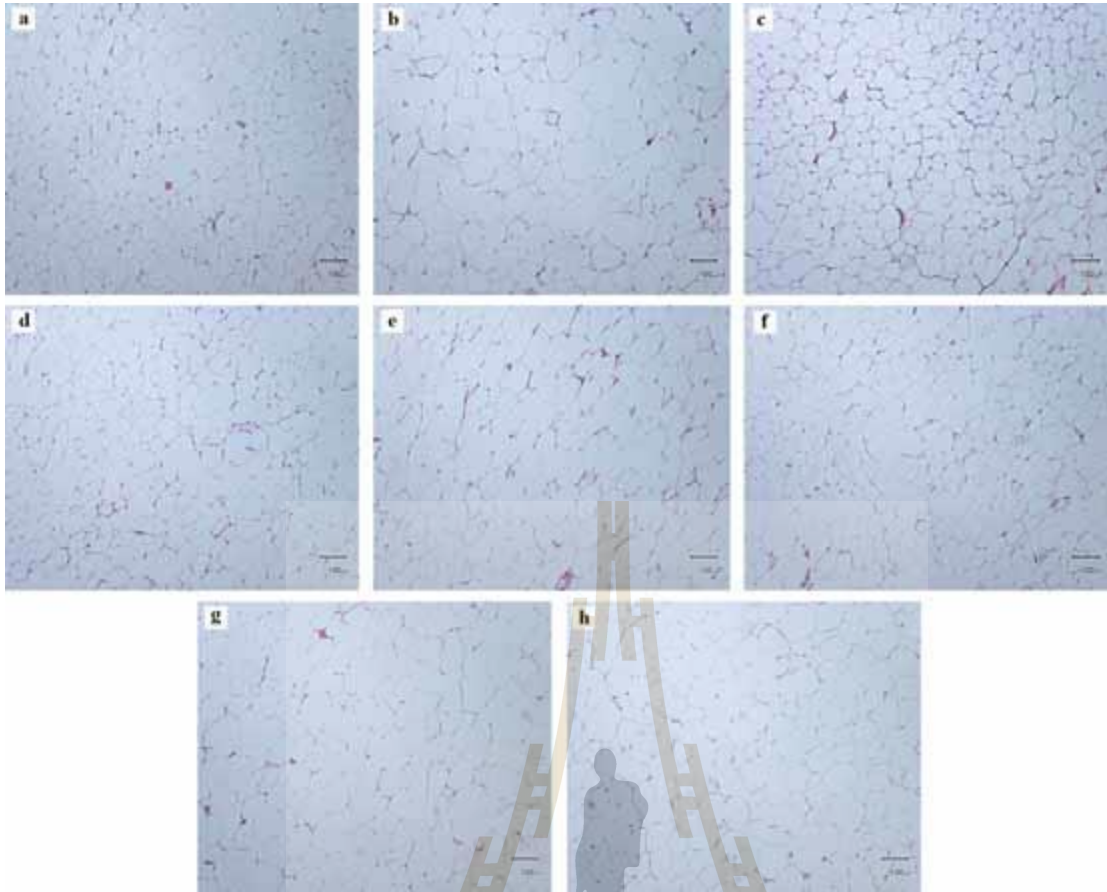
รูปที่ 4.27 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) HFD และได้รับ simvastatin และ (c-d) HFD และได้รับสารผสม CSE + GIE. ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



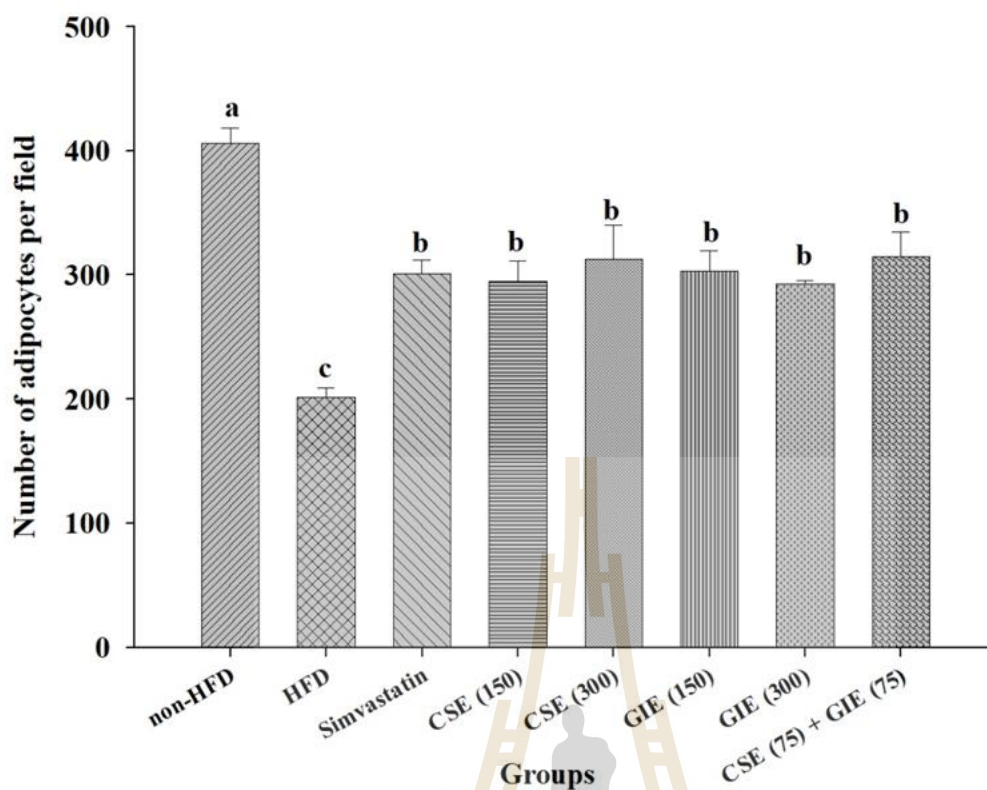
รูปที่ 4.28 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) HFD และได้รับ CSE ที่ 150 mg/kg BW/day และ (c-d) HFD และได้รับ CSE ที่ 300 mg/kg BW/day. ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



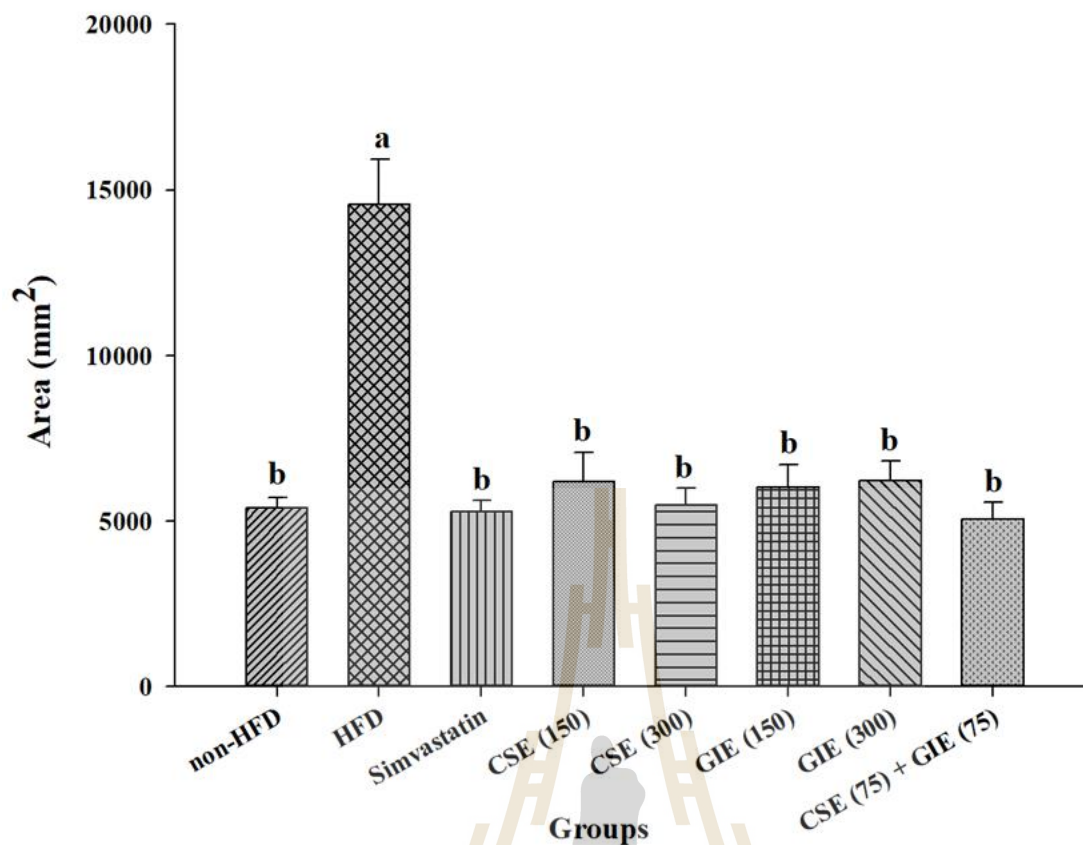
รูปที่ 4.29 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไตหนูทดลองแสดงโครงสร้าง glomerulus; (a-b) HFD และได้รับ GIE ที่ 150 mg/kg BW/day และ (c-d) HFD และได้รับ GIE ที่ 300 mg/kg BW/day. ภาพ a, c กำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm) และ ภาพ b, d กำลังขยาย 400 × (Scale bars = 30 μm).



รูปที่ 4.30 ภาพแสดงจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อ epididymal adipose หนูทดลองภายหลังการได้รับ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE และ GIE ที่ได้รับอาหารปกติ (non-HFD) และหนูที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูง (HFD); (a) non-HFD; (b) High-fat-diet; (c) Simvastatin 20 mg/kg BW/day; (d) CSE (150); (e) CSE (300); (f) GIE (150); (g) GIE (300); (h) สารผสมของ CSE (75) กับ GIE (75) ภาพที่แสดงกำลังขยาย 100 × (Scale bars = 100 μm)



รูปที่ 4.31 กราฟแสดงผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และสารผสมของ CSE กับ GIE ต่อจำนวนของ adipocytes; Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group; CSE (150) = CSE ที่ 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = CSE ที่ 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = GIE ที่ 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = GIE ที่ 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = CSE ที่ 75 mg/kg BW/day กับ GIE ที่ 75 mg/kg BW/day ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean ± SEM) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดย Tukey's HSD ($p < 0.05$).



รูปที่ 4.32 กราฟแสดงผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และสารผสมของ CSE กับ GIE ต่อค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ adipocytes (adipocytes mean area); Non-HFD = Normal group; Untreated-HFD = High-Fat Diet group; CSE (150) = CSE ที่ 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = CSE ที่ 300 mg/kg BW/day; GIE (150) = GIE ที่ 150 mg/kg BW/day; GIE (300) = GIE ที่ 300 mg/kg BW/day และ CSE (75) + GIE (75) = CSE ที่ 75 mg/kg BW/day กับ GIE ที่ 75 mg/kg BW/day ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean \pm SEM) ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดย Tukey's HSD ($p < 0.05$).

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

โรคอ้วนหมายถึงการสะสมไขมันที่มากเกินไปซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เป็นปัญหาสุขภาพที่รุนแรงเนื่องจากเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่นภาวะไขมันในเลือดสูง โรคเบาหวานชนิดที่สอง ความดันโลหิตสูง และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ภาวะไขมันในเลือดสูง ได้แก่ มีไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล และ LDL-cholesterol ในเลือดสูงกว่าค่าปกติ ทั้งสามพารามิเตอร์นี้เป็นที่รู้กันดีว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ โรคหลอดเลือดตีบ และโรคหลอดเลือดหัวใจ ดังนั้นการลดระดับของ triglycerides และคอเลสเตอรอลในเลือดจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถนำไปใช้ในการป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงและโรคอ้วน (Hu et al., 2014) ปัจจุบันนี้เนื่องจากข้อเสียกับต้นทุนที่สูงและผลข้างเคียงที่อาจเป็นอันตรายของยาแผนปัจจุบัน สักยภาพของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติในการรักษาโรคอ้วนจึงเป็นสิ่งที่นักวิจัยสนใจและอาจเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการพัฒนาที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคอ้วนในอนาคต (Buettner et al., 2007; Mayer et al., 2009) สารเคมีพฤกษเคมีมักเกิดขึ้นในธรรมชาติเป็นหลายสารผสมกันอยู่ การรวมกันของสารพฤกษเคมีอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพได้อย่างมีนัยสำคัญถึงเช่า (*Cordyceps sinensis*) และผักเชียงดา (*Gymnema inodorum*) เป็นอาหารและยาแผนโบราณในเอเชียที่ได้รับความสนใจอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา (Ananthan et al., 2003; Kim et al., 2012) อย่างไรก็ตามยังไม่มียานใดที่การศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัด *Cordyceps sinensis* (CSE) และสารสกัดจาก *Gymnema inodorum* (GIE) ต่อการเกิด adipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ศึกษาถึงผลของ CSE, GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ และผสมกันต่อกระบวนการ adipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes และการยับยั้งภาวะไขมันในเลือดสูงในหนูไมซ์

5.1.1 การศึกษาผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อกระบวนการ adipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นชัดเจนว่า CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ทำให้การสะสมไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Differentiated 3T3-L1 แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated Differentiated 3T3-L1) ขนาดที่ยับยั้งการสะสมไขมันนี้ไม่ก่อให้เกิด cytotoxic แต่อย่างใด รายงานก่อนหน้านี้พบว่า cordycepin ยับยั้งการสะสมไขมันและการเหนี่ยวนำ adipogenic ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงจาก pre-adipocytes ไปเป็น adipocytes ฤทธิ์ต้านการเกิด adipogenic นี้สามารถย้อนกลับและควบคุมตัวขนส่ง adenosine แต่ไม่ใช่ตัวรับ adenosine A₁, A₂ หรือ A₃ (Takahashi et al., 2012). Guo et al แสดงให้เห็นว่าผลของ cordycepin ซึ่งเป็นส่วนประกอบทางชีวภาพของเชื้อรา *C. sinensis* ต่อเซลล์ HepG2 โดย cordycepin กระตุ้น AMPK และขึ้นกับเวลาที่มีความสัมพันธ์กับการกระตุ้น ACC และการยับยั้งการสังเคราะห์ไขมัน (Guo et al., 2010) มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากใบของ *G. sylvastre* เมื่อทดสอบกับหนูที่เป็นเบาหวานพบว่าทำให้ระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Mall et al., 2009).

ฤทธิ์ต้านการเกิด adipogenic ของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และสารผสมของ CSE กับ GIE ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes ได้รับการยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วย FTIR การวิเคราะห์โดย FTIR เป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของชีวโมเลกุลในตัวอย่างทางชีววิทยาต่างๆ (Dunkhunthod et al., 2017; Gasparri and Muzio, 2003; Lamberti et al., 2010) ในงานวิจัยชิ้นนี้ ได้ใช้ FTIR ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมของ 3T3-L1 preadipocytes, untreated-treated 3T3-L1 adipocytes, simvastatin, CSE (10), GIE (500) และสารผสม CSE (10) และ GIE (500) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ 3T3-L1 adipocytes ที่ใช้ทดสอบทั้ง 6 กลุ่มมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมของอนุพันธ์ที่สองในส่วนของ lipid region, บริเวณกรดนิวคลีอิก, และกลุ่มของไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ นอกจากนี้ความเข้มของสัญญาณและพื้นที่ของไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ของ adipocytes 3T3-L1 ที่ได้รับ CSE (10), GIE (500) หรือสารผสม CSE (10) และ GIE (500) มีค่าน้อยกว่า untreated adipocytes 3T3-L1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นการลดลงของไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ อาจส่งผลต่อการสะสมคาร์โบไฮเดรตและไขมันในคนอ้วน (Shepherd et al., 1993; Wylie-Rosett et al., 2004) นอกจากนี้อัตราส่วนการยึดตัวแบบไม่สมมาตร CH₂/CH₃ ยังบ่งชี้ถึงการมีของห่วงโซ่ acyl ของไขมัน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า CSE (10), GIE (500) เดี่ยวๆ และผสมกันลดการสะสมไขมันในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ untreated 3T3 adipocytes และเมื่อใช้สารผสมจะลดไขมันได้มากกว่าการใช้สารเดี่ยวๆอย่างมี

นัยสำคัญ ซึ่งการทดลองนี้จะสอดคล้องกับผลของการย้อมสี Oil Red O ที่บ่งชี้ถึงสารสองตัวนี้แสดง การเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) นอกจากนั้นแล้วกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบทุกกลุ่มแสดงการ ลดลงของการสะสมไขมันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-3T3-L1 adipocyte cells ($p < 0.05$) ยิ่งไปกว่านั้นผลการลดลงของไขมันดังกล่าวยังสอดคล้องกับการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ $\text{CH}_2/\text{amide I}$ ในกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบทั้งหมด เมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated 3T3 adipocytes

ในส่วนของการจัดหมวดหมู่การวิเคราะห์ PCA สามารถใช้เพื่อแยกแยะกลุ่มของสเปกตรัม FTIR จำนวน 6 กลุ่มของเซลล์ตัวอย่าง 3T3-L1 ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงระดับชีวโมเลกุล (ไขมัน, โปรตีน, amide I, กรดนิวคลีอิก, โกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ) วิเคราะห์โดย PCA แบบสอง มิติเพื่อตรวจสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มตัวอย่าง 6 กลุ่ม (รูปที่ 4.7a) ความสัมพันธ์ ระหว่างตัวแปรของ 6 กลุ่มตัวอย่างที่ทำให้เกิดการกระจุกตัวของกลุ่ม พล็อตคะแนน PCA แสดงให้ เห็นว่ากลุ่มของ untreated 3T3-L1 adipocytes และ adipocytes 3T3-L1 ที่ได้รับสาร GIE (500) ถูก แยกออกจากกลุ่ม 4 กลุ่มอื่นๆ ตาม PC1 ซึ่งคิดเป็น 28% ของความแปรปรวนทั้งหมด พล็อตคะแนน PC2 ซึ่งคิดเป็น 22% ของความแปรปรวนทั้งหมดได้แยกกลุ่มตัวอย่างของ untreated 3T3 adipocytes ออกจาก 3T3-L1 adipocytes ที่ได้รับ GIE (500)

5.1.2 การศึกษาผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ หรือผสมกัน ต่อการยับยั้งภาวะน้ำตาลและไขมันใน เลือดสูงในหนูไม่ซ้

ผลของ CSE และ GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมต่อระดับน้ำตาลในเลือดในหนูปกติ เมื่อใช้ Glibenclamide เป็นตัวควบคุมบวก ทุกกลุ่มที่ได้รับการสารทดสอบแสดงระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ กว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 15, 30 และ 60 นาทีหลังจากได้รับสารสกัด ($p < 0.05$) รายงานก่อนหน้านี้เปิดเผยว่า *C. sinensis* ช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินใน พลาสมาทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงและเพิ่มดัชนีกลูโคสอินซูลินซึ่งวัดความไวของอินซูลิน ในหนูทดลอง (Zhang et al., 2006) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า polysaccharides โดยเฉพาะอย่างยิ่ง β -D-glucans ซึ่งสกัดจาก *C. sinensis* เป็นส่วนประกอบหลักที่ทำปฏิกิริยาทาง ชีวภาพโดยมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ตัวอย่างเช่น polysaccharides ที่ได้จากเส้นใยเชื้อราที่เพาะเลี้ยง ได้แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำโดย streptozotocin (type 1 DM) หรือหนูที่เป็นเบาหวาน (type 2 DM) ตามเส้นเลือดดำภายในช่องปาก (Lo et al., 2006) งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า saponin triterpenoid ในสารสกัดจากเห็ดหลินจือสา มารยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ที่หดตัวจาก K^+ ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของ Na^+/K^+ เมื่อปั๊มถูกยับยั้งแล้วความต่างศักย์ Na^+ ภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและส่งผลต่อระบบ

Cotransport ที่ขึ้นกับ Na^+ (Shimizu et al., 2001) ในผู้ป่วยโรคเบาหวานความไม่สมดุลระหว่างระดับพลาสมาอินซูลินกับระดับกลูโคสมีส่วนทำให้การขนส่งของกรดไขมันที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ลดลงทำให้เกิดครึ่งชีวิตที่ยาวนานของไลโปโปรตีนที่อุดมด้วยไตรกลีเซอไรด์และอนุภาคที่เหลื่ออยู่ (Schmitz et al., 1993) CSE และ GIE อาจมีกลไกหลายอย่างที่ให้มีผลต่อการลดน้ำตาลในเลือด กลไกนี้สนับสนุนการลดไขมันสะสม (Lara-Castro and Garvey, 2008)

ผลการศึกษพบว่าสารสกัด *C. sinensis* ที่ 150 และ 300 mg/kg BW/day และ *G. inodorum* ที่ 150 และ 300 mg/kg BW/day เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ผสมกันของสารสกัดจาก *C. sinensis* ที่ระดับ 75 mg/kg BW/day บวกสารสกัดจาก *G. inodorum* ที่ 75 mg/kg BW/day ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้น้ำตาลในเลือดสูงโดย HFD ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับกลุ่ม HFD ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (Unt-HFD) ($p < 0.05$). ยิ่งไปกว่านั้นแล้วผลการวิเคราะห์ยังพบว่า CSE (75) + GIE (75) แสดงการเสริมฤทธิ์กันเมื่อเทียบกับการใช้เดี่ยวๆ นอกจากนั้นแล้วเมื่อวิเคราะห์โปรไฟล์ของไขมันพบว่าระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์และ LDL-cholesterol ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) เมื่อเราวิเคราะห์ว่าการใช้สารผสมของ CSE และ GIE จะออกฤทธิ์เสริมกันหรือไม่ เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECI) ที่ CSE (75) + GIE (75) ต่อระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์และ LDL-cholesterol ในซีรัมพบว่าค่า < 1.0 แสดงว่าสารสองตัวนี้แสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) เมื่อวิเคราะห์ค่า HDL-cholesterol พบว่าระดับ HDL-cholesterol ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) การศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเชื้อรา *C. sinensis* ลดระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์และการสังเคราะห์ VLDL ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ LDL ในหนู (Koh et al., 2003; Zhou et al., 2009) ก่อนหน้านี้ได้ศึกษากลไกที่เป็นไปได้ในการกระตุ้น AMPK จาก cordyceps ซึ่ง cordycepin จะช่วยลดการสะสมของไขมันในกลุ่มเซลล์โอลิติกและเพิ่มกิจกรรม AMPK (Wu et al., 2014) Koh et al. ซึ่งให้เห็นว่าเส้นใยเชื้อราที่ได้รับการเพาะเลี้ยงของสารสกัด *C. sinensis* ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดในหนู ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดกิจกรรมของเอนไซม์ตัว 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase การให้ใบของ *G. montanum* กับหนูที่เป็นเบาหวาน ทำให้ปริมาณกลูโคสและไขมันในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ กลไกที่เป็นไปได้ในการลดการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูงของใบของ *G. montanum* อาจเกิดจากผลต่อการกระตุ้นอินซูลินต่อเซลล์ตับอ่อนหรือเนื่องจากการทำงานร่วมกับอินซูลินโดยการเพิ่มการเคลื่อนที่ของกลูโคสจากพลาสมาไปยังเนื้อเยื่อรอบข้าง (Ramkumar et al., 2008) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าผลของระดับคอเลสเตอรอลที่ลดลงจากสารสกัด *C. sinensis* และสารสกัดจาก *G.*

inodorum อาจมาจากหลายกลไกดังกล่าวข้างต้น (Koh et al., 2003) เนื่องจากพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกันอาจมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มเดียวกันได้

การศึกษาทางจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไขมัน ตับ และไตของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง การเจริญเติบโตมากเกินไปของ Adipocyte และภาวะไขมันในตับที่เกิดจาก HFD และมีบทบาทสำคัญในการพัฒนากลุ่มอาการ metabolic syndrome เช่นปัญหาการอักเสบและการทำงานของอินซูลิน (Yang et al., 2012) การศึกษาล่าสุดแสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อไขมันไม่ได้เป็นแหล่งพลังงานที่เพียงสะสมไขมัน แต่ยังเป็นอวัยวะภายในที่ทำหน้าที่หลั่งสารเช่น adipokines และปัจจัยการเจริญเติบโต ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระเบียบ homeostasis (Kang et al., 2012) เมื่อเนื้อเยื่อไขมันขยายด้วยการเจริญเติบโตมากเกินไปและการโตเกิน หรือทั้งสองอย่างนี้จะช่วยส่งเสริมการอักเสบและการแทรกซึมของ macrophage และอาจนำไปสู่การพัฒนาโรคอ้วน (Yoon et al., 2015) นอกจากนี้การหลั่งไขมันและการทำงานร่วมกันระหว่างเนื้อเยื่อไขมันกับตับอาจทำให้เกิดภาวะไขมันในตับ (Gao et al., 2015) และการป้องกันการเจริญเติบโตเต็มที่ของไขมันและภาวะไขมันในตับเป็นปัจจัยสำคัญในการประเมินผลการป้องกันโรคอ้วน ผลการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าการตรวจสอบเนื้อเยื่อไขมันที่ข้อมด้วย H & E มีขนาดของ adipocyte ในหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) ขนาดใหญ่กว่ากลุ่ม non-HFD และกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสารทุกกลุ่ม ($p < 0.05$) ยิ่งไปกว่านั้น กลุ่ม non-HFD และกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสารทุกกลุ่ม มีจำนวน adipocytes และการปรับพื้นที่เฉลี่ย (normalized field) มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้จำนวนของหยดไขมันในเนื้อเยื่อตับในกลุ่ม non-HFD และกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสารทุกกลุ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) การศึกษายังพบอีกว่าผลของสารสกัดเหล่านี้ต่อจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ ผลการตรวจค้นพบว่า ตับของหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) แสดงให้เห็นว่ามี cytoplasmic vacuoles ขยายขึ้นและมี steatosis สูง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสาร simvastatin, CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE และเพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดเหล่านี้สามารถป้องกันการบาดเจ็บของตับที่เกิดจาก HFD ได้หรือไม่ ทีมวิจัยจึงตรวจสอบระดับซีรัม AST และ ALT ซึ่งเป็น biomarkers ที่เป็นตัวแทนของการบาดเจ็บของตับและยังบ่งชี้ถึงการทำงานของตับ (Kang et al., 2012; Mohajeri and Sefidan, 2013) ผลวิจัยพบว่าระดับ ALT ของกลุ่ม untreated-HFD สูงกว่าทุกกลุ่มที่ได้รับ HFD และ สารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ simvastatin หรือ GIE (300) จากผลของ ALT เป็นสิ่งที่ยืนยันว่า CSE (150), CSE (300), GIE (150) และ CSE (75) และ GIE (75) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อตับ โรคไตเช่นไตวายเฉียบพลัน โรคไตเรื้อรังและโรคไตวายเรื้อรังสามารถตรวจพบได้จากการ

เพิ่มขึ้นของซีรัม creatinine (Mohajeri and Sefidan, 2013) Creatinine เป็นผลิตภัณฑ์จากการสลายปกติของการเผาผลาญของ creatine และมักถูกขับออกมาในปัสสาวะ (Kotsyubynskyy et al., 2004) เมื่อไตทำงานผิดปกติ creatinine จะไม่สามารถขับออกไป ทำให้ระดับของมันเพิ่มขึ้นในเลือด ดังนั้นพลาสมาหรือซีรัม creatinine เป็นตัวบ่งชี้ที่ใช้ในการประเมินการทำงานของไต ผลการศึกษาทางชีวเคมีในซีรัมของผู้วิจัยพบว่าระดับครีเอตินินในซีรัมของกลุ่ม non-HFD มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับ HFD ทั้งหมดที่ได้รับสารทดสอบมีระดับครีเอตินินในซีรัมไม่แตกต่างจากกลุ่ม non-HFD ($p > 0.05$) ยิ่งไปกว่านั้นผลการตรวจสอบพยาธิวิทยาของไตพบว่าไตของหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) แสดงให้เห็นว่ามี mild mesangial cells และ glomerulus capillaries เปลี่ยนแปลงระดับปานกลาง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสาร simvastatin, CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ที่พบว่าโครงสร้างดังกล่าวปกติ ผลการศึกษานี้แสดงว่า CSE, GIE เดี่ยวๆ หรือสารผสม CSE กับ GIE ไม่แสดงความเป็นพิษต่อไต Senthilkumar et al. รายงานว่าการสังเคราะห์ของไตและการสะสมของไตรกลีเซอไรด์มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของปัจจัยการเจริญเติบโต profibrotic ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นการขยายตัว mesangial เกิดการบาดเจ็บของไตและการสะสม tubulointerstitial ของโปรตีน ECM จึงทำให้เกิดโรคของ DN (Senthilkumar et al., 2012) Utsunomiya et al. รายงานว่าไขมันในเลือดสูงส่งผลต่อไต โรคเบาหวาน ตามมาด้วยการแทรกซึมของขนาดใหญ่ใน glomeruli ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วย STZ พบว่าระดับตัวบ่งชี้ของไขมันเช่น TG, FFA, TC, LDL-C และ VLDL-C มีค่าสูงขึ้น การเหนี่ยวนำของโรคเบาหวานในหนูโดย STZ นำไปสู่การพัฒนาของภาวะไขมันผิดปกติ (ไขมันในเลือดสูงและ hypertriglyceridemia) (Pepato et al., 2005; Peungvicha et al., 1998) จากผลการวิจัยของเราพบว่าการตรวจสอบเนื้อเยื่อไขมันที่ข้อมด้วย H & E มีขนาดของ adipocyte ในหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) ขนาดใหญ่กว่าและจำนวนน้อยกว่ากลุ่ม non-HFD และกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสารทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนั้นแล้ว ผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อโปรไฟล์ของไขมันในเลือดพบว่าระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์และ LDL-cholesterol ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเราวิเคราะห์ว่าการใช้สารผสมของ CSE และ GIE สามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการลดโปรไฟล์ของไขมันในเลือดดังกล่าวด้วย ผลการศึกษาเหล่านี้สอดคล้องกับภาพจากกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ที่ถูกข้อมด้วย Oil Red O และ haematoxylin แสดงให้เห็นว่า CSE (10) – CSE (40), GIE (250) - GIE (2000) เมื่อใช้เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE (10) กับ GIE (500) ลดปริมาณสะสมไขมันใน adipocytes ในระยะที่เจริญเต็มที่อย่างมีนัยสำคัญเมื่อ

เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว (Untreated 3T3 adipocytes) ($p < 0.05$) ยิ่งไปกว่านั้น ความเข้มข้นของดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพของสารผสม (FECI) CSE + GIE บ่งชี้ว่าสารสองตัวนี้แสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) ซึ่งสอดคล้องกับการออกฤทธิ์เสริมกันในการลดน้ำตาลในเลือดและโปรไฟล์ของไขมันในเลือด ผลการศึกษาดังกล่าวมาทั้งหมดยังสอดคล้องกับการศึกษาผลของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันต่อกระบวนการ adipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes โดย FTIR ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นชัดเจนว่า CSE (10), GIE (500) เดี่ยวๆ และผสมกันลดการสะสมไขมันในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ untreated 3T3 adipocytes และเมื่อใช้สารผสมจะลดไขมันได้มากกว่าการใช้สารเดี่ยวๆอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$).

5.2 สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นชัดเจนว่า CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ต่อกระบวนการ adipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes ทำให้การสะสมไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Differentiated 3T3-L1 แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated Differentiated 3T3-L1) ผลของการย้อมสี Oil Red O ยิ่งบ่งชี้ว่าสาร CSE และ GIE แสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) ในการลดการสะสมของไขมัน ขนาดที่ยับยั้งการสะสมไขมันนี้ไม่ก่อให้เกิด cytotoxic แต่อย่างใด ฤทธิ์ด้านการเกิด adipogenic ของ CSE, GIE เดี่ยวๆ และสารผสมของ CSE กับ GIE ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes ได้รับการยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วย FTIR โดยผลจาก FTIR พบว่าความเข้มของสัญญาณและพื้นที่เฉลี่ยของไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ, lipid, และ CH₂ asymmetric/Amide I ของ adipocytes 3T3-L1 ที่ได้รับ CSE (10), GIE (500) หรือสารผสม CSE (10) และ GIE (500) มีค่าน้อยกว่า untreated adipocytes 3T3-L1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งการใช้ FTIR มาช่วยดูการเปลี่ยนแปลงชีวเคมีภายในเซลล์เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง ผลของ CSE และ GIE เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันต่อระดับน้ำตาลในเลือดในหนูปกติเมื่อใช้ Glibenclamide เป็นตัวควบคุมบวก ทุกกลุ่มที่ได้รับการสารทดสอบแสดงระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 15, 30 และ 60 นาทีหลังจากได้รับสารสกัด ($p < 0.05$) ผลการศึกษาในหนูไม่ซ้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดน้ำตาลและไขมันในเลือดสูงด้วย HFD พบว่าสารสกัด CSE ที่ 150 และ 300 mg/kg BW/day และ GIE ที่ 150 และ 300 mg/kg BW/day เมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ผสมกันของสารสกัดจาก CSE ที่ระดับ 75 mg/kg BW/day บวกสารสกัดจาก GIE ที่ 75 mg/kg BW/day พบว่าทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มที่ได้รับการทดสอบเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD นอกจากนี้แล้วการวิเคราะห์ระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์และ LDL-cholesterol ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับการ

ทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) เมื่อเราวิเคราะห์ว่าการใช้สารผสมของ CSE และ GIE จะออกฤทธิ์เสริมกันหรือไม่ ผู้วิจัยและคณะพบว่าสารสองตัวนี้แสดงการเสริมฤทธิ์กัน (Synergism) ในการลดระดับน้ำตาลและโปรไฟล์ของไขมันดังกล่าวข้างต้น เมื่อวิเคราะห์ค่า HDL-cholesterol พบว่าระดับ HDL-cholesterol ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) การศึกษาทางจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อไขมัน ตับ และไตของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง ผลการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าการตรวจสอบเนื้อเยื่อไขมันที่ย้อมด้วย H & E มีขนาดของ adipocyte ในหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) ขนาดใหญ่กว่าและจำนวนน้อยกว่ากลุ่ม non-HFD และกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสารทุกกลุ่ม ($p < 0.05$) การศึกษายังพบอีกว่าผลของสารสกัดเหล่านี้ต่อจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ ผลการตรวจตับพบว่า ตับของหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) แสดงให้เห็นว่ามี cytoplasmic vacuoles ขยายขึ้นและมี steatosis สูง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสาร simvastatin, CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ผู้วิจัยพบว่าระดับ ALT ของกลุ่ม untreated-HFD สูงกว่าทุกกลุ่มที่ได้รับ HFD และ สารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ simvastatin หรือ GIE (300) จากผลของ ALT เป็นสิ่งที่ยืนยันว่า CSE (150), CSE (300), GIE (150) และ CSE (75) และ GIE (75) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อตับ ผลการศึกษาทางชีวเคมีในซีรัมของผู้วิจัยพบว่าระดับครีเอตินินในซีรัมของกลุ่ม non-HFD มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม untreated-HFD ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับ HFD ทั้งหมดที่ได้รับสารทดสอบมีระดับครีเอตินินในซีรัมไม่แตกต่างจากกลุ่ม non-HFD ($p > 0.05$) ยิ่งไปกว่านั้น ผลการตรวจสอบพยาธิวิทยาของไตพบว่าไตของหนูที่ได้รับ HFD แต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (untreated HFD) แสดงให้เห็นว่ามี mild mesangial cells และ glomerulus capillaries เปลี่ยนแปลงระดับปานกลาง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HFD และได้รับสาร simvastatin, CSE, GIE เดี่ยวๆ และผสมกันของ CSE กับ GIE ที่พบว่าโครงสร้างดังกล่าวปกติ ผลการศึกษานี้แสดงว่า CSE, GIE เดี่ยวๆ หรือสารผสม CSE กับ GIE ไม่แสดงความเป็นพิษต่อไต ดังนั้นสารสกัดจากถั่งเช่าและผักเชียงคามีสักยภาพที่จะพัฒนามาใช้เป็นส่วนผสมที่ปลอดภัยในการนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพหรือยาสมุนไพรเพื่อช่วยลดน้ำตาลในเลือดและไขมันส่วนเกินหรือโรคอ้วน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ ตลอดจนศึกษาผลต่ออวัยวะ ความปลอดภัยและขนาดของสารสกัดและระดับของสารออกฤทธิ์ในเลือดของมนุษย์

บรรณานุกรม

- Ahmed, A.B.A., Rao, A. and Rao, M., 2010. In vitro callus and in vivo leaf extract of *Gymnema sylvestre* stimulate β -cells regeneration and anti-diabetic activity in Wistar rats. *Phytomedicine*. 17, 1033-1039.
- Aksoy, C. and Severcan, F., 2012. Role of vibrational spectroscopy in stem cell research. *Journal of Spectroscopy*. 27, 167-184.
- Al-Daihan, S., Al-Faham, M., Al-shawi, N., Almayman, R., Brnawi, A. and shafi Bhat, R., 2013. Antibacterial activity and phytochemical screening of some medicinal plants commonly used in Saudi Arabia against selected pathogenic microorganisms. *Journal of King Saud University-Science*. 25, 115-120.
- Ananthan, R., Latha, M., Pari, L., Ramkumar, K.M., Baskar, C.G. and Bai, V.N., 2003. Effect of *Gymnema montanum* on blood glucose, plasma insulin, and carbohydrate metabolic enzymes in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*. 6, 43-49.
- Association, A.D., 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37, S81-S90.
- Baloglu, F.K., Garip, S., Heise, S., Brockmann, G. and Severcan, F., 2015. FTIR imaging of structural changes in visceral and subcutaneous adiposity and brown to white adipocyte transdifferentiation. *Analyst*. 140, 2205-2214.
- Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H., 2011. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23e, 23 ed. The McGraw-Hill Companies.
- Buettner, R., Schölmerich, J. and Bollheimer, L.C., 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 15, 798-808.
- Cao, J., Ng, E.S., McNaughton, D., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., Tobin, M.J. and Heraud, P., 2013. The characterisation of pluripotent and multipotent stem cells using Fourier transform infrared microspectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 17453-17476.
- Charan, J. and Kantharia, N., 2013. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 4, 303.

- Chen, J.-J. and Li, X.-R., 2007. Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 16, 290-294.
- Cherdshewasart, W., Bhuntaku, P., Panriansaen, R., Dahlan, W. and Malaivijitnond, S., 2008. Androgen disruption and toxicity tests of *Butea superba* Roxb., a traditional herb used for treatment of erectile dysfunction, in male rats. *Maturitas*. 60, 131-137.
- Chou, S.-M., Lai, W.-J., Hong, T.-W., Lai, J.-Y., Tsai, S.-H., Chen, Y.-H., Yu, S.-H., Kao, C.-H., Chu, R. and Ding, S.-T., 2014. Synergistic property of cordycepin in cultivated *Cordyceps militaris*-mediated apoptosis in human leukemia cells. *Phytomedicine*. 21, 1516-1524.
- Couillard, C., Mauriege, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C. and Despres, J., 2000. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *International Journal of Obesity*. 24, 782-788.
- da Silva Xavier, G., Leclerc, I., Varadi, A., Tsuboi, T., Moule, S.K. and Rutter, G.A., 2003. Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. *Biochemical Journal*. 371, 761-774.
- de Freitas Junior, L.M. and de Almeida Jr, E.B., 2017. Medicinal plants for the treatment of obesity: ethnopharmacological approach and chemical and biological studies. *American Journal of Translational Research*. 9, 2050.
- Dong, C.-H. and Yao, Y.-J., 2008. In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *LWT-Food Science and Technology*. 41, 669-677.
- Dritsa, V., 2012. FT-IR spectroscopy in medicine, *Infrared Spectroscopy-Life and Biomedical Sciences*. Rijeka, InTech.
- Dunkhunthod, B., Thumanu, K. and Eumkeb, G., 2017. Application of FTIR microspectroscopy for monitoring and discrimination of the anti-adipogenesis activity of baicalein in 3T3-L1 adipocytes. *Vibrational Spectroscopy*. 89, 92-101.

- El Shafey, A.A., El-Ezabi, M.M., Seliem, M.M., Ouda, H.H. and Ibrahim, D.S., 2013. Effect of *Gymnema sylvestre* R. Br. leaves extract on certain physiological parameters of diabetic rats. *Journal of King Saud University-Science*. 25, 135-141.
- Eumkeb, G., Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T. and Naknarong, W., 2017. The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice. *Natural Product Research*. 31, 672-675.
- Fatma El Zahraa, Z., Mahmoud, M.F., El Maraghy, N.N. and Ahmed, A.F., 2012. Effect of *Cordyceps sinensis* and taurine either alone or in combination on streptozotocin induced diabetes. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 1159-1165.
- Gao, M., Ma, Y. and Liu, D., 2015. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PloS One*. 10, e0119784.
- Garip, S., Gozen, A.C. and Severcan, F., 2009. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. *Food Chemistry*. 113, 1301-1307.
- Gasparri, F. and Muzio, M., 2003. Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemical Journal*. 369, 239-248.
- Green, H. and Meuth, M., 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 3, 127-133.
- Guo, P., Kai, Q., Gao, J., Lian, Z.-q., Wu, C.-m., Wu, C.-a. and Zhu, H.-b., 2010. Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of AMP-activated protein kinase. *Journal of Pharmacological Sciences*. 113, 395-403.
- Hansson, G.K., 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*. 352, 1685-1695.
- Heraud, P., Ng, E.S., Caine, S., Qing, C.Y., Hirst, C., Mayberry, R., Bruce, A., Wood, B.R., McNaughton, D. and Stanley, E.G., 2010. Fourier transform infrared microspectroscopy identifies early lineage commitment in differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. 4, 140-147.
- Hu, S., Wang, J., Li, Z., Fu, J., Wang, Y. and Xue, C., 2014. Hpyerglycemic effect of a mixture of sea cucumber and *Cordyceps sinensis* in streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Ocean University of China*. 13, 271-277.

- Ito, M., Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K. and Naruse, A., 2001. Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 9, 71-78.
- Jialal, I. and Devaraj, S., 1996. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry*. 42, 498-506.
- Kadan, S., Saad, B., Sasson, Y. and Zaid, H., 2016. In vitro evaluation of anti-diabetic activity and cytotoxicity of chemically analysed *Ocimum basilicum* extracts. *Food Chemistry*. 196, 1066-1074.
- Kan, W.-C., Wang, H.-Y., Chien, C.-C., Li, S.-L., Chen, Y.-C., Chang, L.-H., Cheng, C.-H., Tsai, W.-C., Hwang, J.-C. and Su, S.-B., 2012. Effects of extract from solid-state fermented *Cordyceps sinensis* on type 2 diabetes mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012.
- Kang, Y.-R., Lee, H.-Y., Kim, J.-H., Moon, D.-I., Seo, M.-Y., Park, S.-H., Choi, K.-H., Kim, C.-R., Kim, S.-H. and Oh, J.-H., 2012. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Laboratory Animal Research*. 28, 23-29.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J., 2011. *Basic & Clinical Pharmacology*, 11e, 11 ed. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Kelly, T., Yang, W., Chen, C.S., Reynolds, K. and He, J., 2008. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity*. 32, 1431-7.
- Kiho, T., Yamane, A., Hui, J., Usui, S. and Ukai, S., 1996. Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 19, 294-296.
- Kim, H.-S., Kim, M.-A., Jang, S.-H., Lee, W.-K., Ryu, J.-Y. and Lee, C.-S., 2012. Anti-hyperlipidemic effects of *Cordyceps militaris* hot-water extract. *Journal of Environmental Science International*. 21, 875-881.
- Koh, J.-H., Kim, J.-M., Chang, U.-J. and Suh, H.-J., 2003. Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 26, 84-87.

- Kopelman, P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*. 404, 635-643.
- Kotsyubynskyy, D., Molchanov, S. and Gryff-Keller, A., 2004. Creatinine and creatinium cation in DMSO-d₆ solution. Structure and restricted internal rotation of NH₂ group. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 42, 1027-1036.
- Krilov, D., Balarin, M., Kosović, M., Gamulin, O. and Brnjas-Kraljević, J., 2009. FT-IR spectroscopy of lipoproteins—A comparative study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 73, 701-706.
- Kumar, R., Negi, P., Singh, B., Ilavazhagan, G., Bhargava, K. and Sethy, N.K., 2011. *Cordyceps sinensis* promotes exercise endurance capacity of rats by activating skeletal muscle metabolic regulators. *Journal of Ethnopharmacology*. 136, 260-266.
- Kumthekar, M.M. and Katyare, S.S., 1992. Altered kinetic attributes of Na (+)+ K (+)-ATPase activity in kidney, brain and erythrocyte membranes in alloxan-diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 30, 26-32.
- Lamberti, A., Sanges, C. and Arcari, P., 2010. FT-IR spectromicroscopy of mammalian cell cultures during necrosis and apoptosis induced by drugs. *Journal of Spectroscopy*. 24, 535-546.
- Lara-Castro, C. and Garvey, W.T., 2008. Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 37, 841-856.
- Latha, M. and Pari, L., 2003. Preventive effects of *Cassia auriculata* L. flowers on brain lipid peroxidation in rats treated with streptozotocin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 243, 23-28.
- Li, S., Zhang, G., Zeng, Q., Huang, Z., Wang, Y., Dong, T. and Tsim, K.W.K., 2006. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine*. 13, 428-433.
- Liao, C.-C., Ou, T.-T., Wu, C.-H. and Wang, C.-J., 2013. Prevention of diet-induced hyperlipidemia and obesity by caffeic acid in C57BL/6 mice through regulation of hepatic lipogenesis gene expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 11082-11088.

- Lo, H.-C., Hsu, T.-H., Tu, S.-T. and Lin, K.-C., 2006. Anti-hyperglycemic activity of natural and fermented *Cordyceps sinensis* in rats with diabetes induced by nicotinamide and streptozotocin. *The American Journal of Chinese Medicine*. 34, 819-832.
- Ma, L., Zhang, S. and Du, M., 2015. Cordycepin from *Cordyceps militaris* prevents hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice. *Nutrition Research*. 35, 431-439.
- Mall, G.K., Mishra, P.K. and Prakash, V., 2009. Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Gymnema sylvestre* in alloxan induced diabetic rats. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 4, 37-42.
- Mantsch, H., Yang, P. and Casal, H., 1986. Infrared spectrometry of living systems: current trends and perspectives. *Journal of Molecular Structure*. 141, 237-242.
- Mayer, M.A., Hocht, C., Puyó, A. and Taira, C.A., 2009. Recent advances in obesity pharmacotherapy. *Current Clinical Pharmacology*. 4, 53-61.
- Miegeue, P., St-Pierre, D.H., Lapointe, M., Poursharifi, P., Lu, H., Gupta, A. and Cianflone, K., 2013. Substance P decreases fat storage and increases adipocytokine production in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 304, G420-G427.
- Mitra, S., Gopumadhavan, S., Muralidhar, T., Anturlikar, S. and Sujatha, M., 1995. Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated haemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 33, 798-800.
- Mohajeri, D. and Sefidan, A.M., 2013. Inhibitory effects of *Solanum lycopersicum* L. on high fat diet-induced fatty liver disease in rats. *Advanced Biomedical Research*. 4, 33-39.
- Nakamura, K., Shinozuka, K. and Yoshikawa, N., 2015. Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Pharmacological Sciences*. 127, 53-56.
- Pepato, M.T., Mori, D., Baviera, A.M., Harami, J., Vendramini, R.C. and Brunetti, I.L., 2005. Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 96, 43-48.

- Peungvicha, P., Thirawarapan, S.S., Temsiririrkkul, R., Watanabe, H., Prasain, J.K. and Kadota, S., 1998. Hypoglycemic effect of the water extract of *Piper sarmentosum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 60, 27-32.
- Prabhu, S. and Vijayakumar, S., 2014. Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Gymnema sylvestre* (R. Br) leaves extract on streptozotocin induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 4, 425-430.
- Prasain, J.K., 2013. Pharmacological Effects of Cordyceps and Its Bioactive Compounds. *Studies in Natural Products Chemistry*. 40, 453.
- Ramirez-Zacarias, J., Castro-Munozledo, F. and Kuri-Harcuch, W., 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 97, 493-497.
- Ramkumar, K.M., Ponmanickam, P., Velayuthaprabhu, S., Archunan, G. and Rajaguru, P., 2009. Protective effect of *Gymnema montanum* against renal damage in experimental diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 2516-2521.
- Ramkumar, K.M., Vijayakumar, R.S., Ponmanickam, P., Velayuthaprabhu, S., Archunan, G. and Rajaguru, P., 2008. Antihyperlipidaemic Effect of *Gymnema montanum*: A Study on Lipid Profile and Fatty Acid Composition in Experimental Diabetes. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 103, 538-545.
- Rupasinghe, H.V., Wang, L., Huber, G.M. and Pitts, N.L., 2008. Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chemistry*. 107, 1217-1224.
- Savithamma, N., Rao, M.L. and Suhrulatha, D., 2011. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 8, 579-584.
- Senthilkumar, T., Sangeetha, N. and Ashokkumar, N., 2012. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and renoprotective effects of *Chlorella pyrenoidosa* in diabetic rats exposed to cadmium. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 22, 617-624.
- Settharaksa, S., Madaka, F., Sueree, L., Kittiwisut, S., Sakunpak, A., Moton, C. and Charoenchai, L., 2014. Effect of solvent types on phenolic, flavonoid contents and antioxidant activities of *Syzygium gratum* (Wight) SN. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6, 114-116.

- Shepherd, P.R., Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F. and Kahn, B.B., 1993. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 22243-22246.
- Shimada, T., Hiramatsu, N., Kasai, A., Mukai, M., Okamura, M., Yao, J., Huang, T., Tamai, M., Takahashi, S., Nakamura, T. and Kitamura, M., 2008. Suppression of adipocyte differentiation by *Cordyceps militaris* through activation of the aryl hydrocarbon receptor. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 295, E859-67.
- Shimizu, K., Ozeki, M., Iino, A., Nakajyo, S., Urakawa, N. and Atsuchi, M., 2001. Structure-activity relationships of triterpenoid derivatives extracted from *Gymnema inodorum* leaves on glucose absorption. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 86, 223-229.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M., 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 152-178.
- Siriwong, S., Teethaisong, Y., Thumanu, K., Dunkhunthod, B. and Eumkeb, G., 2016. The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 17.
- Sorisky, A., Magun, R. and Gagnon, A., 2000. Adipose cell apoptosis: death in the energy depot. *International Journal of Obesity*. 24, S3-S7.
- Student, A.K., Hsu, R. and Lane, M., 1980. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 255, 4745-4750.
- Sung, G.-H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.-M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B. and Spatafora, J.W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*. 57, 5-59.
- Takahashi, S., Tamai, M., Nakajima, S., Kato, H., Johno, H., Nakamura, T. and Kitamura, M., 2012. Blockade of adipocyte differentiation by cordycepin. *British Journal of Pharmacology*. 167, 561-575.
- Teerawattananon, Y. and Luz, A., 2017. Obesity in Thailand and its economic cost estimation. *ADB Working Paper Series*, Tokyo.

- Turner, N., Cooney, G.J., Kraegen, E.W. and Bruce, C.R., 2014. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *Journal of Endocrinology*. 220, T61-T79.
- Venkateswaran, S. and Pari, L., 2002. Effect of *Coccinia indica* on blood glucose, insulin and key hepatic enzymes in experimental diabetes. *Pharmaceutical Biology*. 40, 165-170.
- Wagner, H., 2011. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*. 82, 34-37.
- Wagner, H. and Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16, 97-110.
- Wang, B.-S., Lee, C.P., Chen, Z.-T., Yu, H.M. and Duh, P.-D., 2012. Comparison of the hepatoprotective activity between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis*. *Journal of Functional Foods*. 4, 489-495.
- Williams, G., 2010. Withdrawal of sibutramine in Europe. *British Medical Journal*. 340, c824.
- Wood, R.J., 2008. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutrition Reviews*. 66, 40-46.
- World Health Organization, 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic, World Health Organization, Geneva.
- Wu, C., Guo, Y., Su, Y., Zhang, X., Luan, H., Zhang, X., Zhu, H., He, H., Wang, X. and Sun, G., 2014. Cordycepin activates AMP-activated protein kinase (AMPK) via interaction with the γ 1 subunit. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 18, 293-304.
- Wylie-Rosett, J., Segal-Isaacson, C. and Segal-Isaacson, A., 2004. Carbohydrates and increases in obesity: does the type of carbohydrate make a difference? *Obesity Research*. 12, 124S-129S.
- Yadav, R. and Agarwala, M., 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*. 3, 10-14.
- Yang, Z.-H., Miyahara, H., Takeo, J. and Katayama, M., 2012. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 4, 32.

- Yinrun Ding, C.X., Wu, Q., Xie, Y., Li, X., Hu, H. and Li, L., 2016. The mechanisms underlying the hypolipidaemic effects of *Grifola frondosa* in the liver of rats. *Frontiers in Microbiology*. 7.
- Yoon, Y.-I., Chung, M.Y., Hwang, J.-S., Han, M.S., Goo, T.-W. and Yun, E.-Y., 2015. *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae confer resistance to obesity in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*. 7, 1978-1991.
- Yu, S.-H., Chen, S.-Y.T., Li, W.-S., Dubey, N.K., Chen, W.-H., Chuu, J.-J., Leu, S.-J. and Deng, W.-P., 2015. Hypoglycemic activity through a novel combination of fruiting body and mycelia of *Cordyceps militaris* in high-fat diet-induced type 2 diabetes mellitus mice. *Journal of Diabetes Research*. 2015.
- Zhang, G., Huang, Y., Bian, Y., Wong, J.H., Ng, T. and Wang, H., 2006. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72, 1152-1156.
- Zhang, X., Mao, S., Luo, G., Wei, J., Berggren-Söderlund, M., Nilsson-Ehle, P. and Xu, N., 2011. Effects of simvastatin on apolipoprotein M in vivo and in vitro. *Lipids in Health and Disease*. 10, 112.
- Zhou, T., Chen, Y., Yoo, J., Huang, Y., Lee, J., Jang, H., Shin, S., Kim, H., Cho, J. and Kim, I., 2009. Effects of chitoooligosaccharide supplementation on performance, blood characteristics, relative organ weight, and meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*. 88, 593-600.



ภาคผนวก
อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1

B.1 Phosphate buffer saline (PBS), 1X, pH 7.4

KH_2PO_4	0.144 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.795 g
NaCl	9.0 g
DI water	1 L

Adjust pH to 7.2 ± 0.1 and filter sterile (store at 4°C).

B.2 Trypsin/EDTA preparation

Trypsin	0.25 g
EDTA	0.04 g
PBS, 1X	100 ml

Filter sterile and aliquot (store at 4°C).

B.3 Culture media preparation

FBS (heat inactivated)

- Slowly thaw the frozen FBS in a beaker filled with water.
- Put in water bath at 37°C till completely thaw.
- Heat inactivate (56°C , 20 min), gentle mix every 10 min.
- Aliquot 45 ml into conical tubes.

(Store at -20°C).

HEPES buffer, 1M

- HEPES 23.83 g
- DI water 100 ml

Filter sterile and aliquot (store at -20°C).

Penicillin/Streptomycin, 100X

- | | |
|----------------|--------|
| - Penicillin | 0.6 g |
| - Streptomycin | 1.34 g |
| - PBS, 1X | 100 ml |

Filter sterile and aliquot (store at -20 °C).

DMEM, high glucose, 1X (incomplete medium)

- | | |
|---|-------|
| - DMEM, high glucose, 1X with L-glutamine and phenol red 1 pack | |
| - NaHCO ₃ | 3.7 g |
| - DI water | 1 L |

Adjust pH to 7.2-7.4 and filter sterile (store at 4 °C).

DMEM, high glucose, 1X (complete medium)

- | | |
|---------------------------|-------|
| - Inactivated FBS | 20 ml |
| - Penicillin/Streptomycin | 2 ml |
| - HEPES buffer, 1M | 3 ml |

Adjust volume to 200 ml with DMEM, high glucose, 1X (incomplete medium)

(Store at 4 °C).

Output ที่ได้จากโครงการ

Proceedings:

Tiamyom, K., Sirichaiwetchakoon, K. and Eumkeb, G., (2018). Anti-hyperlipidemic Effect of *Cordyceps sinensis* Extract on Mice, in: Srichana, T. (Ed.), The 5th Current Drug Development 2018 (CDD 2018) and the 3rd Herbal and Traditional Medicine 2018 (HTM2018), Conference proceedings, Oral: OH08. May 23-25, 2018. Prince of Songkla University, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, pp. 102-105.

Publication:

Tiamyom, K., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T., Kupittayanant, S., Srisawat, R., Thaeomor, A., and Eumkeb, G. (2019). The effects of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Saec. and *Gymnema inodorum* (Lour.) Decne. extracts on adipogenesis and lipase activity *in vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. vol. 2019, Article ID 5370473, 13 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/5370473>.

(Impact Factor 2017 = 2.064; ISI Web of Science = Q2)

Anti-hyperlipidemic Effect of *Cordyceps sinensis* Extract on Mice

Kanokwan Tiomyom¹, Kittipot Sirichaiwetchakoon¹, Griangsak Eumkeb¹

¹School of Preclinic, Institute of Science, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, Thailand.

E-mail address: kanokwan.fateema@gmail.com

Abstract- The present study aimed to investigate the anti-hyperlipidemic effect of *Cordyceps sinensis* extract (CSE) on high-fat diet-induced hyperlipidemia in mice. Four of the five groups of ICR male mice (not including the normal group) were fed with high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Three of these four groups were administered a high-fat diet supplemented with CSE (150 or 300 mg/kg BW/day) or simvastatin (20 mg/kg BW/day). The blood cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) level of all CSE treated groups were significantly lower than control group ($p < 0.05$). Also, Alanine aminotransferase (ALT) and Alkaline Phosphatase (ALP) levels of CSE treated groups were not a significant difference from the non-HFD control group ($p > 0.05$). These findings represent the first report and may indicate that the CSE is capable of lowering lipid profiles. So, the CSE may be further developed to the novel lipid-lowering drug for the management of overweight or obesity.

Introduction

Over the past to the present, the prevalence of obesity is increasing rate in developed and developing countries throughout the world. Global burden of obesity found that obese adults in 2005 were 396 million and in 2030 the respective number of obese adults was projected to be 573 million individuals without adjusting for secular trends¹. Though it is highly prevalent in developed countries, obesity is quickly growing to be of concern in low- and middle-income countries such as Thailand. In Thailand, the ministry of public health estimated the health impact of obesity among Thai population regarding the obesity-attributable fraction, which reflects the proportion of the incidence of comorbidity in the Thai population due to obesity. Obesity contributes to 25% and 52% of diabetes cases in males and females, respectively².

At present, because of dissatisfaction with high costs and potentially hazardous side-effects, the potential of natural products for treating obesity is under exploration, and this may be an excellent alternative strategy for developing future effective, safe anti-obesity drugs³⁻⁵. *Cordyceps sinensis* is a traditional food and medicine in Asia; those have received intense attention in recent years⁶⁻⁹.

However, no work has been investigated on the effect of *Cordyceps sinensis* on prevention of hyperlipidemia in mice. Thus, this study was aimed to investigate the anti-hyperlipidemic effect of CSE on mice. Finally, this investigation may offer the potential to develop a new generation of phytopharmaceuticals products for the prevention of hyperlipidemia.

Materials and Methods

1) *Materials*: The extraction of *Cordyceps sinensis* was supported by CordyThai Company, LTD, Thailand. Thirty-five adult male mice (ICR mouse), aged about 8 weeks, weighing 30-40 g, were obtained from the Animal Care Building, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

2) *Experimental of hyperlipidemia prevention*: Mice were received HFD (60% Lipid-containing) for hyperlipidemia-inducing. The experimental protocol was approved in accordance with a guideline for the care and use of laboratory animal by animal care and use committee (ACUC), Suranaree University of Technology. The mice were divided into five groups (7 mice/group). The first group received normal diet, fed with 5% tween 80, and was used as normal control (non-HFD). Group 2 was received HFD (60% Lipid-containing), fed with 5% tween 80, and was used as negative control (HFD). The treated groups were fed with HFD plus CSE 150, 300 mg/kg BW/day, and simvastatin 20 mg/kg BW/day (a positive control) respectively. Each group was maintained on their diet ad libitum for 12 weeks. Before treatment (Pre-treatment), all mice in these groups were collected blood for chemistry analysis (LDL-c, Cholesterol, Triglyceride, ALT, and ALP) to compare with after treatment (Post-treatment) and comparable

in each group. At the end of the experiment, the animal was sacrificed. Blood was collected for chemistry analysis (LDL-c, Cholesterol, Triglyceride, ALT, and ALP).

3) *Measurement of body weight and food intake*: The body weight of each mouse was measured every week. For each mouse, average daily food intakes were calculated.

4) *Serum biochemistry*: At the end of the experiment, blood samples were collected by cardiac puncture under ether anesthesia and were partly used for hematology. From the remainder blood serum was prepared centrifugation at 1000×g for 30 minutes and keep at -20 °C for blood chemistry analysis, including LDL-c, Cholesterol, Triglyceride, ALT, and ALP. The assay was performed with automated analytical systems at the Animal Care Building, Suranaree University of Technology¹⁰.

5) *Statistical analysis*: All data were presented as the mean ± SEM. Differences between pre- and post- treatment groups were analyzed by paired student's *t-test*. The significant differences between each groups were compared by using ANCOVA. The Tukey HSD post hoc test at $p < 0.05$ was also considered as statistically significant difference between each group^{11, 12}.

Results and discussion

Effect of CSE on serum lipid profiles

The results showed that all treated groups showed the significantly higher lipid profile than the untreated-HFD group (Fig. 1). Among the HFD-treated groups, the results revealed that all treated groups exhibited significantly lower lipid profiles (LDL-c, Cholesterol, Triglyceride) than those of the controls ($p < 0.05$) (Fig. 1). Interestingly, the LDL, Cholesterol, and Triglyceride levels of CSE at 300 mg/kg BW/day treated group was not significantly different from the simvastatin-treated group ($p > 0.05$).

Effect of CSE on food intake and body weight

The food intake of the non-HFD group was significantly higher than those of HFD- and HFD-plus-test agent groups ($p < 0.05$). While this parameter of all treated groups was not significantly different from the untreated-HFD group ($p > 0.05$). The body weight results displayed that the average body weight of the HFD group was significantly higher than those of non-HFD and other HFD-treated groups ($p < 0.05$). Furthermore, the body weight of all CSE (300) or simvastatin treated groups were not significant differences from the non-HFD control group ($p > 0.05$) (data are not shown).

Biochemical parameters in serum

The HFD group displayed higher ALT and ALP level than other groups ($p < 0.05$). Although, the ALT and ALP level of CSE or simvastatin-treated groups were not a significant difference from the non-HFD control group ($p > 0.05$) (data are not shown).

Discussion

The results of this study presented that CSE at 150 and 300 mg/kg BW/day could reduce serum cholesterol, triglyceride, and LDL-c levels in HFD-induced hyperlipidemia mice. The previous study reported that the cultured mycelium of *C. sinensis* had significantly reduced cholesterol, triglycerides, and synthesis of VLDL, the precursor of LDL in mice^{11, 13}. The potential mechanisms of cordyceps have been reported that its induced AMPK activation. Cordycepin would mainly reduce oleic acid-elicited intracellular lipid accumulation and increased AMPK activity¹⁴. Koh et al. indicated that cultured mycelium of *C. sinensis* extract lowered the serum total cholesterol level in mice due to a reduction in the activity of the liver enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase¹³. Therefore it is suggested that the reduced cholesterol level effect of CSE might be mediated by several mechanisms. Hence reduced lipid profile can be another potential mechanism to prevent obesity. Our results provide evidence for obesity biomarkers developing adapted the effectiveness of medicine for obesity treatment in obese patients.

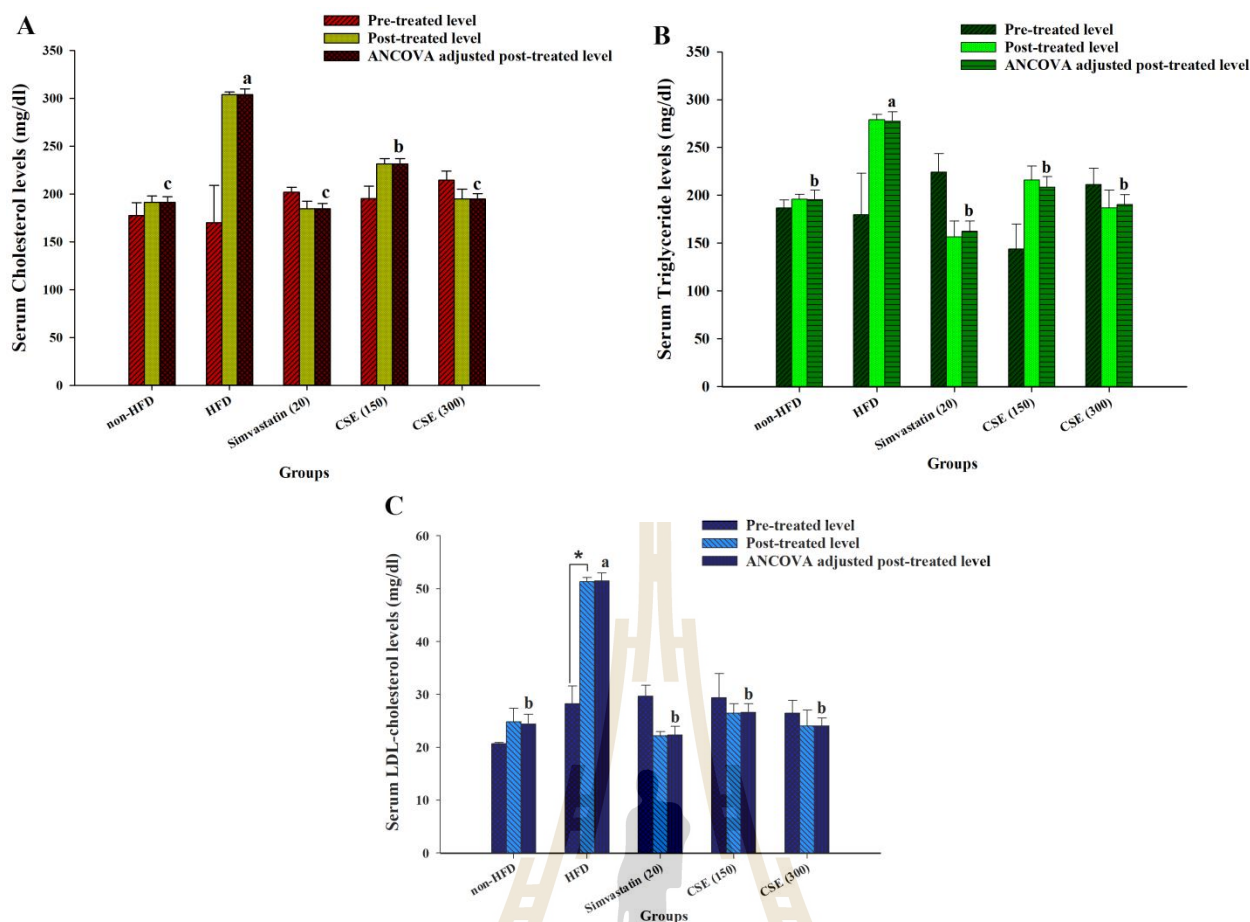


Fig. 1 Effects of CSE on serum cholesterol, triglyceride, and LDL-c levels in ICR mice. (A) Serum cholesterol, (B) serum triglyceride, (C) serum LDL-c in mice (n = 7). Non-HFD = Normal group; HFD = High-Fat Diet group; Simvastatin (20) = Simvastatin 20 mg/kg BW/day; CSE (150) = CSE 150 mg/kg BW/day; CSE (300) = CSE 300 mg/kg BW/day. The significant difference between pre- and post-test in each group were compared using paired Student t-test at * $p < 0.05$. A significant difference between ANCOVA adjusted post-treated level in each group, means sharing the different superscript letters, was compared using ANCOVA and Tukey's HSD post hoc test at $p < 0.05$.

Acknowledgment

The authors are indebted and grateful to the One Research One Grant (OROG) scholarship from Suranaree University of Technology, for assistance in research funds support. The authors are also grateful for CordyThai Company, LTD, Thailand, for supporting *Cordyceps sinensis* extract.

Document number of IACUC approval: U1-04225-2559

Reference(s)

- Kelly, T.; Yang, W.; Chen, C.-S.; Reynolds, K.; He, J. *International journal of obesity* **2008**, 32, (9), 1431.
- Teerawattananon, Y.; Luz, A. *Obesity in Thailand and its economic cost estimation*; ADBI Working Paper Series: 2017.
- Savithamma, N.; Rao, M. L.; Suhrulatha, D. *Middle-East Journal of Scientific Research* **2011**, 8, (3), 579-584.
- Mayer, M. A.; Hocht, C.; Puyó, A.; Taira, C. A. *Current clinical pharmacology* **2009**, 4, (1), 53-61.
- Kopelman, P. G. *Nature* **2000**, 404, (6778), 635-643.
- Fatma El Zahraa, Z.; Mahmoud, M. F.; El Maraghy, N. N.; Ahmed, A. F. *Food and chemical toxicology* **2012**, 50, (3), 1159-1165.
- Guo, P.; Kai, Q.; Gao, J.; Lian, Z.-q.; Wu, C.-m.; Wu, C.-a.; Zhu, H.-b. *Journal of pharmacological sciences* **2010**, 113, (4), 395-403.

8. Hu, S.; Wang, J.; Li, Z.; Fu, J.; Wang, Y.; Xue, C. *Journal of Ocean University of China* **2014**, 13, (2), 271-277.
9. Kan, W.-C.; Wang, H.-Y.; Chien, C.-C.; Li, S.-L.; Chen, Y.-C.; Chang, L.-H.; Cheng, C.-H.; Tsai, W.-C.; Hwang, J.-C.; Su, S.-B. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, 2012.
10. Cherdshewasart, W.; Bhuntaku, P.; Panriansaen, R.; Dahlan, W.; Malaivijitnond, S. *Maturitas* **2008**, 60, (2), 131-137.
11. Zhang, G.; Huang, Y.; Bian, Y.; Wong, J. H.; Ng, T.; Wang, H. *Applied microbiology and biotechnology* **2006**, 72, (6), 1152-1156.
12. Wang, B.-S.; Lee, C. P.; Chen, Z.-T.; Yu, H. M.; Duh, P.-D. *Journal of Functional Foods* **2012**, 4, (2), 489-495.
13. Koh, J.-H.; Kim, J.-M.; Chang, U.-J.; Suh, H.-J. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2003**, 26, (1), 84-87.
14. Wu, C.; Guo, Y.; Su, Y.; Zhang, X.; Luan, H.; Zhang, X.; Zhu, H.; He, H.; Wang, X.; Sun, G. *Journal of cellular and molecular medicine* **2014**, 18, (2), 293-304.



Research Article

The Effects of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. and *Gymnema inodorum* (Lour.) Decne. Extracts on Adipogenesis and Lipase Activity *In Vitro*

Kanokwan Tiomyom, Kittipot Sirichaiwetchakoon, Tanaporn Hengpratom, Sajeera Kupittayanant, Rungrudee Srisawat, Atcharaporn Thaeomor, and Griangsak Eumkeb 

School of Preclinic, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 3000, Thailand

Correspondence should be addressed to Griangsak Eumkeb; griang@sut.ac.th

Received 19 January 2019; Revised 9 February 2019; Accepted 17 March 2019; Published 1 April 2019

Academic Editor: Lucindo Q. Júnior

Copyright © 2019 Kanokwan Tiomyom et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study aimed to investigate the effects of *Cordyceps sinensis* extract (CSE) and *Gymnema inodorum* extract (GIE), used alone and combined, on antiadipogenesis in 3T3-L1 cells. Oil Red O staining was used to examine the effects of these extracts on inhibition of intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes and on lipid droplet morphology. Fourier transform-infrared (FTIR) microspectroscopy was used to examine biomolecular changes in 3T3-L1 adipocytes. The pancreatic lipase assay was used to evaluate the inhibitory effects of CSE and GIE on pancreatic lipase activity. Taken together, the results indicated that CSE, GIE, and their combination suppressed lipid accumulation. The FTIR microspectroscopy results indicated that CSE, GIE, and their combination had inhibitory effects on lipid accumulation in the adipocytes. Compared with the untreated adipocytes, the signal intensity and integrated areas of glycogen and other carbohydrates, the acyl chain of phospholipids, and the lipid/protein ratios of the CSE, GIE, alone, and combined treated adipocytes were significantly lower ($p < 0.05$). Combination treatment resulted in a synergistic effect on lipid accumulation reduction in the adipocytes. Principal component analysis of the biomolecular changes revealed six distinct clusters in the FTIR spectra of the sample cells. The pancreatic lipase assay results indicated that CSE and GIE inhibited the pancreatic lipase activity in a dose-dependent manner (mean \pm standard error of the mean IC_{50} values, $2312.44 \pm 176.55 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $982.24 \pm 44.40 \mu\text{g mL}^{-1}$, resp.). Our findings indicated that FTIR microspectroscopy has potential application for evaluation of the effectiveness of medicinal plants and for the development of infrared biochemical obesity markers useful for treating patients with obesity. These results suggested that use of CSE and GIE alone and in combination may be efficacious as a complementary therapy for hyperlipidemia and obesity management. However, clinical trials in animals and humans must first be completed.

1. Introduction

The incidence of obesity has been increasing steadily in developed and developing countries worldwide. Analysis of the global burden of obesity revealed that there were 396 million adults with obesity in 2005 and that the expected number is projected to be 573 million individuals in 2030, without adjusting for secular trends [1]. Excessive fat accumulation that increases the risk of adverse health effects is one definition of obesity. Obesity is implicated as a risk

factor for various diseases (e.g., hypertension, coronary heart disease, and type II diabetes) [2, 3]. Despite the unavoidable progression of this disease and the positive effects of some medications on body weight reduction and alleviation of numerous cardiometabolic complications, large numbers of approved and wholesaled antiobesity drugs have been withdrawn due to serious adverse effects [4]. Phytochemicals present in plants traditionally used for medicinal purposes have the potential for use as newer therapeutics for obesity and other metabolic diseases [5].

Combinations of phytochemicals often occur naturally and using them in combination may significantly improve bioactivity. *Cordyceps sinensis* and *Gymnema inodorum* extracts are used as traditional food and medicine in Asia; they have received intense attention by a researcher in recent years [6–8]. Triterpenoids in *G. inodorum* leaves have an inhibitory effect on glucose absorption from the intestinal tract that relies on CH_2OH production [7]. The potential hypoglycemic and renoprotective effects of *C. sinensis* solid-state fermented mycelia extract were examined in patients with type 2 diabetes mellitus [9]. Cordycepin inhibits adipocyte differentiation and accumulation of lipid in mature adipocytes. As cordycepin blocks both adipocyte differentiation and lipid accumulation, it has the potential to be an effective therapeutic agent for obesity and obesity-related disorders [10].

Synergy research has found that standardized phyto-drugs have therapeutic equivalence to the standard drugs. Compared with synthetic drugs, they also have fewer or no side effects [11]. However, the synergistic effects of *C. sinensis* extract (CSE) plus *G. inodorum* extract (GIE) on antiadipogenesis in 3T3-L1 adipocytes have not been investigated. The objective of this study was to examine the synergistic effects of CSE plus GIE on antiadipogenesis in 3T3-L1 cells.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Cells. All chemicals were of the highest quality available (e.g., analytical grade). Bovine calf serum and 3T3-L1 mouse embryonic fibroblasts and were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin, streptomycin, fetal bovine serum (FBS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid were obtained from Gibco Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Insulin solution (bovine), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 4-nitrophenyl dodecanoate (pNP laurate), porcine pancreas lipase, and simvastatin (SIM) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Carlo Erba Reagents S.r.l. (Chaussée du Vexin, Val de Reuil, USA). Dexamethasone was obtained from G Bioscience (St. Louis, USA). Oil Red O was purchased from Amresco Inc. (Solon, OH, USA).

2.2. Preparation of Plant Extracts. The *C. sinensis* extract was obtained from the CordyThai Company, Ltd., Thailand. The identity of the specimen was authenticated by a microbiologist at Kasetsart University (Bangkok, Thailand). Leaves of *G. inodorum* were collected from the Chiangda organic company garden (Chiang Mai, Thailand). These plant specimens were authenticated by Dr. Santi Wattana, a lecturer and plant biologist at the Institute of Science, Suranaree University of Technology. A specimen was deposited in the botanical garden, Suranaree University of Technology.

A 250-g dried powder of *G. inodorum* was soaked in 750 mL 95% ethanol at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) for 7 days

with occasional stirring. After 7 days, the ethanol extract was filtered (Whatman no. 1 filter paper) and concentrated using a rotary evaporator at reduced pressure and $<50^\circ\text{C}$. The concentrated extract was collected in a petri dish and air-dried to the point of complete evaporation of the ethanol. The blackish-green semisolid extract was kept at -20°C until use [12].

2.3. Preliminary Qualitative Phytochemical Screening Tests. The preliminary qualitative phytochemical screening analysis was performed as previously described, with some modification [13–15]. The chemical compounds of extract constituents (i.e., tannins, saponins, alkaloids, flavonoids, steroids, and glycosides) were tested.

2.4. Quantitative Estimation of Chemical Constituents

2.4.1. Total Phenolic Content. The Folin–Ciocalteu assay was used to investigate the total phenolic content as previously described by Singleton et al. [16] and Rupasinghe et al. [17], with little modification. Briefly, 100 μL 0.2 M Folin–Ciocalteu, 20 μL CSE or GIE, and various concentrations (0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.015, 0.02, and 0.0625 mg mL^{-1} in 100% methanol) of gallic acid were added to each well of 96-well plates. Then 80 μL 7.5% (w/v) sodium carbonate was added to each well and the samples were incubated for 2 h at room temperature. The absorbance of the resulting blue color solution was measured using a spectrophotometer (wavelength, 765 nm). A gallic acid standard curve was used to determine the total phenolic content. The results were expressed as mg gallic acid equivalents (mg GAE/g) per g of dry weight.

2.4.2. Total Flavonoid Content. The total flavonoid content was measured using the aluminium chloride colorimetric assay following Chen et al.'s and Settharaksa et al.'s methods [18, 19], with little modification. Briefly, 125 μL distilled water, 25 μL standard catechin at various concentrations (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 mg mL^{-1}) or CSE or GIE, and 10 μL 5% NaNO_2 were mixed in each well of 96-well plates. The samples were then incubated for 6 min at room temperature and 15 μL 10% AlCl_3 solution was added to each well. The plates were incubated for 5 min at room temperature and then 50 μL 1 M NaOH was added. Each plate was shaken in a microplate reader spectrophotometer for 5 min before measuring absorbance (wavelength, 595 nm). A catechin standard curve was used to determine the total flavonoid content. The results were presented as mg catechin equivalents (mg CE/g) per gram of dry weight.

2.5. Cell Culture. Phitaktim et al.'s methods with some modifications were used for 3T3-L1 preadipocyte culture and differentiation [20]. The culture medium was high-glucose DMEM supplemented with 10% bovine calf serum, 1.5 mg mL^{-1} sodium bicarbonate, 100 U mL^{-1} penicillin, and 100 mg mL^{-1} streptomycin; the cells were grown until being confluent. The incubation conditions were 37°C , 5% CO_2 , and 95% humidity. At 2 days after confluence was observed

(day 0), the preadipocytes were induced to differentiate into adipocytes using 48-h culture in a differentiation medium containing 10% FBS, 1.0 mM dexamethasone, 0.5 mM IBMX, and 1.0 mg mL⁻¹ insulin in DMEM. At 48 h (i.e., day 2), the differentiation medium was changed to a maintenance medium (10% FBS and 1.0 mg mL⁻¹ insulin in DMEM) for another 48-h culture period (day 4). Every 48 h until day 10, the medium was replaced with newly-prepared maintenance medium. The preliminary concentration interval testing of CSE and GIE alone and combined to determine that the extracts were not toxic (i.e., not significantly different from the control) was then performed. This testing found that the dosage intervals of CSE at 10–40 µg mL⁻¹, GIE at 500–2000 µg mL⁻¹, and CSE plus GIE (CSE/GIE) at 10 + 500 µg mL⁻¹ were the correct intervals for the experiments. The SIM dosage was 1.67 µg mL⁻¹, which was the dosage used by Sirichaiwetchakoon et al. [21]. SIM was used as a positive control. During testing of preadipocyte differentiation, the cells were treated with the various obtained concentrations of CSE, GIE, and SIM alone, and with the CSE/GIE combination, for 48-h differentiation phase periods (i.e., at days 0, 2, 4, 6, and 8). The rates of differentiation into adipocytes were calculated on day 10.

2.6. In Vitro Cytotoxic Test (MTT Assay). A tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay was used to examine the cytotoxic effects of exposure to CSE, GIE, SIM alone, and CSE/GIE combination on cell proliferation [22]. The 96-well plates were seeded at a density of 5×10^3 cells/well. Cell adherence was then allowed to progress for 48 h. The cells were then subjected to a 48-h exposure of various concentrations of four compounds. The medium was then removed, and the final concentration of 0.5 mg mL⁻¹ MTT was added to each well. The cells were then incubated for 4 h at 37°C. DMSO was then used to dissolve the formazan crystals formed by viable cells and a microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) was used to measure the absorbance (wavelength, 540 nm). Linear regression analysis and a dose-response curve were used to calculate the extract concentration resulting in the death of 50% of the test cells (i.e., 50% lethal concentration (LC50)).

2.7. Oil Red O and Hematoxylin Staining. On day 10, Jarinyaporn et al.'s and Sirichaiwetchakoon et al.'s [21, 23] methods (including Oil Red O staining), with some modifications, were used to determine the rates of differentiation of preadipocytes into adipocytes that were associated with the amount of lipid accumulation. Briefly, adipogenesis of the 3T3-L1 preadipocytes was first induced using adipogenic medium; they were treated with concentrations similar to the established safe MTT concentration intervals of CSE at 10–40 µg mL⁻¹, GIE at 500–2000 µg mL⁻¹, SIM at 1.67 µg mL⁻¹, and CSE/GIE at 10 + 500 µg mL⁻¹ for 48 h. The differentiation medium was then changed to maintenance medium that included the treatment agents; this change in maintenance medium was then performed every 48 h until day 10. PBS was then used to wash the cells (twice) and then they were fixed for 1 h using formaldehyde (10%)

in PBS. Distilled water was then used to wash the cells (twice) and they were stained using a 5% Oil Red O solution in 60:40 (v/v) isopropanol:distilled water at room temperature for 30 min. The Oil Red O-stained cells were then washed with distilled water (twice) and stained with hematoxylin solution at room temperature for 10 min. An inverted fluorescence microscope (Olympus Corporation, Japan) was used to examine the stained cells. Quantification of lipid accumulation was performed after washing the Oil Red O-stained triglyceride droplets with 60% isopropanol (twice), eluting with 100% isopropanol and transferring to a new 96-well plate. A microplate spectrophotometer was used to measure absorbance (wavelength, 490 nm). The equation $(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{positive control}} - OD_{\text{blank}}) \times 100$ was used to calculate the differentiation rate (%).

The fractional effective concentration (FEC) index was calculated for each combination to measure the interaction between two agents. The FEC for each agent was calculated by dividing the concentration of the compound present in that treated group in combination where the effective concentration (EC) of the treated group showed equal or higher (or better) effect than a negative control group and those compounds treated alone. The FEC index (FECI) was calculated using the following: FEC of A compound = EC of A in combination/EC of A alone; FEC of B compound = EC of B in combination/EC of B alone; hence, FECI = FEC of A compound + FEC of B compound. When the FECI of the combination was <1.0, a combination was designated as synergistic. An FECI = 1.0 indicated “no interaction or zero-interaction” between the agents, and a value >1.0 indicated antagonism between the two compounds [24, 25].

2.8. Pancreatic Lipase Assay. The pancreatic lipase assay was used to investigate the effects of CSE and GIE on the reduction of fat digestion and absorption. Guo et al.'s and Hengpratom et al.'s [26, 27] methods, with slight modifications, were used to measure lipase activity. The supernatant of 5 mg mL⁻¹ porcine pancreas lipase type 2 in distilled water was used for the assay. The reaction buffer consisted of 0.1% (w/v) pNP laurate buffer (100 mM Tris buffer pH 8.2) and 5 mM sodium acetate (pH 5.0) containing 1% Triton X-100. The buffer was heated in boiling water for 2 min and then cooled to room temperature. Ranges in preliminary concentrations of CSE, GIE were then tested to determine the concentrations appropriate for the calculation of the IC₅₀ for lipase inhibitory activity. The concentration intervals of CSE at 1000–1600 µg mL⁻¹ and GIE at 250–1000 µg mL⁻¹ were obtained, which were almost similar to the ranges for Oil Red O staining. Fifty percent DMSO in reaction buffer was used to dissolve each test sample. The sample (20 µL) and lipases (30 mL) were added to 40 mL reaction buffer; a substrate solution (30 mL) was used to initiate the reaction. The negative control contained 50% DMSO instead of the sample. Each mixture was incubated at 37°C for 2 h. A microplate spectrophotometer (wavelength, 405 nm) was used to measure absorbance. The inhibition rate (%) was calculated as $(1 - (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{sample blank}}) / OD_{\text{negative control}}) \times 100$.

2.9. Focal Plane Array-FTIR Microspectroscopy. FTIR measurement and Siriwong et al.'s method with some modifications were used to evaluate the effects of CSE, GIE, and the CSE/GIE combination on the adipocytes [28]. The lowest concentrations of CSE ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) and GIE ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) used alone, and CSE/GIE ($10 + 500 \mu\text{g mL}^{-1}$) in combination, which the MTT assay revealed to be nontoxic and the Oil Red O staining indicated to have synergistic activity, were used to investigate biomolecular changes in the adipocytes (focal plane array-FTIR microspectroscopy). A positive control using SIM ($1.67 \mu\text{g mL}^{-1}$) at the same concentration as the MTT and Oil Red O assays was also tested. Preadipocytes, untreated adipocytes, and adipocytes treated using these agents at the above concentrations on day 10 were collected and centrifuged ($4000 \times g$, 5 min). The cells were then washed with 0.85% NaCl (once) and recentrifuged ($4000 \times g$, 5 min). The cell pellets were dropped onto a barium fluoride optical window $13 \text{ mm } \varnothing \times 2 \text{ mm}$ (Crystran, Ltd.). Excess water was removed using air drying. The dried cells were kept in a desiccator until FTIR analysis. For the FTIR microspectroscopy, each sample was evaluated in triplicate. Staff at a spectroscopy facility (Synchrotron Light Research Institute, Public Organization, Thailand) recorded the FTIR spectra using a Bruker Tensor 27 spectrometer (Globar source) coupled with a Bruker Hyperion 3000 microscope (Bruker Optics Inc., Ettlingen, Germany). The microscope was equipped with a 64×64 element mercury cadmium telluride, focal plane array detector, which allowed simultaneous acquisition of the spectral data. The FTIR samples were examined using the $15\times$ objective, and the results of 64 scans were recorded in transmission mode at a 4 cm^{-1} spectral resolution. An 8×8 binning FTIR image mosaic was constructed from the images. A spectral range of $4000\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$ was used to acquire the absorbance spectra; the single spectra were acquired from approximately $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ sample areas. OPUS 7.2 software (Bruker Optics Ltd., Ettlingen, Germany) was used to obtain the FTIR spectral data and to control the instrument system. Microcal TM origin 6.0 software (Microcal Software, Inc., Northampton, USA) was used to plot the mean values for the spectral data as a stacked view. Principal component analysis (PCA) was used to identify sample spectra variability and clustering (Unscrambler X 10.1 software, CAMO Software AS, Oslo, Norway). During spectral preprocessing, second derivative transformations were obtained using Savitzky-Golay algorithms (nine smoothing points) and were normalized using an extended multiplicative signal correction (spectral regions, $3000\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$ and $1800\text{--}950 \text{ cm}^{-1}$). This method was used to identify regions of the absorption peak overlap, to reduce variation between replicate spectra and to correct for baseline shift. Score plots (2D) and loading plots were used to represent the different data classes and the associations between data set variables, respectively. The samples' signal intensities and integrated peak areas were analyzed using OPUS 7.2 software (Bruker). The results for the signal strengths and integrated peak areas of the lipids ($3000\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$), nucleic acids, and C-O vibrations from

glycogen and other carbohydrates ($1300\text{--}950 \text{ cm}^{-1}$) were illustrated using a histogram.

2.10. Statistical Analysis. All results were expressed as a mean \pm standard error of the mean (SEM) values. The statistically significant differences between treatment and control groups for cell viability, amounts of lipid accumulation, and biomolecular changes were analyzed using one-way analysis of variance and Tukey's honestly significant difference post-hoc test. Student's t-tests were used to determine statistically significant between-group differences in lipase inhibition activity. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$ and were representative of at least three independent experiments [26, 29].

3. Results

3.1. Preliminary Phytochemical Analysis. Each lyophilized ethanol extract of *G. inodorum* was weighed to calculate the percentage yield of the extract. The percentage of yield obtained was 17.43% (w/w). The results of the preliminary qualitative phytochemical screening tests of *C. sinensis* and *G. inodorum* indicated that they contained flavonoids. *C. sinensis* contained alkaloids, tannins, and saponin and *G. inodorum* contained terpenoids and glycoside. Steroids were not found in extracts from either plant (Table 1). The total mean flavonoid content of *C. sinensis* and *G. inodorum* was 8.79 ± 2.46 and $4.99 \pm 0.63 \text{ mg CE/g}$ of dry weight, respectively. The total phenolic content of *C. sinensis* and *G. inodorum* was 0.14 ± 0.01 and $0.81 \pm 0.01 \text{ mg GAE/g}$ of dry weight, respectively.

3.2. 3T3-L1 Preadipocyte Viability Assay. The effects of CSE and GIE on preadipocyte viability were dose dependent (Figure 1). The LC_{50} values for the CSE and GIE antiproliferative effects were $112.23 \pm 0.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $3075.73 \pm 274.24 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Assessment of the viability of the 3T3-L1 cells revealed that the CSE-treated group was not significantly different from the untreated group of preadipocytes. The GIE (500–1000) and CSE/GIE combination resulted in significantly greater cell viability than the untreated preadipocyte groups ($p < 0.05$). The nontoxic concentrations of CSE, GIE, and the CSE/GIE combination were chosen for further investigation using Oil Red O staining.

3.3. Effects of CSE, GIE, and the CSE/GIE Combination on Lipid Accumulation during Adipogenesis. The effects of CSE, GIE, and the CSE/GIE combination on lipid accumulation during 10 days of preadipocyte to adipocyte differentiation were examined. The results for microscopic examination of the Oil Red O and hematoxylin-stained cells indicated that exposure to CSE and GIE resulted in decreased numbers of Oil Red O-stained droplets in mature adipocytes at 10 and $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Figure 2). The adipocyte intracellular lipid accumulation for the treated groups of CSE and GIE alone and combined was significantly decreased compared with untreated adipocytes ($p < 0.05$, Figure 3). The interaction of CSE (10) plus GIE (500) was compared to treating with

TABLE 1: Preliminary qualitative phytochemical screening of *C. sinensis* and *G. inodorum* extracts.

Phytochemical compounds	<i>Cordyceps sinensis</i>	<i>Gymnema inodorum</i>
Alkaloids	+	-
Flavonoids	+	+
Tannins	+	-
Terpenoids	-	+
Saponin	+	-
Glycoside	-	+
Steroids	-	-

(+) = presence; (-) = absence

TABLE 2: Fourier transform-infrared band assignments.

Second derivative spectra band position (cm ⁻¹)	Band assignments
2964	CH ₃ asymmetric stretch associated with membrane phospholipid methyl terminals: mainly lipid
2923	CH ₂ asymmetric stretch associated with membrane phospholipid methylene groups: mainly lipids, some contribution from proteins, carbohydrates, and nucleic acids
2854	CH ₂ symmetric stretch: mainly lipids, some contribution from proteins, carbohydrates, and nucleic acids
1735	C=O stretching vibration: lipids (triglycerides and cholesterol esters)
1650	Amide I: C=O (80%) and C-N (10%) stretching, N-H (10%) bending vibration: α -helix proteins
1542	Amide II: N-H (60%) bending and C-N (40%) stretching vibration: α -helix proteins
1457	CH ₂ bending vibration: lipids and proteins
1399	COO-symmetric stretching and CH ₃ bending vibration: lipids, proteins
1234	PO ₂ -asymmetric stretching vibration: RNA, DNA, and phospholipids
1084	PO ₂ -symmetric stretching vibration: RNA, DNA
1157	C-O vibration: glycogen and other carbohydrates
1045	C-O vibration: glycogen and other carbohydrates

only CSE or GIE. The EC for CSE (30) alone = 30 and the EC for CSE (10) in combination = 10. Therefore, the FEC for the CSE compound = 0.33. The EC for GIE (2000) alone = 2000 and the EC for GIE (500) in combination = 500. Therefore, the FEC for the GIE compound = 0.25. Thus, the FECI of the combination was 0.58 (Figure 3). These results suggested that the combination had a synergistic effect on the reduction in intracellular lipid accumulation. Intracellular fat deposit formation for SIM exposure at 1.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was significantly reduced by 54 \pm 1.37%, compared with the untreated adipocytes ($p < 0.05$) (Figure 3).

3.4. Effects of CSE and GIE on Pancreatic Lipase Activity.

Pancreatic lipase assays were performed to investigate the effects of CSE and GIE on the reduction of fat digestion and absorption. The results indicated that CSE and GIE inhibited lipase activity in a dose-dependent manner (Figure 4). Pancreatic lipase activity was also inhibited by CSE and GIE. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values were 2312.44 \pm 176.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 982.24 \pm 44.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

3.5. FTIR Microspectroscopy. The FTIR microspectroscopy technique was used to identify biomolecular changes in

groups of preadipocytes that were untreated, exposed to 1.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SIM, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CSE, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ GIE, or CSE and GIE combined (CSE (10) + GIE (500)) when they were adipocytes on day 10 after differentiation (day 0). Representative FTIR spectra for samples (wavelengths, 3000–950 cm⁻¹) are presented in Figure 5. The cells' infrared spectrum profiles for the different treatments were examined for three regions: (1) lipids (3000–2800 cm⁻¹), (2) proteins (1700–1500 cm⁻¹), and (3) carbohydrates and nucleic acids (1300–950 cm⁻¹). Detection of between-cell type differences for the spectra was difficult to achieve using an examination of only the raw spectra. Therefore, they were used for a second derivative analysis (range: 3000–2800 cm⁻¹ and 1800–950 cm⁻¹) that more clearly and precisely revealed the bands' peak positions (Figures 6(a) and 6(b), resp.). The results for the IR spectra band assignments for the samples are presented in Table 2. They indicated that the spectral differences were mostly in the lipid region (3000–2800 cm⁻¹). Strong peaks at 2923 cm⁻¹ and 2854 cm⁻¹ correspond to CH₂ asymmetry and symmetric stretching frequency, respectively; both of these were mostly associated with lipids, with some contribution from proteins, carbohydrates, and nucleic acids [30]. The signal intensity increases and increases in the areas of the peaks at 2923 cm⁻¹ and 2854 cm⁻¹ indicated lipoprotein

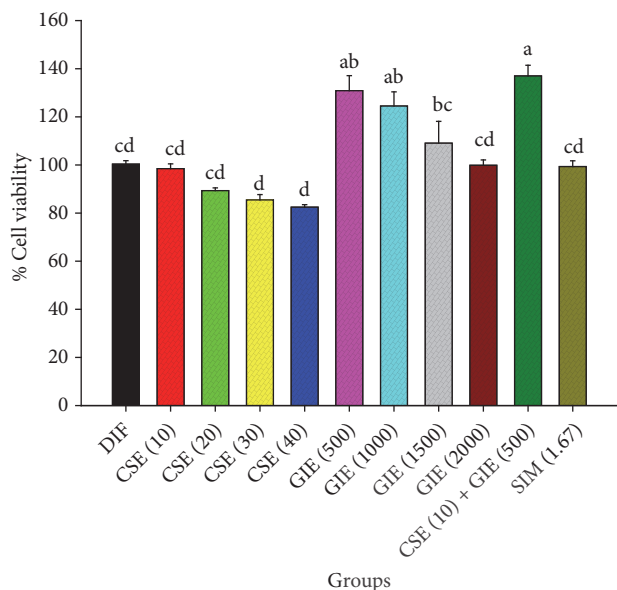


FIGURE 1: Effects of *C. sinensis* extract (CSE) and *G. inodorum* extract (GIE) used alone and combined on 3T3-L1 preadipocyte viability. DIF = differentiated adipocytes; CSE (10) = CSE at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; GIE (500) = GIE at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) + GIE (500) = CSE at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ plus GIE at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. SIM (1.67) = simvastatin at $1.67 \mu\text{g mL}^{-1}$. Each value is the mean \pm SEM of three (replicate) experiments and is expressed as population growth. The results are expressed as mean \pm SEM values. Mean values followed by the same superscript letter were not significantly different ($p < 0.05$, Tukey's test).

fractions and the small contributions from carbohydrates and nucleic acids of untreated adipocytes; they were greater than the other peaks (Figure 6(a)) [31–33]. The lipid ester C=O stretching at 1735 cm^{-1} for untreated cells had greater signal intensities and band areas than the other groups (Figure 6(b)). The peak signal intensities and areas for the preadipocytes and the SIM, CSE, and CSE/GIE combination-treated adipocytes at 1157 cm^{-1} indicated absorption peaks for C–O vibrations due to glycogen and other carbohydrates [34]; they were smaller than those for the untreated adipocytes (Figure 6(b)). The signal intensities and areas of the peaks for the preadipocytes and the SIM, CSE, and GIE and CSE/GIE combination-treated groups at 1650 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} , and 1234 cm^{-1} indicated absorption peaks for protein amide I alpha-helix (centered at 1650 cm^{-1}), amide II (centered at 1542 cm^{-1}), and the functional group of the PO_2 stretching mode, respectively. The changes of those treated groups were mostly due to changes in nucleic acids, with some contribution from phospholipids (at 1234 cm^{-1}) and were greater than the untreated group (Figure 6(b)) [34, 35].

We evaluated changes in macromolecules for preadipocytes and untreated SIM, CSE, GIE, and CSE/GIE combination-treated adipocytes, the integrated areas of the nucleic acid regions ($1313\text{--}1294 \text{ cm}^{-1}$ and $1165\text{--}1142 \text{ cm}^{-1}$), the regions for glycogen and other carbohydrates ($1255\text{--}1208 \text{ cm}^{-1}$, $1096\text{--}1073 \text{ cm}^{-1}$, and $1054\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$), and the ratios for the integrated areas for functional groups

associated with lipids and proteins (e.g., CH_2 ($2938\text{--}2907 \text{ cm}^{-1}$)/ CH_3 ($2973\text{--}2954 \text{ cm}^{-1}$) asymmetric stretching, CH_2 asymmetric stretching ($2938\text{--}2907 \text{ cm}^{-1}$)/amide I ($1673\text{--}1624 \text{ cm}^{-1}$)) [36]. The results indicated that the integrated areas for the glycogen and other carbohydrate regions in the preadipocyte and SIM, CSE, GIE, and CSE/GIE combination-treated adipocyte groups were significantly smaller than the untreated adipocyte groups. The integrated areas of the GIE-treated adipocyte group nucleic acid regions were significantly greater than the other groups ($p < 0.05$; Figure 7(a)). The values for the ratios of the integrated areas of CH_2/CH_3 asymmetric stretching (i.e., associated with the amounts of lipid acyl chain lengths of the lipids) [36] were the greatest for the untreated adipocytes and were significantly greater than the other groups ($p < 0.05$; Figure 7(b)). The statistically significant reduction in the values of the ratios of the integrated areas of CH_2 asymmetric stretching/amide I in the preadipocytes and the SIM, CSE, GIE, and CSE/GIE combination-treated groups compared with untreated adipocytes ($p < 0.05$; Figure 7(b)) might have been due to alterations in lipid and protein concentrations in each sample. PCA was used for further analysis of the second derivative spectra obtained for the six experimental groups.

Characterization of the spectral properties of biological samples can be achieved using FTIR spectroscopy. The results provide molecular information that varies with macromolecular composition and reflects changes in the absorbance of bands in the FTIR spectrum. IR spectrum molecular fingerprint region absorbance bands in the mid-IR range ($4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$) are derived from individual structure- and conformation-associated chemical bonds. PCA was used to analyze the characteristics of the biological molecules from the FTIR spectra [29]. This statistical data-reduction method transformed the original values for the variables in the data set into a new set of uncorrected variables (i.e., PCs). We used the PCA to determine the wave numbers present in the complex FTIR spectra that had the statistically significant greatest spectral variation within and between treatment groups. Similar spectra present within the dataset were visualized using scores plots, and variables (the molecular groups within the samples were represented by the spectral bands) were identified using loading plots.

The PCA modeling revealed that distinct clustering of the spectra from the treatment groups was visualized more clearly with the two-dimensional score plot PC1 compared with PC2 (Figure 8(a)). The results from the PCA score plot indicated that the clusters associated with the untreated adipocytes and the GIE-treated group were separated from the clusters associated with the preadipocytes and the SIM- and CSE-treated adipocytes along the PC1 axis (28%). Similarly, the clusters associated with the untreated adipocytes and the SIM-treated group were separated from the GIE- and CSE-treated groups along the PC2 axis (22%). The spectral regions that most contributed to the clustering (Figure 8(a)) were identified using the PCA loading plots (Figure 8(b)). The PC1-associated discrimination was likely associated with the positive loading in the C–H stretch region (centered at 2834 cm^{-1}) and the C–O vibrations associated with

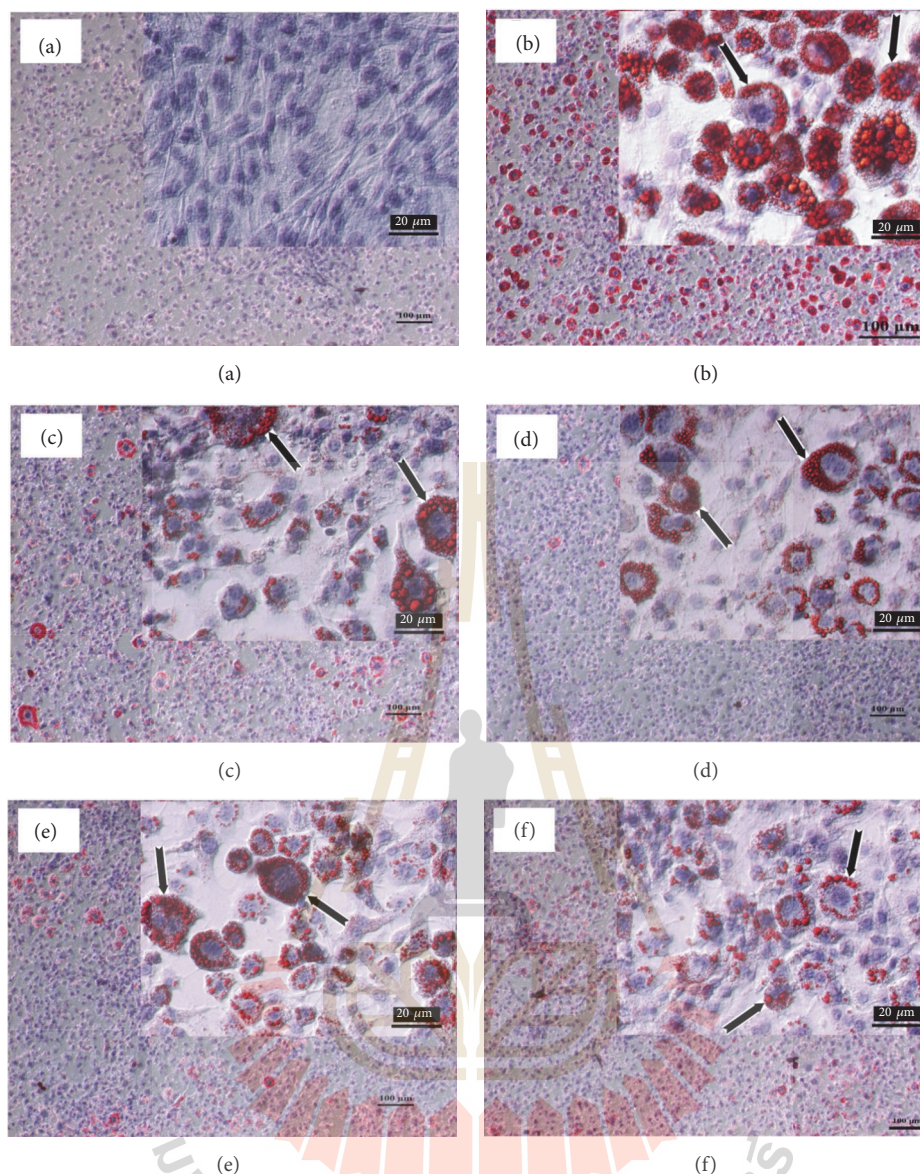


FIGURE 2: Results of Oil Red O and hematoxylin staining for intracellular lipid for six sample groups: (a) preadipocytes (nondifferentiated cells); (b) untreated adipocytes, (c) simvastatin at $1.67 \mu\text{g mL}^{-1}$; (d) CSE at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; (e) GIE at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$; (f) combination of CSE at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ plus GIE at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (original magnification $\times 100$, scale bar: $100 \mu\text{m}$; inset: $\times 600$, scale bar: $20 \mu\text{m}$.)

glycogen and other carbohydrates (centered at 1064 cm^{-1}). These characteristics separated the negative score plot of the spectra of the preadipocytes and the SIM, CSE, and CSE/GIE combination-treated adipocytes from the positive score plot of the untreated and GIE-treated adipocytes. Taken together, these results indicated that untreated and GIE-treated adipocytes had greater concentrations of nucleic acids, lipoprotein, lipid acyl chains associated with membrane lipids, and carbohydrates than the preadipocytes and the SIM, CSE, and CSE/GIE combination-treated adipocytes.

The PC2 axis discrimination result between the positive score plot for the spectra associated with untreated adipocytes, SIM, and CSE/GIE combination-treated adipocytes and the negative score plot of the spectra

associated with the preadipocytes and CSE and GIE-treated adipocytes can be explained by positive loading of the PC2 axis in the C–H stretch region (centered at 2935 cm^{-1} and at 1662 cm^{-1} (indicating amide I)). There was also negative loading of the PC2 axis in the C–H stretch region (centered at 2915 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} and at 1639 cm^{-1} (indicating amide I)).

4. Discussion

The doses used in the experiments were standardized based on the results of preliminary screening of concentration intervals. The concentration intervals from the MTT assay that were not toxic and were not significantly different from

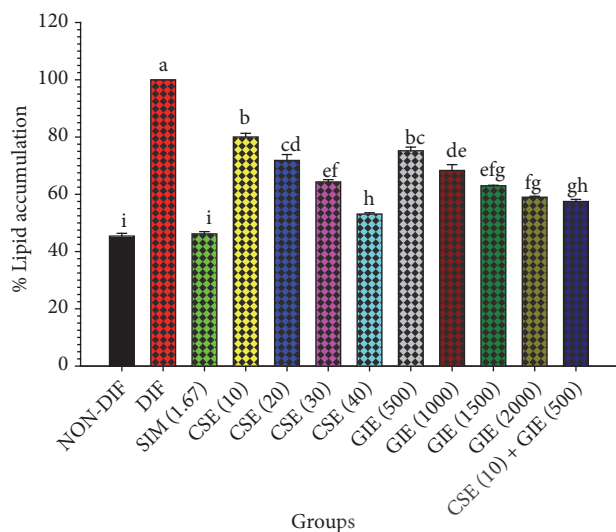


FIGURE 3: Graphical representation of the effects of CSE and GIE alone and combined on the percentage of intracellular lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 cells, after Oil Red O staining. NON-DIF = preadipocytes (nondifferentiated cells); DIF = differentiated adipocytes (untreated adipocytes); SIM (1.67) = simvastatin at 1.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) = CSE at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; GIE (500) = GIE at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; the mean \pm SEM values presented are for three replicates. Mean values followed by the same superscript letter were not statistically different ($p < 0.05$, Tukey's test).

the control were used in the subsequent experiments. The concentration intervals for the Oil Red O and FTIR assays were obtained from the safety concentration ranges of the MTT assay. The ranges for the lipase inhibition assay were selected from the results of preliminary testing of the tested extracts for the IC_{50} of lipase inhibition activity. The results of this study indicated that during adipocyte differentiation CSE and GIE alone and the CSE/GIE combination induced statistically significant reductions in lipid accumulation. CSE, GIE, and the CSE/GIE combination suppressed lipid accumulation without cytotoxicity. This antiadipogenic effect could have occurred via one or more molecular pathways. Any or all of them might result in lipid accumulation suppression during differentiation.

Treatment of mice with the extract of *C. sinensis* mycelia significantly reduces cholesterol and triglyceride concentrations and the synthesis of very-low-density lipoprotein (low-density lipoprotein precursor) [37, 38]. Therefore, a useful mechanism for obesity prevention might be inhibition of preadipocyte differentiation. Our results revealed that the range in CSE (10–40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) that could reduce the lipid accumulation was much lower than the range in GIE (500–2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The greater effect of CSE on lipid accumulation inhibition may be because CSE has a total flavonoid content and an alkaloid content greater than GIE. CSE also contains cordycepin, which is a main active ingredient that can have strong antiadipogenesis effects. Cordycepin significantly inhibits the biosynthesis of total cholesterol and triglycerides in HepG2 cells [8]; it reduces oleic acid-elicited

intracellular lipid accumulation and increases AMPK activity [39].

In patients with diabetes, plasma insulin and glucose level imbalance result in a reduction of triglyceride-derived fatty acid membrane transport; this reduction results in increases in the half-life of triglyceride-rich lipoproteins and remnant particles [40]. There are many suggested mechanisms by which GIE induces its hypoglycemic effect. This mechanism supports the reduction of lipid accumulation [41]. In rats, GIE leaf extracts can inhibit glucose absorption in isolated intestinal tract tissue and suppress the increased blood glucose. The triterpenoid saponin in GIE extracts can suppress the high K^{+} -induced contraction of intestinal smooth muscle and affect the $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ pump. Pump suppression results in a change in the electrochemical potential of intracellular Na^{+} , which affects the Na^{+} -dependent cotransport system [7, 42]. Thus, our findings suggested that the mechanism of action of GIE may be inhibition of intestinal tract glucose absorption. The IC_{50} of GIE for the inhibition of pancreatic lipase was $982.24 \pm 44.40 \mu\text{g mL}^{-1}$; previous studies found that orlistat used as a positive control also has this inhibitory effect when used at $68.23 \pm 6.67 \mu\text{g mL}^{-1}$ [21]. Under these conditions, the potential strength of orlistat on lipase activity inhibition is approximately 13.7 times greater than the GIE. Taken together, these results indicate that the inhibitory effects of GIE on pancreatic lipase activity increase in a dose-dependent manner. The enzyme pancreatic lipase has a significant role in fat digestion via hydrolysis of triglycerides to diglycerides and eventually to monoglycerides and free fatty acids [43]. Inhibition of dietary triglyceride absorption via pancreatic lipase inhibition likely represents a new approach for obesity treatment [44]. The lipase inhibition results indicated that the IC_{50} value of GIE was approximately 2.35 times lower than the IC_{50} for CSE. These results are consistent with the results of Hengpratom et al. and Sirichaiwetchakoon et al.; *Oroxylum indicum* extract and *Pluchea indica* tea have lipase inhibition activity, with IC_{50} values of $1062.04 \pm 32.21 \text{ mg GAE/g}$ and $1708.75 \pm 335.85 \text{ mg GAE/g}$ of dry weight, respectively [21, 26]. Polyphenolic compounds can inhibit enzyme lipase activity and reduce lipid absorption in the intestine [44, 45]. Hence, the lipase inhibitory effects of both extracts might be dependent on the total phenolic compound concentrations in these extracts; the total phenolic contents in GIE and CSE are $0.81 \pm 0.01 \text{ mg GAE/g}$ and $0.14 \pm 0.01 \text{ mg GAE/g}$ of dry weight, respectively.

The antiadipogenic effects of CSE, GIE, and the CSE/GIE combination in 3T3-L1 cells were confirmed by FTIR analysis, which is useful for detection of biomolecular changes in biological samples [29, 46, 47]. We used FTIR analysis to identify spectral profiles of 3T3-L1 preadipocytes and untreated and SIM-, CSE-, GIE-, and CSE/GIE combination-treated 3T3-L1 adipocytes. For the six different conditions, changes in the cells were correlated with changes in the lipid (2964, 2923, and 2854 cm^{-1}), nucleic acid (1234 cm^{-1} and 1084 cm^{-1}), and glycogen and other carbohydrate regions (1157 cm^{-1} and 1045 cm^{-1}) in the second derivative spectra. Compared with the untreated adipocytes, the signal intensities and areas of glycogen and other carbohydrates of the treated

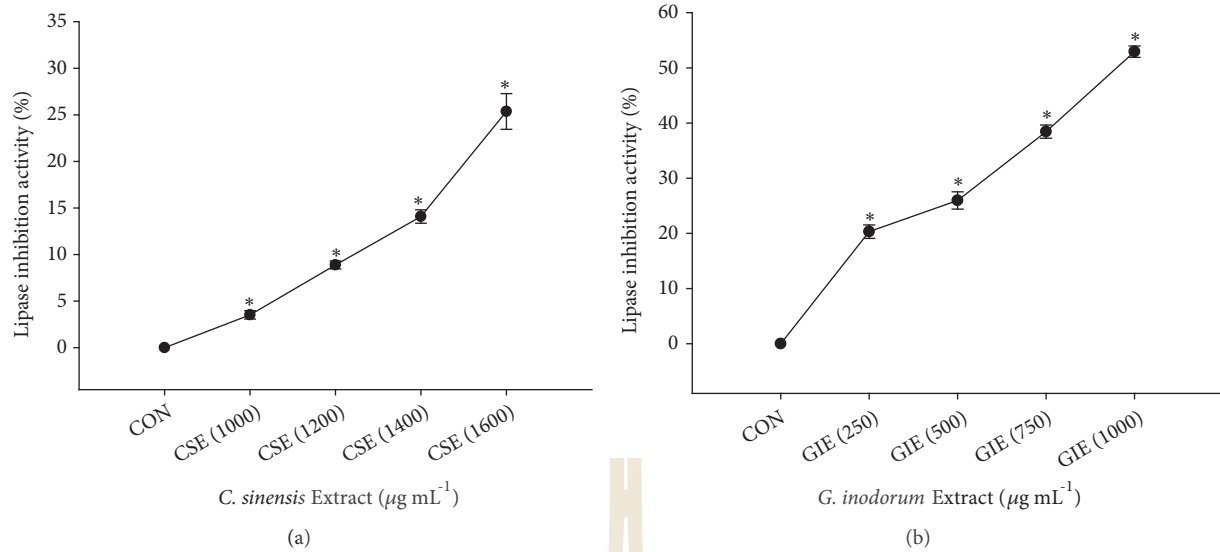


FIGURE 4: Inhibitory effects of CSE (a) and GIE (b) at various concentrations on pancreatic lipase activity (%). CON = control; CSE (1000) = CSE at $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$; GIE (250) = GIE at $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Results are expressed as mean \pm SEM values (three replicates). * $p < 0.05$ indicates result significantly different from the control.

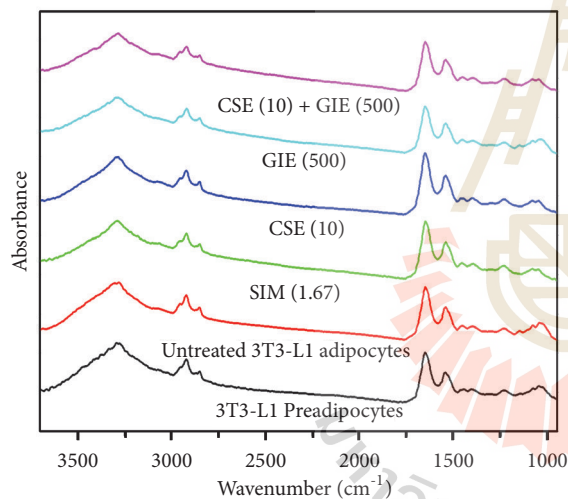


FIGURE 5: Representative original FTIR spectra ($3000\text{--}950 \text{ cm}^{-1}$) obtained from 3T3-L1 cells at day 10 after differentiation. 3T3-L1 preadipocytes ($n = 41$); untreated 3T3-L1 adipocytes ($n = 39$); SIM (1.67) = simvastatin at $1.67 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 49$); CSE (10) = CSE at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 98$); GIE (500) = GIE at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 76$); CSE (10) + GIE (500) = CSE at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ plus GIE at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n = 97$).

adipocytes were significantly smaller after CSE, GIE, or CSE/GIE exposure ($p < 0.05$). Hence, in patients with obesity, decreasing the synthesis of glycogen and other carbohydrates may reduce the rates of carbohydrate and lipid accumulation [48, 49]. The results for the CH_2/CH_3 asymmetric stretching ratio indicated that compared with the other groups the untreated adipocytes had significantly greater proportions of longer acyl chains of lipids. The increases in the CH_2/CH_3 asymmetric stretching ratio proportions might have been due

to lipoprotein fractions involved in lipid storage and accumulation of free cholesterol and cholesterol esters; these fractions can be used as markers of adipogenesis from the preadipocyte to the adipocyte stages [29, 50]. The lipid storage-associated decreases in the CH_2/CH_3 asymmetric stretching ratio were also consistent with the Oil Red O staining results. The result for CH_2 asymmetric stretching/amide I indicated that the untreated adipocyte lipid/protein ratio was significantly greater than the other groups ($p < 0.05$). Taken together, these findings indicated that the lipid/protein results were virtually the same as the lipid storage results.

The classification methods used in this study included PCA, which was used to discriminate the clusters associated with the six FTIR spectra from the different treatments. The discrimination was based on between-group differences in biomolecular composition (nucleic acid, amide I protein, lipids, and glycogen and other carbohydrates). Significant differences between the spectra from the six sample groups were examined using a two-dimensional score plot obtained from the PCA (Figure 8(a)). The loading plots revealed relationships among the six sample groups for variables that contributed to clustering (Figure 8(b)). The score plot revealed that the untreated adipocyte and GIE-treated adipocyte clusters were separate from the clusters associated with the other four groups along the PC1 axis and accounted for 28% of the total variance. Twenty-two percent of the total variance was described with the PC2 score plot; the clusters associated with the untreated adipocytes were clearly separated from the clusters associated with the GIE-treated adipocytes. The discrimination along PC1 between the negative score plot for the preadipocytes, SIM, CSE, and CSE/GIE combination-treated adipocyte spectra and the positive score plot for the untreated and GIE-treated adipocyte spectra can be explained by the negative PC1 loadings for the preadipocytes and the SIM, CSE, and CSE/GIE combination centered at

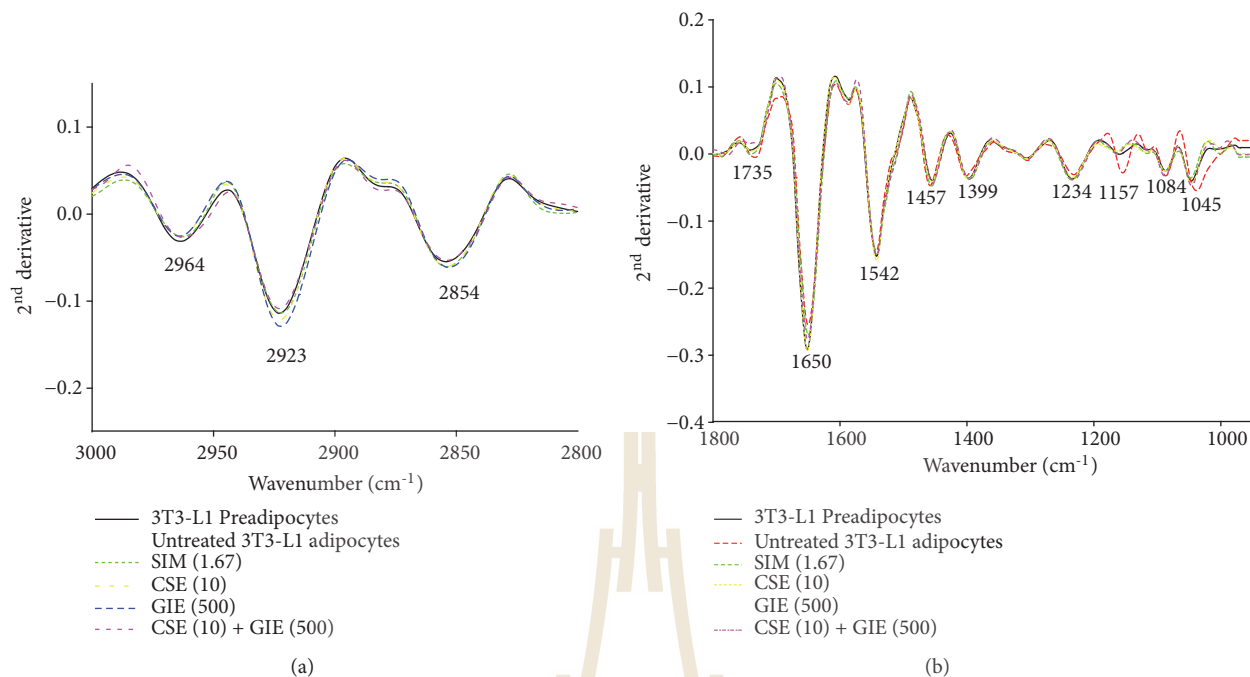


FIGURE 6: Representative secondary derivative spectra for 3T3-L1 cells. SIM (1.67) = simvastatin at 1.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) = CSE at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; GIE (500) = GIE at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) + GIE (500) = CSE at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plus GIE at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results represent two regions: (a) lipid (3000–2800 cm^{-1}); (b) protein, nucleic acid, glycogen, and other carbohydrates (1800–950 cm^{-1}).

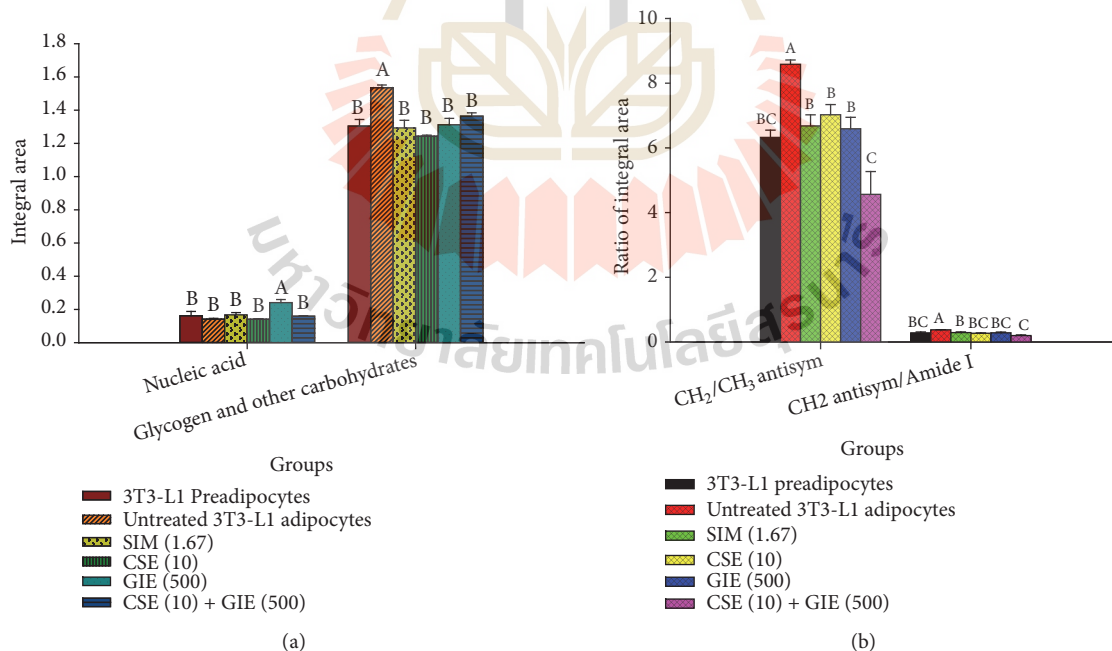


FIGURE 7: (a) Integrated areas of notable nucleic acids and regions corresponding to glycogen and other carbohydrates and (b) CH_2/CH_3 asymmetric stretching and CH_2 asymmetric stretching/amide I integrated area ratios for 3T3-L1 cells. SIM (1.67) = simvastatin at 1.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) = CSE at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; GIE (500) = GIE at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) + GIE (500) = CSE at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plus GIE at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CH_2 antisym = CH_2 asymmetric stretch. The results are presented as mean \pm SEM (three replicates). Mean values with the same superscript letter were not significantly different (Tukey’s test, $p < 0.05$).

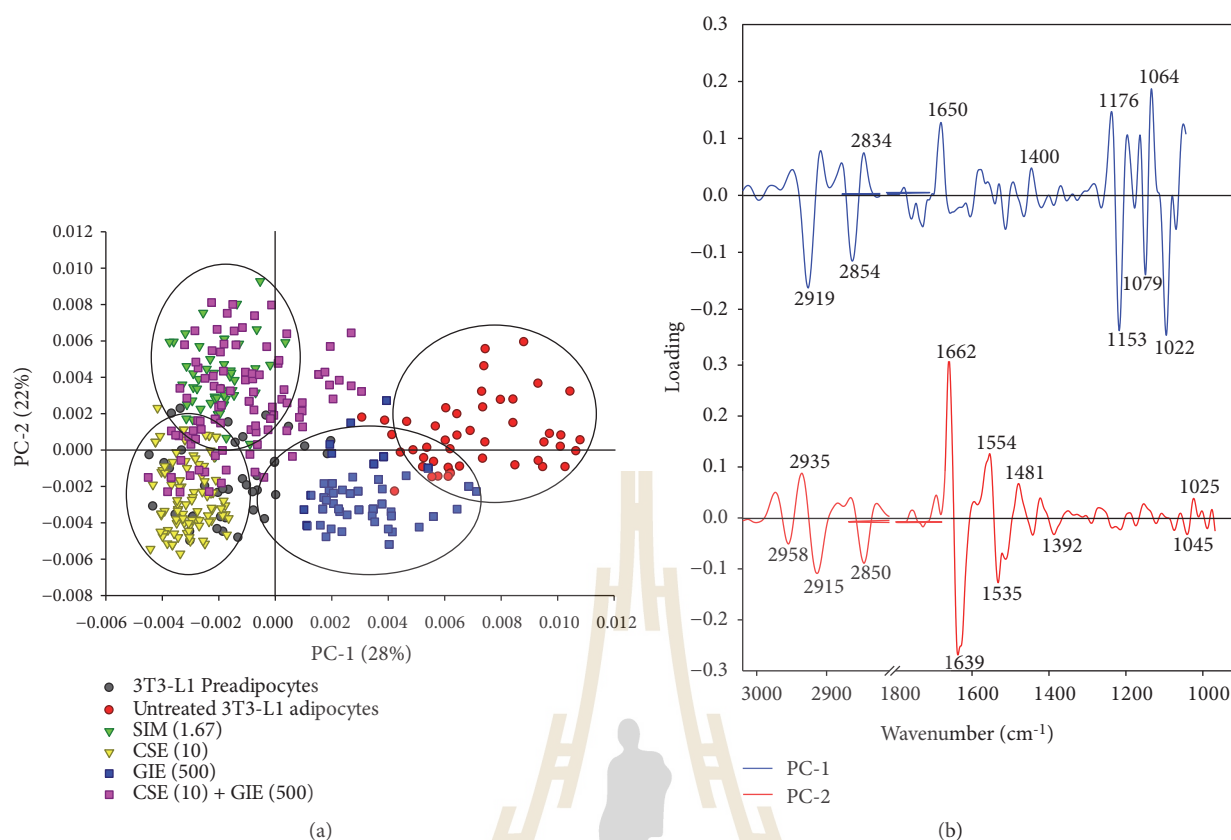


FIGURE 8: PCA of FTIR spectral ranges 3000–2800 cm^{-1} and 1800–950 cm^{-1} . PCA score plot (a) and PCA loading plot (b). Score plots revealed distinct clustering between 3T3-L1 groups. SIM (1.67) = simvastatin at 1.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) = CSE at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; GIE (500) = GIE at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CSE (10) + GIE (500) = CSE at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ plus GIE at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The PC1 and PC2 loading plots identify biomarker differences over a spectral range of samples.

2950 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1153 cm^{-1} , and 1022 cm^{-1} and the positive loading of the other two groups centered at 2834 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , and 1064 cm^{-1} (Figure 8(b)). Similarly, the PC2 loading between the positive score plot centered at 2935 cm^{-1} and 1662 cm^{-1} for the untreated adipocytes and the negative score plot centered at 2915 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , and 1639 cm^{-1} for the GIE-treated adipocytes was apparent. Taken together, these results indicated that this approach could be adapted for the obesity biomarker development and evaluation of the efficacy of obesity drugs in patients with obesity.

5. Conclusions

In summary, the flavonoids were the important group of phytochemical compounds found in both CSE and GIE; alkaloids were found only in CSE. The viability of cells treated with CSE (40) or GIE (2000) alone or combined (CSE (10) + GIE (500)) was not significantly reduced compared with the preadipocytes ($p > 0.05$). The Oil Red O and hematoxylin staining results indicated that compared with no treatment the combination of CSE (10) and GIE (500) resulted in synergistic effects on the reduction in adipocyte lipid accumulation

and significantly decreased lipid accumulation ($p < 0.05$). The FTIR assay revealed that adipocytes treated with CSE (10) plus GIE (500) had significantly lower lipid levels than the adipocytes treated with CSE (10) or GIE (500) alone and the adipocytes that were untreated ($p < 0.05$). The ratios of the integrated areas of glycogen and other carbohydrates and lipid/protein ratios in the adipocytes treated with CSE (10) or GIE (500) alone or combined were significantly lower than those for the untreated adipocytes ($p < 0.05$). These findings indicated that the use of FTIR microspectroscopy combined with the multivariate statistical PCA could be an effective approach for classification of differentiated adipocytes.

Data Availability

The datasets used and analyzed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this manuscript.

Acknowledgments

The authors are indebted and grateful to the One Research One Grant scholarship from the Suranaree University of Technology for assistance with research funds support and to the Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Thailand, for supporting the FTIR microspectroscopy technique. The authors are also grateful to CordyThai Company, LTD, Thailand, for providing the *Cordyceps sinensis* extract.

References

- [1] T. Kelly, W. Yang, C. S. Chen, K. Reynolds, and J. He, "Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030," *International Journal of Obesity*, vol. 32, no. 9, pp. 1431–1437, 2008.
- [2] S. E. Kahn, R. L. Hull, and K. M. Utzschneider, "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 840–846, 2006.
- [3] A. Guilherme, J. V. Virbasius, V. Puri, and M. P. Czech, "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 5, pp. 367–377, 2008.
- [4] R. Birari, V. Javia, and K. K. Bhutani, "Antiobesity and lipid lowering effects of *Murraya koenigii* (L.) spreng leaves extracts and mahanimbine on high fat diet induced obese rats," *Fitoterapia*, vol. 81, no. 8, pp. 1129–1133, 2010.
- [5] R. Zouari, K. Hamden, A. E. Feki et al., "Protective and curative effects of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant on high-fat-high-fructose diet induced hyperlipidemia, hypertriglyceridemia and deterioration of liver function in rats," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 84, pp. 323–329, 2016.
- [6] S. Hu, J. Wang, Z. Li, J. Fu, Y. Wang, and C. Xue, "Hypoglycemic effect of a mixture of sea cucumber and *Cordyceps sinensis* in streptozotocin-induced diabetic rat," *Journal of Ocean University of China*, vol. 13, no. 2, pp. 271–277, 2014.
- [7] K. Shimizu, M. Ozeki, A. Iino, S. Nakajyo, N. Urakawa, and M. Atsuchi, "Structure-activity relationships of triterpenoid derivatives extracted from *Gymnema inodorum* leaves on glucose absorption," *Japanese Journal of Pharmacology*, vol. 86, no. 2, pp. 223–229, 2001.
- [8] P. Guo, Q. Kai, J. Gao et al., "Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of AMP-activated protein kinase," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 113, no. 4, pp. 395–403, 2010.
- [9] W.-C. Kan, H.-Y. Wang, C.-C. Chien et al., "Effects of extract from solid-state fermented *Cordyceps sinensis* on type 2 diabetes mellitus," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 743107, 10 pages, 2012.
- [10] S. Takahashi, M. Tamai, S. Nakajima et al., "Blockade of adipocyte differentiation by cordycepin," *British Journal of Pharmacology*, vol. 167, no. 3, pp. 561–575, 2012.
- [11] H. Wagner, "Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 1, pp. 34–37, 2011.
- [12] S. Prabhu and S. Vijayakumar, "Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Gymnema sylvestre* (R. Br) leaves extract on streptozotocin induced diabetic rats," *Biomedicine & Preventive Nutrition*, vol. 4, no. 3, pp. 425–430, 2014.
- [13] S. Al-Daihan, M. Al-Faham, N. Al-shawi et al., "Antibacterial activity and phytochemical screening of some medicinal plants commonly used in Saudi Arabia against selected pathogenic microorganisms," *Journal of King Saud University - Science*, vol. 25, no. 2, pp. 115–120, 2013.
- [14] N. Savithramma, M. L. Rao, and D. Suhrulatha, "Screening of medicinal plants for secondary metabolites," *Middle East Journal of Scientific Research*, vol. 8, no. 3, pp. 579–584, 2011.
- [15] R. Yadav and M. Agarwala, "Phytochemical analysis of some medicinal plants," *Journal of Phytology*, vol. 3, no. 12, 2011.
- [16] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," *Methods in Enzymology*, vol. 299, pp. 152–178, 1999.
- [17] H. V. Rupasinghe, L. Wang, G. M. Huber, and N. L. Pitts, "Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder," *Food Chemistry*, vol. 107, no. 3, pp. 1217–1224, 2008.
- [18] J.-J. Chen and X.-R. Li, "Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice," *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 16, no. S1, pp. 290–294, 2007.
- [19] S. Settharaksa, F. Madaka, L. Sueree et al., "Effect of solvent types on phenolic, flavonoid contents and antioxidant activities of *Syzygium gratum* (wight) SN," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 6, no. 2, pp. 114–116, 2014.
- [20] S. Phitaktim, M. Chomnawang, K. Sirichaiwetchakoon, B. Dunkhunthod, G. Hobbs, and G. Eumkeb, "Synergism and the mechanism of action of the combination of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*," *BMC Microbiology*, vol. 16, no. 1, p. 195, 2016.
- [21] K. Sirichaiwetchakoon, G. M. Lowe, K. Thumanu, and G. Eumkeb, "The Effect of *Pluchea indica* (L.) less. Tea on Adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and lipase activity," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2018, Article ID 4108787, 13 pages, 2018.
- [22] F. Denizot and R. Lang, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability," *Journal of Immunological Methods*, vol. 89, no. 2, pp. 271–277, 1986.
- [23] J. Naowaboot, C. H. Chung, P. Pannangpetch et al., "Mulberry leaf extract increases adiponectin in murine 3T3-L1 adipocytes," *Nutrition Research*, vol. 32, no. 1, pp. 39–44, 2012.
- [24] G. Eumkeb, S. Tanphonkrang, K. Sirichaiwetchakoon, T. Hengpratom, and W. Naknarong, "The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice," *Natural Product Research (Formerly Natural Product Letters)*, vol. 31, no. 6, pp. 672–675, 2017.
- [25] H. Wagner and G. Ulrich-Merzenich, "Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals," *Phytopharmaceuticals*, vol. 16, no. 2-3, pp. 97–110, 2009.
- [26] T. Hengpratom, G. M. Lowe, K. Thumanu, S. Suknasang, K. Tiomyom, and G. Eumkeb, "*Oroxylum indicum* (L.) Kurz extract inhibits adipogenesis and lipase activity in vitro," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 18, no. 1, p. 177, 2018.
- [27] X. Guo, J. Liu, S. Cai, O. Wang, and B. Ji, "Synergistic interactions of apigenin, naringin, quercetin and emodin on inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation and pancreas lipase activity," *Obesity Research & Clinical Practice*, vol. 10, no. 3, pp. 327–339, 2016.

- [28] S. Siriwong, Y. Teethaisong, K. Thumanu, B. Dunkhunthod, and G. Eumkeb, "The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*," *BMC Pharmacology & Toxicology*, vol. 17, no. 1, p. 39, 2016.
- [29] B. Dunkhunthod, K. Thumanu, and G. Eumkeb, "Application of FTIR microspectroscopy for monitoring and discrimination of the anti-adipogenesis activity of baicalein in 3T3-L1 adipocytes," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 89, pp. 92–101, 2017.
- [30] C. Aksoy and F. Severcan, "Role of vibrational spectroscopy in stem cell research," *Journal of Spectroscopy*, vol. 27, no. 3, pp. 167–184, 2012.
- [31] V. Dritsa, "FT-IR spectroscopy in medicine," in *Infrared Spectroscopy-Life and Biomedical Sciences*, InTech, 2012.
- [32] D. Krilov, M. Balarin, M. Kosović, O. Gamulin, and J. Brnjas-Kraljević, "FT-IR spectroscopy of lipoproteins—A comparative study," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 73, no. 4, pp. 701–706, 2009.
- [33] S. Garip, A. C. Gozen, and F. Severcan, "Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates," *Food Chemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 1301–1307, 2009.
- [34] J. Cao, E. S. Ng, D. McNaughton et al., "The characterisation of pluripotent and multipotent stem cells using fourier transform infrared microspectroscopy," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 9, pp. 17453–17476, 2013.
- [35] P. Heraud, E. S. Ng, S. Caine et al., "Fourier transform infrared microspectroscopy identifies early lineage commitment in differentiating human embryonic stem cells," *Stem Cell Research*, vol. 4, no. 2, pp. 140–147, 2010.
- [36] F. Kucuk Baloglu, S. Garip, S. Heise, G. Brockmann, and F. Severcan, "FTIR imaging of structural changes in visceral and subcutaneous adiposity and brown to white adipocyte transdifferentiation," *Analyst*, vol. 140, no. 7, pp. 2205–2214, 2015.
- [37] J.-H. Koh, J.-M. Kim, U.-J. Chang, and H.-J. Suh, "Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 26, no. 1, pp. 84–87, 2003.
- [38] J.-S. Zhu, G. M. Halpern, and K. Jones, "The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* part I," *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 289–303, 1998.
- [39] C. Wu, Y. Guo, Y. Su et al., "Cordycepin activates AMP-activated protein kinase (AMPK) via interaction with the $\gamma 1$ subunit," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 18, no. 2, pp. 293–304, 2014.
- [40] G. Schmitz, H. Hohage, and K. Ullrich, "Glucose-6-phosphate: A key compound in glycogenesis I and favism leading to hyper- or hypolipidaemia," *European Journal of Pediatrics*, vol. 152, Supplement 1, pp. 77–84, 1993.
- [41] C. Lara-Castro and W. T. Garvey, "Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 37, no. 4, pp. 841–856, 2008.
- [42] K. Shimizu, M. Ozeki, K. Tanaka et al., "Suppression of glucose absorption by extracts from the leaves of *Gymnema inodorum*," *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 59, no. 9, pp. 753–757, 1997.
- [43] F. K. Winkler, A. D'Arcy, and W. Hunziker, "Structure of human pancreatic lipase," *Nature*, vol. 343, no. 6260, pp. 771–774, 1990.
- [44] R. B. Birari and K. K. Bhutani, "Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential," *Drug Discovery Therapy*, vol. 12, no. 19–20, pp. 879–889, 2007.
- [45] B. Zhang, Z. Y. Deng, D. D. Ramdath et al., "Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase," *Food Chemistry*, vol. 172, pp. 862–872, 2015.
- [46] A. Lamberti, C. Sanges, and P. Arcari, "FT-IR spectromicroscopy of mammalian cell cultures during necrosis and apoptosis induced by drugs," *Spectroscopy: An International Journal*, vol. 24, no. 5, pp. 535–546, 2010.
- [47] F. Gasparri and M. Muzio, "Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy," *Biochemical Journal*, vol. 369, no. 2, pp. 239–248, 2003.
- [48] P. R. Shepherd, L. Gnudi, E. Tozzo, H. Yang, F. Leach, and B. B. Kahn, "Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 30, pp. 22243–22246, 1993.
- [49] J. Wylie-Rosett, C. Segal-Isaacson, and A. Segal-Isaacson, "Carbohydrates and increases in obesity: does the type of carbohydrate make a difference?" *Obesity Research*, vol. 12, no. S11, 2004.
- [50] B. Gauthier, M. Robb, and R. McPherson, "Cholesteryl ester transfer protein gene expression during differentiation of human preadipocytes to adipocytes in primary culture," *Atherosclerosis*, vol. 142, no. 2, pp. 301–307, 1999.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ส่วน ก. ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รองศาสตราจารย์ ภก.ดร.เกรียงศักดิ์ นามสกุล เอี่ยมเก็บ.
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Assoc.Prof.Dr. Griangsak Eumkeb
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3105 00033 121
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ เกษักร ดร.
4. หน่วยงานที่อยู่ ที่ติดต่อได้พร้อมเบอร์โทรศัพท์และโทรสาร
สาขาวิชาปริคlinik สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
111 ถ.มหาวิทยาลัย 1 ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000.
โทร : 0 - 4422 - 4260 โทรสาร: 0-44 22- 4633 และ 0-4422- 4185
E-mail : griang@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
2532 : เกษัศศาสตรบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ , ประเทศไทย
2542 : Ph.D. (Pharmacology) ; School of Pharmacy, Faculty of Health and Social care,
The Robert Gordon University, Aberdeen, **United Kingdom**
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Medicinal Plant, Clinical Pharmacology, Hospital Pharmacy, Toxicology , Pharmacognosy
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :-
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :
 - 7.2.1 Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria
 - 7.2.2 The study of medicinal plants and supplement food for health of community in NakhonRatchasima province
 - 7.2.3 The study of antibacterial activity of some medicinal plants in Lamiaceae Family
 - 7.2.4 Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria.
 - 7.2.5 Investigation of the effect of Galangin on some β - lactam antibiotics resistant

bacteria.

7.2.6 In vivo toxicity test of Galangin

7.2.7 In vivo toxicity test of some Flavonoids

7.2.8 Trend in needs if Biomedical Sciences.

7.2.9 Antibacterial activity of the pericarp of *Garcinia mangostana* against drug resistant bacteria

7.2.10 Research and development new antibacterial drug for treatment of drug resistant bacteria (เมธีวิจัย สกว. ปี 2549)

7.2.11 Bioactive Compounds form the Tuberos Roots of *Butea superba* Roxb.

7.2.12 Optimal dose and toxicity test of Flavonoids isolated from the tuberous Roots of *Butea superba* Roxb in male rat.

7.2.13 Effect of flavonoids on lower blood lipid levels in hyperlipidemic mice

7.2.14 The effect of *Kaempferia pandurata* Roxb. and *Garcinia magostana* L extract on resistant bacteria

7.2.15 The effects of *Cordyceps sinensis* and *Gynema inodorum* extracts on antihyperglycemia, antihyperlipidemia in mice and mechanism of action

7.2.16 Clinical efficacy and safety of Clindamycin and Galangal, Fingerroot, or Mangosteen crude extract gels for acne vulgaris treatment

7.2.17 Herbal medicine development of *Oroxylum indicum*, *Pandanus amaryllifolius*, and *Hibiscus sabdarriffa* extracts for anti-hyperlipidemic in human and mechanism of action

7.3 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

สิทธิบัตรจำนวน 1 สิทธิบัตรตามโครงการวิจัยร่วมกับ สกว. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ : สารผสมของยา เพื่อยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Enterobacter cloacae* ที่คือต่อยาปฏิชีวนะ
เลขที่คำขอสิทธิบัตร เลขที่ 0601001839 ปี 2549 (2006)

7.3.1 Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria. (หัวหน้าโครงการ) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%

7.3.2 การทดสอบฤทธิ์ของ Galangin ในการยับยั้งเชื้อ Bacteria บางชนิด ที่คือต่อยาในกลุ่ม

- β -lactam antibiotics (หัวหน้าโครงการ) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.3 In vivo toxicity test of Galangin (หัวหน้าโครงการ) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.4 In vivo toxicity test of some Flavonoids (หัวหน้าโครงการ) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.5 Research and development new antibacterial drug for treatment of drug resistant bacteria. (เมธีวิจัย สกว. ปี 2549; หัวหน้าโครงการ การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%)
- 7.3.6 Antibacterial activity of the pericarp of *Garcinia mangostana* against drug resistant Bacteria (หัวหน้าโครงการ) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.7 Bioactive Compounds form the Tuberos Roots of *Butea superba* Roxb. (หัวหน้าโครงการวิจัย) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.8 Development of Attenuated total reflectance IR spectroscopy for detecting resistance bacterial cells when treating with flavonoid and antibiotic (ผู้ร่วมวิจัย) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.9 Optimal dose and toxicity test of Flavonoids isolated from the tuberous Roots of *Butea superba* Roxb in male rat. (หัวหน้าโครงการวิจัย) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.10 Effect of flavonoids on lower blood lipid levels in hyperlipidemic mice (หัวหน้าโครงการวิจัย) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
- 7.3.11 The effect of *Kaempferia pandurata* Roxb. and *Garcinia magostana* L extract on resistant bacteria (หัวหน้าโครงการวิจัย) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%

ผลงานตีพิมพ์

Refereed articles:

Richards, R.M.E., Eumkeb, G. and Marshall, D. (1997). Is the ultrastructural damage caused by subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulphadiazine part of their normal mechanism of action? *Microbios*, 92, 183 - 197.

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2005). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. *Acta Horticulturae*. Vol 4: 678: 171-178.

Jirawan Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and **Griangsak Eumkeb.** (2006). Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT Food Science and Technology*. 39: 1214-1220.

(IF 2017 = 3.129)

Punopas, K., **Eumkeb, G.**, Chitsomboon, B. and Nakkiew, P. (2004). The study of antibacterial activity of some medicinal plant in Lamiaceae family. *Suranaree Journal of Science and Technology*. 11:52-59.

Eumkeb, G. and Richards R.M.E. (2004). Reversing β - Lactam Antibiotic Resistance in Gram- positive bacteria by Some Flavonoids. *Suranaree Journal of Science and Technology*. 11:143-150.

Eumkeb, G., Sakdarat, S and Siriwong, S. (2010). Reversing [beta]-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine*. 18(1): 40-45.

(Impact Factor 2017 = 3.610)

Eumkeb, G. and Duangkham A. (2011). Subacute Toxicity Test of Galangin and ceftazidime in Mice. *Thai Journal of Toxicology*. 26(1): 5-13.

Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Sakdarat, S. (2012). Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 112, 55-64.

(Impact Factor 2017 = 2.160)

Munglue, P., **Eumkep, G.**, Wray, S., Kupittayanant, S., (2013). The Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts and L-Citrulline on Rat Uterine Contractility. *Reproductive Sciences*. 20, 437-448.

(Impact Factor 2017 = 2.548)

Eumkeb, G., Siriwong, S., Thumanu, K., (2012). Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 117, 247-253.

(Impact Factor 2017 = 3.165)

Eumkeb, G., Chukrathok, S., (2013). Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine.* 20, 262-269.

(Impact Factor 2017 = 3.610).

Teethaisong, Y., Autarkool, N., Sirichaiwetchakoon, K., Krubphachaya, P., Kupittayanant, S. and **Eumkeb, G.,** (2014). Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* Forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Science.* 21:90

(Impact Factor 2017 = 3.466).

Siriwong, S., Pimchan, T., Naknarong, W. and **Eumkeb, G.,** (2015). Mode of action and synergy of ceftazidime plus baicalein against *Streptococcus pyogenes*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 14, 641-648.

(Impact Factor 2017 = 0.444).

Siriwong, S., Thumanu, K., Hengpratom, T., and **Eumkeb, G.** (2015). Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* vol. 2015, Article ID 759459, 12 pages, doi:10.1155/2015/759459.

(Impact Factor 2017 = 2.064).

Eumkeb, G., Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T., and Naknarong, W. (2017). The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice. *Natural Product Research.* 31(6), 672-675. DOI:10.1080/14786419.2016.1180603.

(Impact Factor 2017 = 1.928).

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Nakouti, I., Evans, K., and Hobbs, G. (2016). A combined disc method with resazurin agar plate assay for early phenotypic screening of KPC, MBL and OXA-48 carbapenemases among Enterobacteriaceae. *Journal of Applied Microbiology*. 121:408-14. DOI: 10.1111/jam. 13196, 2016 Aug;121(2):408-14, PMID: 27253907

(Impact Factor 2017 = 2.160)

Siriwong, S., Teethaisong, Y., Thumanu, K., Dunkhunthod, B., and **Eumkeb, G.** (2016). The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 17(1): 1-14. DOI: 10.1186/s40360-016-0083-8

(Impact Factor 2017 = 1.865)

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Chumnarnsilpa, S., Autarkool, N., Hobson, J., Nakouti, I., Hobbs, G., and Evans, K. (2016). Phenotypic detection of AmpC β -lactamases, extended-spectrum- β -lactamases and metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae using a resazurin microtitre assay with inhibitor-based methods. *Journal of Medical Microbiology*. 65(10), 1079-1087. 2016 Aug 1. doi: 10.1099/jmm.0.000326. PMID: 27481506

(Impact Factor 2017 = 2.112)

Phitaktim, S., Chomnawang, M., Sirichaiwetchakoon, K., Dunkhunthod, B., Hobbs, G., and **Eumkeb, G.** (2016). Synergism and the mechanism of action of the combination of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *BMC Microbiology*. 16, 1-14. DOI: 10.1186/s12866-016-0814-4.

(Impact Factor 2017 = 2.829)

Mahidsanana, T., Gasalucka, P., and **Eumkeb, G.** (2017). A novel soybean flour as cryoprotectant in freeze-dried *Bacillus subtilis* SB-MYP-1. *LWT - Food Science and Technology*. 77, 152-159.

(Impact Factor 2017 = 3.129)

Dunkhunthod, B., Thumanu, K., and **Eumkeb, G.** (2017). Application of FTIR microspectroscopy for monitoring and discrimination of anti-adipogenesis activity of baicalein in 3T3-L1 adipocytes. *Vibrational Spectroscopy*. 89, 92-101. DOI: 10.1016/j.vibspec.2017.01.006.

(Impact Factor 2017 = 1.363)

Teethaisong, Y., Evans, K., Nakouti, I., Tiomyom, K., Ketudat-Cairns, J.R., Hobbs, G. and **Eumkeb, G.** (2017). The performance of a resazurin chromogenic agar plate with a combined disc method for rapid screening of extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and co-beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *Microbiology and Immunology*. 61, 297-304. doi: 10.1111/1348-0421.12499.

(Impact Factor 2017 = 1.335)

Pimchan, T., Maensiri, D. and **Eumkeb, G.** (2017). Synergy and mechanism of action of alpha-mangostin and ceftazidime against ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Letters in Applied Microbiology*. 65(4): 285-291. doi: 10.1111/lam.12789. 2017 Oct; Epub 2017 Sep 3. PMID: 28799218.

(Impact Factor 2017 = 1.471)

Teethaisong, Y., Pimchan, T., Srisawat, R., Hobbs, G. and **Eumkeb, G.** (2018). *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. extract potentiate the antibacterial activity of some β -lactams against β -lactam-resistant Staphylococci. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 12, 207-213. 2017 Nov 1. pii: S2213-7165 (17) 30206-0. DOI. 10.1016/j.jgar.2017.10.019.

(Impact Factor 2017 = 2.022)

Pimchan T, Cooper CJ, **Eumkeb G**, and Nilsson AS. (2017). In vitro activity of a combination of bacteriophages and antimicrobial plant extracts. *Letters in Applied Microbiology*. 66(3), 182-187. doi: 10.1111/lam.12838. Epub 2017 Dec 20. PMID: 29266343.

(Impact Factor 2017 = 1.471)

Teethaisong, Y., Hobbs, G., Nakouti, I., Evans, C.E. and **Eumkeb, G.**, (2018). A nitrocefin disc supplemented with ertapenem for rapid screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 91, 85-88. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.12.023.

(Impact Factor 2017 = 2.341)

Rojtinnakorn, N., Temsiripong, Y., Pimchan, T. and **Eumkeb, G.**, (2018). Siamese crocodile plasma synergizes with ceftazidime against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2018; 17(2):307-317 doi: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v17i2.16>.

(Impact Factor 2017 = 0.444).

Cheypratub, P., Leeanansaksiri, W. and **Eumkeb, G.**, (2018). The Synergy and Mode of Action of *Cyperus rotundus* L. Extract Plus Ampicillin Against Ampicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. vol. 2018, Article ID 3438453, 11 pages, doi:10.1155/2018/3438453.

(Impact Factor 2017 = 2.064)

Hengpratom, T., Lowe, G., Thumanu, K., Suknasang, S., Tiamyom, K., **Eumkeb, G.**, (2018). *Oroxylum indicum* (L.) Kurz extract inhibits adipogenesis and lipase activity in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18(1), 177. doi: 10.1186/s12906-018-2244-3.

(Impact Factor 2107 = 2.109, ISI Web of Science; Q1)

Sirichaiwetchakoon, K., Lowe, G.M., Thumanu, K., **Eumkeb, G.** (2018). The Effect of *Pluchea indica* (L.) Less. Tea on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Lipase Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. vol. 2018, Article ID 4108787, 13 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/4108787>.

(Impact Factor 2017 = 2.064)

Patent

The combination of flavonoids and drugs against *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* : patent asking no: 0601001839 , 2006

Conference Proceedings:

Griangsak Eumkeb, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siritwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing β -Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. *Thai Journal of Pharmacology*. Vol 29: No 1: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.

Siritwong S, Thumanu K, **Eumkeb G.** (2010). Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: Proceeding of the 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2_0051/pp70.) 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

Munglue, P., **Eumkep, G.**, Wray, S., Kupittayanant, S., (2012). Uterine Relaxant Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts. , in: The Physiology Society, (Ed.), Physiology 2012. The Physiology Society, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, EH3 8EE, United Kingdom., 27, pp. PC364.

Siritwong, S., **Eumkeb, G.**, (2012). Synergistic effect of penicillin with apigenin and kaempferol against Penicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, in: Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co., Chiang Mai, Thailand, pp. 368-372.

Naknarong, W., **Eumkeb, G.**, (2012). The effects of Red Kwao Kru (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice, in: Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co, Chiang Mai, Thailand, pp. 193-197.

Eumkeb, G., Phitaktim, S. and Teethaisong, Y. (2013). Antibacterial Activity of α -Mangostin from the Pericarp Extract of *Garcinia mangostana* L. against Drug Resistant Bacteria. Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38 (Suppl): 83-87.

Eumkeb, G., Naknarong, W. and Sirichaiwetchakoon, K. (2013). The effects of Red Kwao krue (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice. Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38(Suppl): 120-123.

Siriwong S, Krubphachaya P., Thumanu K, **Eumkeb G.** (2013). Synergy effect of ceftazidime with flavonoids against *Streptococcus pyogenes*. Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38(Suppl): 115-118.

Autarkool, N., Teethaisong, Y., Kupittayanant, S., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014). Antibacterial activity of *Staphania suberosa* extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Rojtinnakorn, N., Kupittayanantb, S., Temsiripong, Y., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014). Antibacterial activity of plasma fractions from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) on Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Eumkeb, G., Duangkham, A., & Hengpratom, T. (2014, May 6-8, 2014.). Subchronic toxicity test of quercetin and cloxacillin in mice. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Teethaisong, Y., Autarkool, N., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014). Synergistic antibacterial activity of *Boesenbergia rotunda* extract and β -lactam antibiotic combination against multidrug-resistant bacteria. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Cheypratub, P., Leeanansaksirib, W., & **Eumkeb, G.** (2014, May 6-8, 2014). Antibacterial activity of *Cyperus rotundus* extract against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand

Suknasang, S., Teethaisong, Y., Kabkhunthod, S., **Eumkeb, G.**, (2017). *Boesenbergia rotunda* extract inhibits β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* probably by destruction of the cytoplasmic membrane. In : The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences, Conference proceedings, (Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, pp. 233-236). March 2-3, 2017, The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand, p. 233-236.

Kabkhunthod, S., Teethaisong, Y., Suknasang, S., **Eumkeb, G.**, (2017). *Oroxylum indicum* (L.) extract potentiates antibacterial activity of antibiotic against acne-associated pathogens. In : The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences, Conference proceedings, (Pharmaceutical and Cosmetic Technology, pp. 241-244). March 2-3, 2017, The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand, p. 241-244.

Tiamyom, K., Sirichaiwetchakoon, K. and **Eumkeb, G.**, (2018). Anti-hyperlipidemic Effect of *Cordyceps sinensis* Extract on Mice, in: Srichana, T. (Ed.), The 5th Current Drug Development 2018 (CDD 2018) and the 3rd Herbal and Traditional Medicine 2018 (HTM2018), Conference proceedings, Oral: OH08. May 23-25, 2018. Prince of Songkla University, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, pp. 102-105.

Chueakwon, P., Teethaisong, Y. and **Eumkeb, G.**, (2018). Antibacterial Activity of *Stephania suberosa* Forman Extract Against Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium*, in: Srichana, T. (Ed.), The 5th Current

Drug Development 2018 (CDD 2018) and the 3rd Herbal and Traditional Medicine 2018 (HTM2018), Conference proceedings, Poster: PH-17. May 23-25, 2018. Prince of Songkla University, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, pp. 211-213.

Mingsiritom, N., Suknasang, S., Teethaisong, Y. and **Eumkeb, G.**, (2018). *Stephania suberosa* Forman Extract Synergistically Inhibited the Growth of Colistin- and Cephalosporins-Resistant *Enterobacter cloacae*, in: Srichana, T. (Ed.), The 5th Current Drug Development 2018 (CDD 2018) and the 3rd Herbal and Traditional Medicine 2018 (HTM2018). Conference proceedings, Poster: PH-20. May 23-25, 2018. Prince of Songkla University, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, pp. 220-222.

Research reports:

Eumkeb, G. and Jinakoon, N. (2003). The study of medicinal plants and supplement food for health of community in Nakhon Ratchasima province, pp. 89

Eumkeb, G., Pajongtanasarit, M., Tikul, J., Chudapongse, N. and Kungtrakool, P. (2005). Trends in Needs of Biomedical Sciences Program. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 76.

Eumkeb, G., Duangkham, A., (2012). In vivo toxicity test of galangin. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 38.

Eumkeb, G., Chukrathok, S., (2012). Investigation of the effect of galangin on some β -lactam antibiotics resistant bacteria. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 33.

Eumkeb, G., Siritwong, S., (2012). Investigation of the effect of some flavonoids on some β -lactam antibiotics resistant bacteria. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 57.

Eumkeb, G., Duangkham, A., (2012). In vivo toxicity test of some flavonoids. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 59.

Eumkeb, G. and Wongkamsound, K. (2008). Research and development of new antibacterial for treatment of resistant bacteria. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 40.

Eumkeb, G. and Phitaktim, S. (2012). Antibacterial activity of the pericarp of *Garcinia mangostana* against drug resistant bacteria. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 62.

Eumkeb, G. and Rojtinnakorn, N. (2014). The antibacterial activity of plasma from the Thai crocodile (*Crocodylus siamensis*) on drug resistant bacteria. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 77.

Eumkeb, G., Sakdarat, S. and Naknarong, W. (2013). Bioactive Compounds form the Tuberous Roots of *Butea superba* Roxb. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 107.

Eumkeb, G., Sakdarat, S., Thumanu, K., Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., and Naknarong, W. (2016). Optimal dose and toxicity test of Flavonoids isolated from the tuberous Roots of *Butea superba* Roxb in male mice. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 68.

Eumkeb, G., Suksaweang, S., Puaninta, C., Sirichaiwetchakoon, K. and Dunkhunthod, B. (2018). Effect of flavonoids on lower blood lipid levels in hyperlipidemic mice. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, pp. 89.

Technical articles (บทความทางวิชาการ)

Eumkeb, G., (2014). Galangal, From the kitchen to the pharmacy, The Siam Magazine. Siam I Am Co., Ltd., Nakhon Ratchasima, pp. 42-47.

Conference Abstracts:

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In: The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plant for Human Welfare (WOCMAP III) From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use, **Abstracts Book** (Poster presentation, PP04 -59, pp. 450). 3-7 February 2003, Chiangmai, Thailand : Chiangmai University.

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2004). Reversing beta-lactam antibiotic resistance in Gram positive Bacteria with some flavonoids. In: The 20th **FAPA Congress 2004 : Emerging Science and Profession in Pharmacy, Abstracts Book** (Oral presentation, PP-O-01, pp. 160). 30 Nov – 3 Dec 2004, Bangkok, Thailand : The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria. In: The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstracts Book** (Poster presentation, MRG168/p225, pp. 214.). 14-16 January 2005, Kanchanaburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In: The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Oral presentation, 13-R1-S1-MRG4680168/p227, pp. 1). 13-15 October 2005, Petchaburi, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. Chukratok. S., Suttajit. M. and Ruangrunsi. N. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In: The 1st International Conference on Natural products for Health and Beauty; From local wisdom to global marketplace. **Abstract Book** (Oral presentation, O4-1/p232, pp. 124). 17-21 October 2005, Mahasarakham, Thailand : Mahasarakham University, and the higher education commission, Thailand.

Eumkeb, G., Wongkamsound, K (2007). Flavonoids synergy with beta-lactam antibiotics against beta-lactam-resistant bacteria. In: The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers 7th, **Abstract Book** (Poster presentation, P-PHY-B06-RSA4980004 /p26 , pp. 26.). 11-13 October 2007, Pattaya, Chonburee,Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G., Wongkamsound, K. (2008). Flavonoids synergy with β -lactam antibiotics against β -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-E20). 16-18 October 2008, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education, p. 144.

Eumkeb, G., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A., Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). Flavonoids synergy with β -lactam antibiotics against β -lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education, p. 105.

Pimchan, T., Maensiri, D., Nilsson, A. and **Eumkeb, G.** (2016). Antibacterial and Synergy Effect of α -Mangostin from *Garcinia mangostana* L. and Ceftazidime Combination against Drug-Resistant Bacteria. The Seventeenth RGJ-Ph.D. Congress (RGJ-Ph.D. Congress XVII). The Thailand Research Fund. **Abstract Book** (Poster presentation, S5-P28). June 8-11, 2016, Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Chonburi., The Thailand Research Fund, p. 308.

Teethaisong, Y., Hobbs, G., Evans, K., Nakouti, I. and **Eumkeb, G.** (2016). A Disc Diffusion Method Along with a Resazurin Agar Plate Assay for the Early Characterisation of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. The Seventeenth RGJ-Ph.D. Congress (RGJ-Ph.D. Congress XVII). The Thailand Research Fund. **Abstract Book** (Oral presentation, S4-O3). June 8-11, 2016, Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Chonburi., The Thailand Research Fund, p. 157.

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Evans, E. and Hobbs, G., (2016). Evaluation of Resazurin microtitre plate assay for early phenotypic characterisation of ESBL, AmpC and MBL β -lactamases producing Enterobacteriaceae, in: Society, M. (Ed.), Annual Conference 2016. Microbiology Society, ACC, **Abstract Book** (Poster presentation, S19/P18). 21-24 March 2016, Liverpool, UK, p. 95.

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Nakouti, I., Evans, K. and Hobbs, G. (2016). Development of a novel, simple and rapid chromogenic method to detect the presence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. In: IDweek2016, New Orleans convention center (Session 48, Diagnostics: Bacteriology, Sequencing, and Resistance, poster presentation number: 186). 26-30 October 2016, New Orleans, USA.

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Nakouti, I., Evans, K., and Hobbs, G. (2016). A novel, simple chromogenic method to detect the presence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. In: the SfAM Antimicrobial Resistance Meeting. **Abstract Book** (Poster presentation, P6), 24 November 2016, London, UK. pp. 10.

Kabkhunthod, S., Pimchan, T., Teethaisong, Y., Hengpratom, T. and **Eumkeb, G.**, (2017). Anti *Propionibacterium acnes* activity of *Oroxylum indicum* (L.) extract, in: The 2nd International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017. KKU, **Abstract Book** (Poster presentation, T5-P-ST-049). 25-27 January 2017, Asia hotel, Bangkok, Thailand, p. 499.

Suknasang, S., Teethaisong, Y., Kabkhunthod, S., **Eumkeb, G.**, (2017). *Boesenbergia rotunda* extract inhibits β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* probably by destruction of cytoplasmic membrane. In: The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences, **Abstract book**, (Session 1, Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Oral presentation, OP 6). March 2-3, 2017, The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand, p.100.

Kabkhunthod, S., Teethaisong, Y., Suknasang, S., **Eumkeb, G.**, (2017). *Oroxylum indicum* (L.) extract potentiates antibacterial activity of antibiotic against acne-associated pathogens. In: The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences, **Abstract book**

(Session 4, Pharmaceutical and Cosmetic Technology, Oral presentation, OP 13). March 2-3, 2017, The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand, p.107.

Teethaisong, Y.; Hobbs, G., Evans, K., Nakouti, I. and **Eumkeb, G.** (2017). Simple and rapid chromogenic method for screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. In: The 5th RGJ meeting and 118th RGJ seminar series, **Abstract book** (Energy for Thailand 4.0, Oral presentation, RGJ5-O-05). May 1-2, 2017, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, p. RGJ5-O-05.

Pimchan, T., Maensiri, D., Nilsson, A.S. and **Eumkeb, G.** (2017). The kinetic interaction of bacteriophage and *Oroxylum indicum* extract against *Escherichia coli*. In: The 5th RGJ meeting and 118th RGJ seminar series, **Abstract book** (Energy for Thailand 4.0, Oral presentation, RGJ5-O-06). May 1-2, 2017, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, p. RGJ5-O-06.

Hengpratom, T., Thumanu, K. and **Eumkeb, G.** (2017). Detecting the effect of *Oroxylum indicum* (L.) on anti-adipogenesis in 3T3-L1 cells using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. In: The 5th RGJ meeting and 118th RGJ seminar series, **Abstract book** (Energy for Thailand 4.0, Oral presentation, RGJ5-O-07). May 1-2, 2017, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, p. RGJ5-O-07.

Hengpratom, T., **Eumkeb, G.**, and Lowe, G.M. (2018). Proposed mechanisms for the action of *Oroxylum indicum* extract on adipocyte differentiation. The Nineteenth RGJ-Ph.D. Congress (RGJ-Ph.D. Congress XIX). The Thailand Research Fund. **Abstract Book** (Oral presentation, ABE-O3). June 7-9, 2018, Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Chonburi., The Thailand Research Fund. p. 03.

ผลงานตีพิมพ์ทางหนังสือพิมพ์และสื่ออินเทอร์เน็ต (บางส่วน)

เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ พัฒนาสารสกัด"ข้า"สู่ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย วันที่ 14 มกราคม 2548.

เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ วิจัยพบ"ข้า"ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 15 มกราคม 2548 เวลา 12:39 น.

<http://www.manager.co.th/>

เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ เร่งวิจัย"ข้า"เป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ด้านเชื้อหนองค้อยา หนังสือพิมพ์บ้านเมือง ประจำวันจันทร์ที่ 17 มกราคม 2548.

เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ "ข้า"สยบเชื้อค้อยา เติ้งวิจัยสูตรใหม่ผสมสารสมุนไพร หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ ประจำวันอังคารที่ 18 มกราคม 2548.

เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ วิจัย"ข้า"ทำยาปราบเชื้อแบคทีเรียจอมค้อ หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน ประจำวันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2548 หน้า 43.

เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ พัฒนาศารสกัดจาก"ข้า"แทนยาปฏิชีวนะสมัยใหม่ ชัยยังเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง หนังสือพิมพ์สยามรัฐ ประจำวันศุกร์ที่ 28 มกราคม 2548.

เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ สารสกัด"ข้า"ส่วนผสมยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ด้านเชื้อหนองค้อยา หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์ ประจำวันอาทิตย์ที่ 13 กุมภาพันธ์ 2548 หน้า B5.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- 7.4.1 The effects of *Cordyceps sinensis* and *Gymnema inodorum* extracts on antihyperglycemia, antihyperlipidemia in mice and mechanism of action การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 90%
- 7.4.2 Clinical efficacy and safety of Clindamycin and Galangal, Fingerroot, or Mangosteen crude extract gels for acne vulgaris treatment การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 50%
- 7.4.3 Herbal medicine development of *Oroxylum indicum*, *Pandanus amaryllifolius*, and *Hibiscus sabdarriffa* extracts for anti-hyperlipidemic in human and mechanism of Action การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 50%
- 7.4.4 Research and innovation on herbal medicine from *Butea superba* Roxb for treatment

and protection of Alzheimer disease and infertility in men การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ
10%

.....



ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ นางสาวศจีรา คุปพิทยานันท์

Mrs. Sajeera Kupittayanant

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 3097 00159 47 9

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ (044) 224633 โทรสาร (044) 224633

e-mail: sajeera@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันศึกษา	ประเทศ
2538	ตรี	สพ.บ.	สัตวแพทยศาสตร์ (เกียรตินิยม)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2543	โท	M.Sc.	Physiology	Univ. of Liverpool	UK
2546	เอก	Ph.D.	Physiology	Univ. of Liverpool	UK

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
การทดสอบฤทธิ์ทางสรีรวิทยาและความเป็นพิษของสมุนไพร

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ
ทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย (ปิดโครงการแล้ว):

1. ผลของการเสริมกรดไขมันต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกในโคนม
2. ผลของสารสกัดจากวเครือขาวต่อการหดตัวของเส้นเลือดและของมดลูกในหนูทดลองเพศเมีย
3. ผลของการเสริมกระชายดำในอาหารต่อลักษณะเพศในสุกรพ่อพันธุ์
4. ผลของเวลาในการรีดนมต่อระดับระดับเมลาโทนินในน้ำนมโค
5. สรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกไก่ไข่ในช่วงก่อน ระหว่าง และหลังการวางไข่

6. ผลของยาต้านจุลชีพต่อการหดตัวของมดลูกสุกร
 7. ผลของสารสกัดจากทับทิมต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูทดลองเพศเมีย
 8. การศึกษาสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกในหมูป่าไทย
 9. ระดับของเล็ปตินในกระแสเลือดและน้ำมันในโคพื้นเมืองไทย
 10. รากสามสิบ: กลไกการออกฤทธิ์ต่อการหดตัวของมดลูก
 11. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีต่อการหดตัวของมดลูก
 12. ผลของน้ำมันสกัดเมล็ดถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.) ต่อ
 13. การป้องกันภาวะผิดปกติเนื่องจากการขาดฮอร์โมนเพศ
- 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

ผลงานการวิจัยที่ตีพิมพ์ (Full Papers & Abstracts)

Full Papers

- 1) Aroon S, Hill III G J, Artchawakom T, Pinmongkhogul S, **Kupittayanant S**, Thanee N (2015). Ectoparasites associated with bats in tropical forest of northeastern Thailand. **Journal of Agricultural Technology**;11(8):1781-1792.
- 2) Munglue P, **Kupittayanant S**, Kupittayanant P (2014). Effect of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Flesh Extract on Sexual Behavior of Male Rats. CMUJ NS Special Issue on **Food and Applied Bioscience**;13(1):159-527.
- 3) Sukwan C, Wray S, **Kupittayanant S** (2014). The effects of Ginseng Java root extract on uterine contractility in nonpregnant rats. **Physiology Reports**;3:2(12).
- 4) Teethaisong Y, Autarkool N, Sirichaiwetchakoon K, Krubphachaya P, **Kupittayanant S**, Eumkeb G (2014). Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* Forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Sciences**;11:21:90.
- 5) **Kupittayanant S**, Munglue P, Lijuan W, Promprom W, Budhaklala N, Wray S (2014). Finding new agents in medicinal plants to act on the myometrium. **Experimental Physiology**;99(3):530-7.
- 6) Kamonwannasit S, Nantapong N, Kumkrai P, Luecha P, **Kupittayanant S**, Chudapongse N (2013). Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus*

epidermidis by disruption of cell wall. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**;20:12:20.

7) Mangprayool T, **Kupittayanant S**, Chudapongse N (2013). Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. **Fitoterapia**;89:68-73.

8) Munglue P, Eumkep G, Wray S, **Kupittayanant S** (2013). The Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts and L-Citrulline on Rat Uterine Contractility. **Reproductive Sciences**; 20:437-448.

9) Suwannachat A, Kupittayanant P, **Kupittayanant S** (2011). Contractile activity in the chick uterus. **Journal of Animal and Veterinary Advances**;10:2986-2989.

10) Lijuan W, Kupittayanant P, Chudapongse N, Wray S, **Kupittayanant S** (2011). The effects of wild ginger (*Costus speciosus* (Koen) Smith) rhizome extract and diosgenin on rat uterine contractions. **Reproductive Sciences**;18: 16-524.

11) Promprom W, Kupittayanant P, Indrapichate K, Wray S, **Kupittayanant S** (2010). The effects of pomegranate seed extract and beta-sitosterol on rat uterine contractions. **Reproductive Sciences**;17: 88-296.

12) **Kupittayanant S**, Kupittayanant P (2010). The roles of pH in regulation of uterine contraction in the laying hens. **Animal Reproduction Science**;118:317-323.

13) **Kupittayanant S**, Kupittayanant P, Suwannachat C (2009). Mechanisms of uterine contraction in laying hens. **Animal Reproduction Science**;115:215-224.

14) Buddhakala N, Talubmook C, Sriyotha P, Wray S, **Kupittayanant S** (2008). Inhibitory effects of ginger oil on spontaneous and PGF_{2α}-induced contraction of rat myometrium. **Planta Medica**;74:385-391.

15) Matthew A, **Kupittayanant S**, Burdyga T, Wray S (2004). Characterization of contractile activity and intracellular Ca²⁺ signalling in mouse myometrium. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**;11:207-212.

16) Jones K, Shmygol A, **Kupittayanant S**, Wray S (2004). Characterization of calcium-activated chloride currents in rat and human uterine smooth muscle. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**;488:36-43.

- 17) Monir-Bishty E, Pierce SJ, **Kupittayanant S**, Shmygol T, Wray S (2003). The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium. **Journal of Obstetrics & Gynaecology**;110:1050-1056.
- 18) Wray S, Jones K, **Kupittayanant S**, Li Y, Matthew A, Monir-Bishty E, Pierce SJ, Noble K, Shmygol A, Quenby S (2003). Calcium signalling and uterine contractility. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**;10: 52-264.
- 19) Pierce SJ, **Kupittayanant S**, Shmygol T, Wray S (2003). Effects of intracellular and extracellular pH change on Ca²⁺ signaling and force in pregnant myometrium. **American Journal of Obstetrics & Gynaecology**;188: 031-1038.
- 20) Wray S, **Kupittayanant S**, Shmygol T (2002). Role of the sarcoplasmic reticulum in uterine smooth muscle. **Novartis Foundation Symposium**;246: 6-18.
- 21) **Kupittayanant S**, Lukas MJM, Wray S (2002). Effect of inhibiting the sarcoplasmic reticulum on spontaneous and oxytocin-induced contractions of human myometrium. **An International Journal of Obstetrics & Gynaecology (BJOG)**;109: 289-296.
- 22) Wray S, **Kupittayanant S**, Shmygol A, Smith RD, Burdyga T (2001). The physiological basis of uterine contractility: A short review. **Experimental Physiology**;86:239-246.
- 23) **Kupittayanant S**, Burdyga T, Wray S (2001). The effects of inhibiting Rho-associated kinase with Y-27632, on force and intracellular calcium in human myometrium. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**;443:112-114.
- 24) Longbottom ER, Lukas MJM, **Kupittayanant S**, Badrick E, Shmygol A, Wray S (2000). The effect of wortmannin, an inhibitor of myosin light chain kinase (MLCK) on calcium and contraction in isolated human and rat myometrium. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**;440:315-321.

Conference Proceedings (Abstracts):

- 1) Jirawiwatkul N, **Kupittayanant S** (2016). Blood and Milk Leptin Levels in Thai Native Cattle. **Proceedings of the 17th AAAP Animal Science Congress**, Fukuoka, Japan.

- 2) Kupittayanant P, Kusolrat P, Moolpanich A, Thaeomor A, **Kupittayanant S** (2013). Estrogen activities of winged bean seed oil in ovariectomized rats. **Proceedings of IUPS2013**, Birmingham, UK.
- 3) Kusolrat P, **Kupittayanant S** (2013). The effects of *Moringa oleifera* Lam. seed oil in ovariectomized rats. **Proceedings of IUPS2013**, Birmingham, UK.
- 4) Thanamool C, **Kupittayanant S** (2013). Tocolytic Effects of *Talinum paniculatum* Leaf Extract in Female Virgin Rats. **Proceedings of IUPS2013**, Birmingham, UK.
- 5) Suwannachat A, Kupittayanant P, **Kupittayanant S** (2012). Shatavari (*Asparagus racemosus*) extract can relax the myometrium. **Proceedings of Physiology 2012**, Edinburgh, UK.
- 6) Munglue P, Eumkep G, Wray S, **Kupittayanant S** (2012). Uterine relaxant effects of watermelon (*Citrullus lanatus*) extracts. **Proceedings of Physiology 2012**, Edinburgh, UK.
- 7) **Kupittayanant S**, Promprom W, Indrapichate K, Kupittayanant P (2009). Effects of Thai pomegranate treatment in mammary gland uterus and vagina. **The Journal of Physiological Sciences** 59 (Suppl.1): 336.
- 8) Kupittayanant P, **Kupittayanant S** (2009). Daily and rhythmicity of body temperature in swine. **The Journal of Physiological Sciences** 59 (Suppl.1): 334.
- 9) Buddhakala N, Khat-Bhet N, Lijuan W, **Kupittayanant S**, Kupittayanant, P (2008). Effects of noni fruit extract on intestinal contractility in rats. **Proceedings of the 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF**, Athens, Greece
- 10) Promprom W, Lijuan W, Munglue P, Kupittayanant P, Indrapichate K, **Kupittayanant S** (2008). Estrogenic effects of pomegranate extracts in ovariectomized rats. **Proceedings of the 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF**, Athens, Greece.
- 11) Chaowiset W, **Kupittayanant S**, Manakasem Y (2008). The effect of white Kwao Krua [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] crude extract containing puerarin on vascular relaxation in the White Rat (*Rattus norvegicus*). **Proceedings of the 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF**, Athens, Greece.

- 12) Promprom W, **Kupittayanant S**, Indrapichate K, Kupittayanant P (2007). Effects of pomegranate extracts on rat uterine contraction. **Proceedings of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research**, Graz, Austria.
- 13) Kupittayanant S, Kupittayanant P, Lijuan W, Buddhakala N, Phaopongthai J (2007). Effects of *Kaempferia parviflora* supplement on semen production and reproductive system of boar. **Proceedings of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research**, Graz, Austria.
- 14) Lijuan W, **Kupittayanant S**, Yoohat K, Kupittayanant P, Chunlun S, Papirom P (2007). Effect of fresh garlic supplements on serum cholesterol levels of boiler chickens. **Proceedings of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research**, Graz, Austria.
- 15) Kupittayanant P, Munglue P, Saraphat W, Danooapat T, **Kupittayanant S** (2007). Effects of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* on sexual behaviour of normal male rats. **Proceedings of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research**, Graz, Austria.
- 16) Buddhakala N, **Kupittayanant S** (2006). The effects of ginger oils on uterine contraction. **Proceedings of the 54th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research**, Helsinki, Finland.
- 17) Kupittayanant P, Chasombat J, Suksombat W, **Kupittayanant S** (2005). Effects of bypass fat supplementation on the oestrous cycle duration of early lactating cows. **Proceedings of AHAT-BSAS International Conference** (The British Society of Animal Science and the Animal Husbandry Association of Thailand), Khon Kaen, Thailand.
- 18) **Kupittayanant S**, Jones K, Shmygol A, Wray S (2003). The functional effects of inhibiting chloride channels differ between rat and human Myometrium. **Proceedings of the SGI Meeting, Washington DC, USA**.
- 19) Jones K, Shmygol A, **Kupittayanant S**, Wray S (2003). Characterization of calcium-activated chloride currents in rat and human uterine smooth muscle. **Proceedings of the Physiological Society Joint Meeting with the Spanish Physiological Society**, Tenerife, Spain.

- 20) Pierce SJ, **Kupittayanant S**, Shmygol T, Wray S (2002). Effects of intracellular and extracellular pH change on Ca^{2+} signaling and force in pregnant myometrium. **Proceedings of the Physiological Society Joint Meeting with the Italian Physiological Society**, Liverpool, UK.
- 21) **Kupittayanant S**, Burdyga T, Wray S (2002). The effects of inhibiting myosin light chain phosphatase on force and intracellular calcium in human myometrium. **Proceedings of the Physiological Society Joint Meeting with the Scandinavian Physiological Society and the German Physiological Society**, Tübingen, Germany.
- 22) **Kupittayanant S**, Burdyga T, Wray S (2001). Inhibiting Rho-associated kinase has little effect in human uterus. **Proceedings of the SGI Meeting**, Toronto, Canada.
- 23) **Kupittayanant S**, Lukas MJM, Wray S (2000). Inhibiting the sarcoplasmic reticulum in human uterus does not decrease contraction. **Proceedings of the Physiological Society Joint Meeting with the Hungarian Physiological Society**, Budapest, Hungary.
- 24) Longbottom ER, Lukas MJM, **Kupittayanant S**, Badrick E, Shmygol A, Wray S (1999). The effect of wortmannin, an inhibitor of myosin light chain kinase (MLCK) on calcium and contraction in isolated human and rat myometrium. **Proceedings of the Physiological Society Meeting**, Glasgow, Scotland, UK.

7.4งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

ชื่อข้อเสนอการวิจัย	ศิริวิทยาคารหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกในหนูตั้งท้องที่เป็นเบาหวาน
แหล่งทุน	วช.-มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ปีงบประมาณ 2557)
สถานภาพ	เขียนรายงานวิจัย

.....

ประวัตินักวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. Name: Sanong Suksaweang, M.T., Ph.D.

2. School/Institute: School of Medicine (Pathology), Institute of Medicine

3. University: Suranaree University of Technology

Tel: 044-223935

Fax: 044-223920

E-mail: suksawea@sut.ac.th

4. Degrees: Field / Date Awarded /Institute / Country

B.Sc. in Medical Technology with honor; Khon Kaen University, Thailand

M.S. in Experimental and Molecular Pathology; University of Southern California, United States of America

Ph.D. in Pathobiology; University of Southern California, United States of America

5. Experiences:

Period Position Institution / Firm

1992 – 1994 Medical Technologist, Bumrungrad Hospital, Bangkok, Thailand

1994 - 1997 Medical Technologist Researcher, HIV/AIDS Collaboration, Nonthaburi, Thailand

1997 - 1998 Ph.D.Scholar, Allegheny University of Health Sciences, Philadelphia, United States of America

1998 - 2000 M.S. Scholar, University of Southern California, Los Angeles, United States of America

2000 - 2005 Ph.D. Scholar, University of Southern California, Los Angeles, United States of America

2005 - Present Teacher, Suranaree University of Technology, Thailand

6. Publications:

Young, N.L., Ponglertnapakorn, P., Shaffer, N., Srisak, K., Chaowanachan, T., On-Thern, V., Kittinunvorakoon, C., Bunwattanakul, A., **Suksaweang, S.**, Pobkeeree, V., Punnotok, J. and Mastro, T.D., 1997. Clinical field site evaluation of the FACSCCount for absolute CD3+, CD3+ CD4+, and CD3+ CD8+ cell count determinations in Thailand. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4, 783-6.

Wu, P., Hou, L., Plikus, M., Hughes, M., Schemet, J., **Suksaweang, S.**, Widelitz, R., Jiang, T.X. and Chuong, C.M., 2004. Evo-Devo of amniote integuments and appendages. *Int J Dev Biol.* 48, 249-70.

Chodankar, R., Chang, C.H., Yue, Z., Jiang, T.X., **Suksaweang, S.**, Burrus, L., Chuong, C.M. and Widelitz, R., 2003. Shift of localized growth zones contributes to skin appendage morphogenesis: role of the Wnt/beta-catenin pathway. *J Invest Dermatol.* 120, 20-6.

Wu, P., Jiang, T.X., **Suksaweang, S.**, Widelitz, R.B. and Chuong, C.M., 2004. Molecular shaping of the beak. *Science.* 305, 1465-6.

Wu, P., Hou, L., Plikus, M., Hughes, M., Schemet, J., **Suksaweang, S.**, Widelitz, R., Jiang, T.X. and Chuong, C.M., 2004. Evo-Devo of amniote integuments and appendages. *Int J Dev Biol.* 48, 249-70.

Suksaweang, S., Lin, C.M., Jiang, T.X., Hughes, M.W., Widelitz, R.B. and Chuong, C.M., 2004. Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. *Dev Biol.* 266, 109-22.

Suksaweang, S., Jiang, T.X., Roybal, P., Chuong, C.M. and Widelitz, R., 2012. Roles of EphB3/ephrin-B1 in feather morphogenesis. *Int J Dev Biol.* 56, 719-28.

Ngernsoungern, P., Sartsoongnoen, N., Prakobsaeng, N., Chaiyachet, O.A., Chokchaloemwong, D., **Suksaweang, S.**, Ngernsoungern, A. and Chaiseha, Y., 2012. Plasma leptin concentrations during the reproductive cycle in the native Thai chicken (*Gallus domesticus*). *Anim Reprod Sci.* 136, 115-20.

Tsai, M.S., **Suksaweang, S.**, Jiang, T.X., Wu, P., Kao, Y.H., Lee, P.H., Widelitz, R. and Chuong, C.M., 2015. Proper BMP Signaling Levels Are Essential for 3D Assembly of Hepatic Cords from Hepatoblasts and Mesenchymal Cells. *Dig Dis Sci.* 60, 3669-80.

7. Books

1. โครงการตำราศึกษาด้วยตนเองสำหรับนักศึกษาแพทย์ ชั้นปีที่ 1 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สมอง สุขแสงและคณะ (2549): โอ.เอส. พรินต์ติ้ง เฮ้าส์ กรุงเทพมหานคร

8. งานแปลตำรา

8.1 สมอง สุขแสง (2549): หลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต (ฉบับปรับปรุง พ.ศ. 2549) ไปเป็น Doctor of Medicine (Revised 2006)

9. บทเรียนออนไลน์

10. Awards:

Monbusho Foudation Scholarship for 2 years, Khon Kaen University, 1990 - 1991.

The Royal Thai Government Scholarship, MUA, To study M.S. and Ph.D. in the U.S.A for 5 and a half years.

11. Research Interest

Clinical Pathology: Particularly liver cancer, HIV/AIDS, and Stem cells.

Developmental Biology

Social Medicine: Elephant and Human relationship

12. งานอื่นๆ

12.1 งานที่ปรึกษาของนักศึกษา

a) ปรึกษาหารือ จำนวน 70 คน

b) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตศึกษา ยินดีรับทั้งปริญญาโท และ เอก

12.2 งานร่างหลักสูตรชีวเวชศาสตร์ (Biomedical Sciences) ระดับปริญญาตรี โท-เอก กำลังอยู่ระหว่าง

ดำเนินการร่างและเสนอหลักสูตรดังกล่าวต่อทางมหาวิทยาลัย โดยเป็นคณะทำงานร่างหลักสูตรดังกล่าว

12.3 งานบริการวิชาการ ได้แก่ เป็น

- ผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อพิจารณาคำขอใช้สิทธิ์เพื่อการศึกษาวิจัย
- หัวหน้าโครงการปรับปรุงการพูดภาษาอังกฤษสำหรับนักศึกษาวิทยาศาสตร์สุขภาพไทย

12.4 งานบริหาร

12.5 งานอื่นๆเช่น คณะกรรมการ, การบริการชุมชนและสังคม



ส่วน ค : ประวัติคณะผู้วิจัย

Dr. Sakesit Chumnarnsilpa (CV)

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ดร. เสกสิทธิ์ ชำนาญศิลป์ ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) **Dr. Sakesit Chumnarnsilpa**
2. วันเดือนปีเกิด 11 ธันวาคม 2510
3. ระบุเลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5409999040001
4. สถานที่เกิด 114/157 ถ.ราชสีมาปักษ์วงษ์ หมู่บ้าน แลนแอนด์เฮ้าส์ปาร์ค ต.หนองจะบก อ.
เมือง จ.นครราชสีมา
5. สถานภาพการสมรส โสด
6. ตำแหน่งปัจจุบัน Lecturer in Medical Biochemistry
7. ที่อยู่หน่วยงาน สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี...111
ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
8. เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้/ เบอร์โทรศัพท์มือถือ
โทรศัพท์ 044-224167 โทรสาร ..044-224648 และ 044-224185
โทรศัพท์เคลื่อนที่ 087-4198273 อีเมล sakesit@sut.ac.th หรือ dr.sakesit@gmail.com
9. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2532	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2543	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
พ.ศ. 2547	Master of Science (Medical Science) Uppsala University, Uppsala, Sweden
พ.ศ. 2550	Ph.D (Medical Biochemistry) Uppsala University, Uppsala, Sweden
พ.ศ. 2554	D. Phil (Structural Biology) Oxford University, Oxford, UK
10. ประวัติการทำงานที่สำคัญ และ Professional Activities

พ.ศ. 2533-2534	นักวิทยาศาสตร์ที่ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
----------------	--

พ.ศ. 2544-2547 นักวิทยาศาสตร์ที่ Institute Medical Biochemistry and Microbiology (IMBIM), Uppsala University, Sweden

พ.ศ. 2547-2549 นักวิทยาศาสตร์ที่ Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB), A-star, Singapore

11. เกียรติประวัติ/รางวัลที่เคยได้รับ

12. ผลงาน เช่น วารสารวิชาการระดับนานาชาติ, วารสารวิชาการระดับชาติ, บทความ, หนังสือ, สิทธิบัตร (ทั้งในประเทศและต่างประเทศ)

Publications:

Teethaisong, Y., Eumkeb, G., **Chumnarnsilpa, S.**, Autarkool, N., Hobson, J., Nakouti, I., Hobbs, G., and Evans, K. (2016). Phenotypic detection of AmpC beta-lactamases, extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases in Enterobacteriaceae using a resazurin microtitre assay with inhibitor-based methods. *Journal of medical microbiology*. 65(10): 1079-1087.

Chumnarnsilpa S, Robinson R C, Grimes J M, Lerlat C., Calcium-controlled conformational choreography in the N-terminal half of adseverin. *Nat Commun.* . [Accepted 3 Aug 2015, DOI: 10.1038/ncomms9254]

Chumnarnsilpa S, Lee WL, Nag S, Kannan B, Larsson M, Burtnick LD, Robinson RC., The crystal structure of the C-terminus of adseverin reveals the actin-binding interface., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13719-24.

Nag S, Ma Q, Wang H, **Chumnarnsilpa S**, Lee WL, Larsson M, Kannan B, Hernandez-Valladares M, Burtnick LD, Robinson RC., Ca²⁺ binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13713-8.

Wang H, **Chumnarnsilpa S**, Loonchanta A, Li Q, Kuan YM, Robine S, Larsson M, Mihalek I, Burtnick LD, Robinson RC., Helix straightening as an activation mechanism in the gelsolin superfamily of actin regulatory proteins., *J Biol Chem.* 2009 Aug 7;284(32):21265-9.

Chumnarnsilpa S, Loonchanta A, Xue B, Choe H, Urosev D, Wang H, Lindberg U, Burtnick LD, Robinson RC., Calcium ion exchange in crystalline gelsolin., *J Mol Biol.* 2006 Mar 31;357(3):773-82. Epub 2006 Jan 26.

Narayan K, **Chumnarnsilpa S**, Choe H, Irobi E, Urosev D, Lindberg U, Schutt CE, Burtnick LD, Robinson RC., Activation in isolation: exposure of the actin-binding site in the C-terminal half of gelsolin does not require actin., *FEBS Lett.* 2003 Sep 25;552(2-3):82-5.

Chumnarnsilpa S, C. Lerlat, J.Grimes and Robinson RC., The crystal structures of N-terminus of adseverin reveal the differences in the initial calcium activation between adseverin and gelsolin. In preparation.

Chumnarnsilpa S, C. Lerlat, J.Grimes and Robinson RC., The C-terminus of molecule plays important roles in controlling actin binding activity of gelsolin and adseverin. In preparation.

ประวัติคณะผู้วิจัย

- ชื่อและนามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ธนาภรณ์ เสงประดม
ชื่อและนามสกุล (ภาษาอังกฤษ) MISS TANAPORN HENGPRATOM
- หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 170-99-00-666-684
- ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษา
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์

อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สถานศึกษา สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ.มหาวิทยาลัย
ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

ที่อยู่ตามทะเบียนบ้าน 29 ถนนรัตนเสถียร ตำบลเบตง อำเภอเบตง จังหวัดยะลา 95110

โทรศัพท์ 081-5687438

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ : tanapornhengpratom@gmail.com

: Minneymouse_1010@windowslive.com

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2556-ปัจจุบัน วิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต (ชีวเวชศาสตร์)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (นักศึกษาคณะโครงการปริญญาเอกกาญจนา
ภิเษก) เกรดเฉลี่ยสะสม 3.95

พ.ศ. 2553-2556 กายภาพบำบัดบัณฑิต (กภ.บ.) (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เกรดเฉลี่ยสะสม 3.91

6. ผลงานทางวิชาการ

Refereed articles:

Siriwong, S., Thumanu, K., Hengpratom, T., and Eumkeb, G. (2015). Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. vol. 2015, Article ID 759459, 12 pages, doi:10.1155/2015/759459.

(Impact Factor 2017 = 2.064).

Eumkeb, G., Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., **Hengpratom, T.**, and Naknarong, W. (2017). The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice. *Natural Product Research*. 31(6), 672-675. DOI:10.1080/14786419.2016.1180603.

(Impact Factor 2017 = 1.928).

Hengpratom, T., Lowe, G., Thumanu, K., Suknasang, S., Tiomyom, K., Eumkeb, G., (2018). *Oroxylum indicum* (L.) Kurz extract inhibits adipogenesis and lipase activity in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18(1), 177. doi: 10.1186/s12906-018-2244-3.

(Impact Factor 2107 = 2.109, ISI Web of Science; Q1)

Conference Proceedings:

Eumkeb, G., Duangkham, A., & **Hengpratom, T.** (2014, May 6-8, 2014.). Subchronic toxicity test of quercetin and cloxacillin in mice. Paper presented (**Poster presentation**) at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand. 87.

Conference Abstracts:

Kabkhunthod, S., Pimchan, T., Teethaisong, Y., **Hengpratom, T.** and Eumkeb, G., (2017). Anti *Propionibacterium acnes* activity of *Oroxylum indicum* (L.) extract, in: The 2nd International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017. KKU, **Abstract Book** (Poster presentation, T5-P-ST-049). 25-27 January 2017, Asia hotel, Bangkok, Thailand, p. 499.

Hengpratom, T., Thumanu, K. and Eumkeb, G. (2017). Detecting the effect of *Oroxylum indicum* (L.) on anti-adipogenesis in 3T3-L1 cells using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. In: The 5th RGJ meeting and 118th RGJ seminar series, **Abstract book** (Energy for Thailand 4.0, Oral presentation,

RGJ5-O-07). May 1-2, 2017, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, p. RGJ5-O-07.

Hengpratom, T., Eumkeb, G., and Lowe, G.M. (2018). Proposed mechanisms for the action of *Oroxylum indicum* extract on adipocyte differentiation. The Nineteenth RGJ-Ph.D. Congress (RGJ-Ph.D. Congress XIX). The Thailand Research Fund. **Abstract Book** (Oral presentation, ABE-O3). June 7-9, 2018, Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Chonburi., The Thailand Research Fund. p. 03.

7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ

- 7.4.1 The effects of *Cordyceps sinensis* and *Gymnema inodorum* extracts on antihyperglycemia, antihyperlipidemia in mice and mechanism of action การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 90%
- 7.4.2 Herbal medicine development of *Oroxylum indicum*, *Pandanus amaryllifolius*, and *Hibiscus sabdarriffa* extracts for anti-hyperlipidemic in human and mechanism of Action การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 50%
- 7.4.3 Research and innovation on herbal medicine from *Butea superba* Roxb for treatment and protection of Alzheimer disease and infertility in men การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 10%

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกนกวรรณ เทียมยม
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Kanokwan Tiamyom
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1840100328955
3. นักศึกษาระดับปริญญาโท สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์
4. หมายเลขโทรศัพท์ 085-742-6948, E-mail : kanokwan.fateema@gmail.com
5. สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนบ้านคอนมะตุม อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี
สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนน้ำรอบวิทยา อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี
สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนพุนพินพิทยาคม อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง (เกียรตินิยมอันดับสอง)
กำลังศึกษาระดับปริญญาโท สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ สันฐานวิทยา และกายวิภาคศาสตร์ของพืช
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 7.1 ผู้ช่วยวิจัย
 - 7.1.1 The effects of *Cordyceps sinensis* and *Gymnema inodorum* extracts on antihyperglycemia, antihyperlipidemia in mice and mechanism of action
 - 7.1.2 Herbal medicine development of *Oroxylum indicum*, *Pandanus amaryllifolius*, and *Hibiscus sabdariffa* extracts for anti-hyperlipidemic in human and mechanism of action
 - 7.2 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว
 - 7.2.1 Effect of flavonoids on lower blood lipid levels in hyperlipidemic mice (ผู้ช่วยโครงการวิจัย) การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%
 - 7.2.2 Herbal medicine development of *Oroxylum indicum*, *Pandanus amaryllifolius*, and *Hibiscus sabdariffa* extracts for anti-hyperlipidemic in human and mechanism of action การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 100%

ผลงานตีพิมพ์

Refereed articles:

Hengpratom, T., Lowe, G., Thumanu, K., Suknasang, S., **Tiamyom, K.**, Eumkeb, G., (2018). *Oroxylum indicum* (L.) Kurz extract inhibits adipogenesis and lipase activity in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18(1), 177. doi: 10.1186/s12906-018-2244-3.

(Impact Factor 2107 = 2.109, ISI Web of Science; Q1)

Conference Proceedings:

Tiamyom, K., Sirichaiwetchakoon, K. and Eumkeb, G., (2018). Anti-hyperlipidemic Effect of *Cordyceps sinensis* Extract on Mice, in: Srichana, T. (Ed.), The 5th Current Drug Development 2018 (CDD 2018) and the 3rd Herbal and Traditional Medicine 2018 (HTM2018), Conference proceedings, Oral: OH08. May 23-25, 2018. Prince of Songkla University, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, pp. 102-105.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.3.1 Research and innovation on herbal medicine from *Butea superba* Roxb for treatment and protection of Alzheimer disease and infertility in men การวิจัยเสร็จแล้วประมาณ 10%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี