



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้แนวทางเมตาบอโลมิกเพื่อศึกษาศักยภาพของยาสมุนไพรไทยในการรักษา:
ผลของว่านชักมดลูกในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนู

**“Metabolomics approaches for investigating therapeutic potential of Thai
traditional medicine: Effect of *Curcuma comosa* in estrogen deficient rats”**

โดย

ศ.ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ และคณะ
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

กันยายน พ.ศ. 2558

สัญญาเลขที่ DBG5680005

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การใช้แนวทางเมตาบอโลมิกส์เพื่อศึกษาศักยภาพของยาสมุนไพรไทยในการรักษา:

ผลของว่านชักมดลูกในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนู

“Metabolomics approaches for investigating therapeutic potential of Thai
traditional medicine: Effect of *Curcuma comosa* in estrogen deficient rats”

=====

คณะผู้วิจัยและสังกัด

1. ศ. ดร. ปาวินี ปิยะจตุรวัฒน์ (Prof. Pawinee Piyachaturawat)
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์: 02-354-7154, โทรสาร 02-354-7154
E-mail: pawinee.pia@mahidol.ac.th
2. ผศ. ดร. นวพร วินยเวคิน (Assist. Prof. Dr. Nawaporn Vinayavekhin)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์: 02-218-7639
3. ผศ. ดร. อาทิตย์ ชัยรุ่งเรือง (Assist. Prof. Dr. Arthit Chairoungdua)
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โทรศัพท์: 02-354-7154
4. ศ. ดร. ปทุมรัตน์ ตูจินดา (Prof. Dr. Patoomratana Tuchinda)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. นาย เจตจำนงค์ เสือใจ (Mr. Jetjamnong Sueajai)
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ที่ปรึกษา: ศ.ดร. อภิชาติ สุขสำราญ (Prof. Dr. Apichart Suksamrarn)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
แขวงหัวหมาก เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

ที่ปรึกษาในต่างประเทศ (Collaborator): Professor Guan Luo,
Director of Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine,
Tsinghua Univ., Beijing 100084, P.R.China

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (The Thailand Research Fund)
ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ประเภท ทุนวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์
ประจำปี 2556-2558 แก่โครงการวิจัยนี้

เรื่อง “การใช้แนวทางเมตาบอลิกเพื่อศึกษาศักยภาพของยาสมุนไพรไทยในการรักษา:
ผลของว่าน ชักมดลูกในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนู”
สัญญาเลขที่ DBG5680005

สารบัญ

หัวข้อ	เนื้อเรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ		
บทคัดย่อ		V
Abstract		VI
สรุปผลการดำเนินงาน		VII
1. บทนำ		1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย		3
3. วิธีวิจัย		4
4. ผลการวิจัย		11
4.1. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักร่างกาย มดลูก และไขมัน		12
4.2. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีในเลือด		14
4.3. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ		15
4.4. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของมวลกระดูก		17
4.5. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในซีรัม		19
4.5.1. การวิเคราะห์เปลี่ยนแปลงของเมตาบอไลต์		19
4.5.2. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไขมัน แบบมีเป้าหมาย		27
4.5.3. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไขมัน แบบไม่มีเป้าหมาย		36
4.6. การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในปัสสาวะ		42
5. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย		46
6. เอกสารอ้างอิง		52
7. ผลผลิตที่ได้จากการวิจัย (Output)		55
ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร		

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในกระแสเลือดแต่ละขณะ เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญ ที่บ่งบอกถึงสภาวะการทำงานของระบบอวัยวะต่างๆในร่างกายในขณะนั้นๆ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก ในหนูแรทที่ได้รับผลกระทบจากการถูกตัดรังไข่ออกไปเป็นระยะเวลานาน มีความผิดปกติเกิดขึ้น และได้รับการรักษาด้วยว่านชักมดลูก ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ด้านการอักเสบ ฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจน ลดไขมันในเลือดและบรรเทาการสูญเสียของมวลกระดูก นิยมนำมาใช้ในการบรรเทาอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆในสตรีวัยหมดประจำเดือน เพื่อความเข้าใจถึงการทำงานของว่านชักมดลูกในการออกฤทธิ์เสริมสุขภาพต่างๆที่พบ การวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์การรักษาของว่านชักมดลูกเชิงระบบในสัตว์ทดลองที่ตัดรังไข่ไปนาน 12 สัปดาห์และใช้ว่านชักมดลูกทั้งที่เป็นสารไฟโตเอสโตรเจน สารสกัดและผงว่านมารักษา เปรียบเทียบกับการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนขนาด $10 \mu\text{g/kg}$ ของน้ำหนักตัว ในการวิจัยได้ประเมินการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในซีรัมและปัสสาวะของหนู โดยใช้แนวทางเมทาโบโลมิกส์ทั้งแบบไม่เจาะจงสารเป้าหมายและแบบเจาะจงสารเป้าหมาย ด้วยเครื่องมือและวิธีของ LC-MS และ GC-MS ทำให้สามารถวัดสารต่างๆได้อย่างครอบคลุม ร่วมกับการวิเคราะห์ผลด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลพหุตัวแปร ประกอบด้วย PCA, PLS-DA และ OPLS-DA และการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์ ทำให้สามารถค้นหาตัวชี้วัดทางชีวภาพของพยาธิสภาพที่เกิด และใช้เป็นเครื่องมือในการประเมินประสิทธิผลของการรักษาด้วยว่านชักมดลูก ผลจากการวิเคราะห์พบว่า การตัดรังไข่ออกไปเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์หลายชนิด โดยเฉพาะไขมัน ได้แก่ ไขมันฟอสฟาติดิลโคลีน ไลโซฟอสฟาติดิลโคลีน โคเลสเตอรอล กลูโคส กลีเซอรอล และกรดไขมันอะราชิโดนิก มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่สารเบทาอินมีปริมาณลดลงในหนูตัดรังไข่เทียบกับหนูปกติ การให้การรักษาด้วยว่านชักมดลูกทำให้ระดับของสารต่างๆที่เปลี่ยนแปลงไปกลับมาอยู่ในระดับใกล้เคียงหนูปกติ ในขณะที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนในขนาดที่ใช้ นั้น ไม่สามารถทำให้ระดับของไขมันฟอสฟาติดิลโคลีนและไขมันไลโซฟอสฟาติดิลโคลีนลดลงได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในปัสสาวะของหนูตัดรังไข่ไม่มีปริมาณของสารอะราชิโดโนอิลเอไมด์ลดลง และสามารถทำให้กลับมาอยู่ในระดับปกติได้ด้วยการให้สารจากว่านชักมดลูก เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่นอกจากสารอะราชิโดโนอิลเอไมด์แล้ว ภายหลังจากการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน สารไฟโตเอสโตรเจน สารสกัดและผงว่านชักมดลูกแก่หนูที่ตัดรังไข่ยังทำให้ระดับของสารเอไมด์ต่างๆของกรดไขมันหลายชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระดับเดียวกัน

โดยสรุป การตัดรังไข่ออกไปเป็นเวลานาน มีผลกระทบรบกวนระบบเมตาบอลิซึมหลายระบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง metabolites ในวิถีกลีเซอรอโฟสโฟลิพิดและวิถีกรดอะราชิโดนิก สารเมตาบอไลต์ที่พบเหล่านั้นอาจใช้เป็นตัวชี้วัดที่สำคัญของพยาธิสภาพในการเกิดโรค ใช้ในการประเมินประสิทธิผลของการรักษาด้วยสารไฟโตเอสโตรเจนได้ ผลการวิจัยนี้เป็นหลักฐานหนึ่งที่ยืนยันประสิทธิภาพของว่านชักมดลูกในการใช้เสริมสุขภาพในสตรีวัยหมดประจำเดือน

คำสำคัญ: ว่านชักมดลูก หนูตัดรังไข่/เมทาโบโลมิกส์/ไลโซฟอสฟาติดิลโคลีน

ABSTRACT

Metabolites profiling provides insights information of the body functions under specific physiological as well as pathological condition. This study was aimed to investigate changes of serum metabolites in long term ovariectomized rats and after received treatment with *Curcuma comosa* Roxb. *C. comosa* has traditionally been used to relief unpleasant menopausal symptoms and exhibits varieties of pharmacological activities such as anti-inflammation, estrogenic-like action, lipid lowering, and sparing bone loss in the ovariectomized animals (OVX). To understanding on how *C. comosa* promotes health in menopausal women, we investigated its modulating effect on metabolites profiles in serum of the 12-week ovariectomized rats. The OVX rats were treated with *C. comosa* phytoestrogen, DPHD (50 $\mu\text{g/kgBW}$, sc), *C. comosa* ethanol extract (500 mg/kgBW) and powder (1000 and 2000 mg/kgBW), respectively, compared to that of 17β -estradiol (E₂, 10 $\mu\text{g/kgBW}$) for 12 weeks. The metabolite profiles in serum and urine of the OVX rats of both untargeted and targeted were analyzed by using chromatography coupled to mass spectrometry analytical platforms (LC-MS and GC-MS), with multivariate data analysis (PCA, PLS-DA, and OPLS-DA). These potential bioinformatics tools allow us to search biomarkers of the disturbance. There were 143 metabolites changes in OVX group compared to sham in which 92 were increased and 51 were decreased. By using untargeted, levels of five classes of lipids (ceramide, ceramide-1-phosphate, sphingomyelin, 1-*O*-alkenyl-lysophosphatidyl ethanolamine, and lysophosphatidyl ethanolamine) were elevated in the OVX rats compared to those in the SHAM whereas those of monoacylglycerol and triacylglycerol were decreased. E₂ treatment reversed only the levels of ceramides, whereas treatments with DPHD, *C. comosa* extract or powder could return the levels of all upregulated lipids back to SHAM control. The profound increases in serum levels of lysophosphatidyl cholines (lysoPCs), and arachidonic acid which are bioactive lipid mediators received much attention as play key roles in many pathological processes. Treatments with components of *C. comosa* all decreased level of those metabolites to the levels of sham.

In conclusions, the findings suggest the beneficial effects of *C. comosa* on preventing the increases in phospholipid metabolites in the OVX rats, which may be the cause of metabolic disturbance under estrogen deficiency. Overall, the results demonstrate the power of metabolomics in discovering disease-relevant biomarkers, as well as evaluating the effectiveness of treatment by *C. comosa* phytoestrogen and mixtures of compounds as utilized in Thai traditional medicine, thereby providing its modern scientific supports.

KEY WORDS: *Curcuma comosa*/ ovariectomized rats/ Metabolomics/phospholipids

สรุปผลการดำเนินงาน (Executive summary)

เมทาบอลโอมิกส์ (metabolomics) เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลิท์ (metabolite) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาชีววิทยาเชิงระบบ (systems biology) ที่ปัจจุบันได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัยทางยาและการแพทย์เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพื่อศึกษาภาพรวมของการตอบสนองของร่างกายทั้งระบบ และหาเป้าหมายในการรักษาโรค สารเมทาบอลิท์ที่เป็นสารชีวเคมีขนาดเล็ก ที่เกิดจากการทำงานของเซลล์ เป็นผลผลิตท้ายสุดของกระบวนการตอบสนองในระบบชีวภาพ ซึ่งจะแปรเปลี่ยนไปตามตัวแปรที่มากกระทบต่อร่างกาย และส่งผลต่อกระบวนการ metabolism ของเซลล์ โดยเซลล์จะสร้างหรือยับยั้งการปล่อยสาร metabolites ที่มีความจำเพาะกับสภาวะนั้นๆออกมา จึงอาจใช้เป็นดัชนีชี้วัดทำนายภาวะและกลไกของการเกิดโรค (biomarker of diseases) ได้ วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้เพื่อนำแนวทาง Metabolomics มาศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารจากสมุนไพรวานชักมดลูกในสัตว์ทดลองที่มีภาวะพร่องของฮอร์โมนจากรังไข่ ด้วยการตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ในเลือดของสัตว์ทดลอง ทั้งที่ไม่ได้รับสาร และที่ได้รับสารจากวานชักมดลูกเปรียบเทียบกับผลกับหนูปกติและกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน

ในการวิจัยได้ทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลิท์ ด้วยวิธีการทาง metabolomics ทั้งแบบที่กำหนดและไม่กำหนดเป้าหมาย (targeted and untargeted metabolomics) ได้ทำการวิเคราะห์สารเมทาบอลิท์ประเภทไขมันแบบที่ไม่กำหนดเป้าหมาย (untargeted lipidomics) ด้วยเทคนิค LC-MS และประเมินผลโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบพหุตัวแปร (multivariate data analysis) พบว่าการตัดรังไข่เป็นระยะเวลานาน 12 สัปดาห์ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารเมทาบอลิท์จำพวกไขมันประเภทต่างๆ (metabolite and lipid profile) ในเลือดอย่างชัดเจน แตกต่างจากหนูปกติกลุ่มควบคุม (sham) ข้อมูลนี้มีความสำคัญต่อการวิจัยเป็นอย่างยิ่ง แสดงให้เห็นถึงพยาธิสภาพภาวะผิดปกติที่เกิดขึ้นเป็น diseases model ของการตัดรังไข่เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ มีผลกระทบต่อการร่างกายอย่างชัดเจน การได้รับการรักษาด้วยวานชักมดลูกทั้งที่เป็นสารสกัด สารบริสุทธิ์ Diarylheptanoid (DPHD) และผงวานแห้ง และฮอร์โมนเอสโตรเจน มีผลบรรเทาการเปลี่ยนแปลงที่เป็นผลกระทบจากการตัดรังไข่ปรับตัวกลับเข้าสู่สภาวะปกติได้ ถึงแม้จะยังไม่สมบูรณ์ก็ตาม

สารเมทาบอลิท์ที่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงหลังการตัดรังไข่ดังกล่าว อาจใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่สำคัญ (biomarkers) ประกอบด้วยสารเมทาบอลิท์ปฐมภูมิ และสารเมทาทุติยภูมิ (primary and secondary metabolites) เป็นไขมันประเภทต่างๆ จากการศึกษาด้วยแนวทาง untargeted metabolomics พบว่าการตัดรังไข่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลิท์ทั้งหมด 143 ชนิด โดยมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจำนวน 92 ชนิดและลดลงจำนวน 51 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นไขมันกลุ่ม Glycerophospholipid จำพวก Phosphatidylcholine (PC) และ Lysophosphatidylcholines (LysoPC) ที่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นในหนูตัดรังไข่อย่างชัดเจน อาทิเช่น PC(18:0), PC(O-16:0), LysoPC(16:0), LysoPC(18:0) และ LysoPC(20:4) นอกจากนี้ ยังสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของไขมันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างกลุ่มตัดรังไข่โดยวิธีเมทาบอลโอมิกส์ของสารประเภทไขมันหรือลิพิดโอมิกส์ (lipidomics) ซึ่งมีไขมันทั้งสิ้น 134 ชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นจำนวน 79 ชนิด และมีปริมาณลดลงจำนวน 55 ชนิด โดยพบว่ามีไขมัน 7 กลุ่ม ได้แก่ 1-O-alkenyl-lysophosphatidylethanolamine (alkenyl-LPE), lysophosphatidyl-ethanolamine (LPE), ceramide-1-phosphate (CerP), ceramide

(Cer), sphingomyelin (Cer-PC) monoacyl-glycerol (MAG) และ triacylglycerol (TAG) เป็นต้น การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E_2) และวุ้นชั่งมดลูก ทำให้ไขมัน Cer มีปริมาณลดลงและมีความใกล้เคียงกับปริมาณของ Cer ในกลุ่มควบคุมปกติ สารเมทาบอลไลต์ดังกล่าวมีความสำคัญ และยังอาจเกี่ยวข้องกับมวลกระดูกและปริมาณของไขมันที่ลดลงในหนูที่ตัดรังไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าการรักษาด้วยสารสกัด และผงวุ้นชั่งมดลูกแห้ง ให้ผลดีกว่าสาร phytoestrogen DPHD บริสุทธิ์ที่แยกได้จากวุ้น โดยปริมาณของไขมันต่างๆ กลับเข้าสู่ระดับปกติในกลุ่มควบคุมได้มากกว่า

นอกจากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลต์ และการวิเคราะห์สารกลุ่มไขมันแบบไม่กำหนดเป้าหมายแล้ว ได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลต์ด้วยวิธีเมทาบอลิซึมแบบกำหนดเป้าหมาย (targeted metabolomics) โดยใช้วิธี GC-MS ได้ทำการวิเคราะห์สารเป้าหมายทั้งสิ้น 49 ชนิด ประกอบด้วย กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กรดไขมัน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสารจำนวน 13 ชนิด ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูที่ตัดรังไข่ พบการเพิ่มขึ้นของสารเมทาบอลไลต์ที่สำคัญ เช่น cholesterol, arachidonic acid, linoleic acid, palmitic acid, glycerol, glucose, serine, glycine และ tryptophan โดยการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถป้องกันได้ด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน และสารจากวุ้นชั่งมดลูก สำหรับผลการวิเคราะห์ metabolite ในปัสสาวะหนูหลังการตัดรังไข่ 12 สัปดาห์ได้พบว่ามีเพียง arachidonoylamide ซึ่งเป็น fatty amide ของ arachidonic acid มีระดับลดลง และการรักษาด้วยสารจากวุ้นชั่งมดลูกและฮอร์โมนเอสโตรเจน สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสารเมทาบอลไลต์ในเชิงชีววิถีของร่างกาย (metabolic pathway) พบว่าการตัดรังไข่ออกไปเป็นเวลานานมีผลกระทบต่อสัญญาณต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่างๆ (inflammatory) เช่น มีการเพิ่มปริมาณของสาร arachidonic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่ม eicosanoids เป็น pro-inflammatory agents และการได้รับสารจากวุ้นชั่งมดลูกทั้ง DPHD สารสกัด และผงจากวุ้นชั่งมดลูกสามารถต้านการเพิ่มปริมาณของสาร arachidonic acid ที่เกิดขึ้นได้ และการเปลี่ยนแปลงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ phospholipid metabolites ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้วุ้นชั่งมดลูกยังมีฤทธิ์ลดระดับของ cholesterol และ glucose ในเลือด ซึ่งเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่สำคัญในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน และภาวะการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) ในผู้สูงอายุที่ขาดฮอร์โมนจากรังไข่ บ่งบอกถึงความผิดปกติของระบบเผาผลาญพลังงาน นำไปสู่ภาวะอ้วน (obesity)

โดยสรุปภาวะขาดฮอร์โมนจากรังไข่เป็นระยะเวลานาน มีผลกระทบต่อระบบเมทาบอลิซึมของร่างกาย ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ที่สำคัญต่างๆ ในเลือดอย่างชัดเจน โดยเฉพาะสารที่เป็น phospholipid metabolites นำไปสู่การอักเสบที่เรื้อรัง และอาการแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นสามารถบรรเทาทำให้ลดลงได้ด้วยการให้วุ้นชั่งมดลูก นอกจากนี้ค่าการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่พบในการวิจัยนี้ ยังอาจใช้เป็นดัชนีในการคาดการณ์หรือเป็นตัวชี้วัด (biomarker) ภาวะพร่องฮอร์โมนจากรังไข่ และอาจนำไปใช้ประเมินผลของการรักษาด้วยสารสมุนไพรอื่นได้ต่อไปในอนาคต นับว่าวิธีการ metabolomics ที่นำมาดำเนินการนี้มีประโยชน์อย่างมาก ในการทำให้เห็นองค์รวมของการออกฤทธิ์ของสมุนไพร และการตอบสนองของร่างกาย

1. บทนำ

สืบเนื่องจากยุทธศาสตร์การพึ่งพาตนเองของประเทศ รัฐบาลได้กระตุ้นและสนับสนุนให้มีการใช้ยาจากสมุนไพรไทยในการรักษาและดูแลการเจ็บป่วย โดยเฉพาะในโรงพยาบาลของรัฐ อย่างไรก็ตามการใช้ยาสมุนไพรในโรงพยาบาลรัฐส่วนใหญ่ยังไม่เป็นยอมรับกัน ซึ่งต่างจากประเทศจีนและอินเดียที่มีการยอมรับและใช้การแพทย์ตะวันออก ใช้สมุนไพรควบคู่กันไปกับแพทย์แบบตะวันตกในการรักษาผู้ป่วยเป็นส่วนใหญ่ นอกจากการยอมรับในประสิทธิภาพของสมุนไพรที่ใช้มายาวนานในประเทศดังกล่าวแล้ว ในประเทศจีนยังได้มีการนำวิธีการสมัยใหม่มาใช้ศึกษา เพื่อยืนยันประสิทธิภาพ ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในนำตำรับยาสมุนไพรมาใช้ในการรักษา เช่น ใช้แนวทางชีววิทยาเชิงระบบ (System biology) มาประเมินผลการตอบสนองของร่างกายในระดับต่างๆหลังได้รับยา ตั้งแต่การแสดงออกของยีนส์ (Genomics) การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน (Proteomics) และของปริมาณสารเมตาโบไลต์ต่างๆ (Metabolomics) เป็นข้อมูลที่ใช้เปรียบเทียบ เชื่อมโยงการแพทย์แบบตะวันออกกับการแพทย์แบบตะวันตกได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามในประเทศไทย การนำแนวทางการศึกษาดังกล่าวมาใช้กับสมุนไพรยังไม่แพร่หลาย ถึงแม้จะมีบุคลากรและเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ทางเคมีอยู่แล้วก็ตาม หากแต่ขาดองค์ความรู้ด้านการจัดการและการนำข้อมูลมาต่อยอดให้เกิดประโยชน์อย่างเป็นระบบ ด้วยสมุนไพรแต่ละตำรับประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด มีการออกฤทธิ์เป็นองค์รวม ต่างจากยาที่เป็น target based แต่การรักษาที่ได้ผลดีกับเป้าหมายนั้น อาจจะมีผลเสียต่ออวัยวะอื่นๆ ส่งผลให้ต้องถูกถอนออกจากตลาดจากผลข้างเคียง อย่างไรก็ตามแนวทางการศึกษาและการแปลผลต่าง ๆ นั้น ต้องอาศัยฐานข้อมูล (Database) ของ metabolites และสารเคมีในพืชสมุนไพร ซึ่งประเทศไทยยังขาดส่วนนี้ จึงควรที่จะได้สร้างและสะสมข้อมูลขึ้นมาใช้ในประเทศ

ด้วยคณะวิจัยมีเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทางเคมี และมีองค์ความรู้ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรที่จะศึกษาและแนวทางการวิจัยทาง metabolomics จึงมีความสนใจในการริเริ่มสร้างโครงการวิจัยสมุนไพรไทยด้วยแนวทางการวิจัยชีววิทยาเชิงระบบขึ้นในประเทศ เพื่อสร้างบุคลากรที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญ และนำวิธีการไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาหาสาร metabolites ทั้งในร่างกายและในพืชต่อไป ในการวิจัยนี้เป็นการนำร่องโดยจะใช้วิธีการ Metabolomics มาศึกษาผลและปริมาณของการเปลี่ยนแปลงของ metabolites ทั้งที่เป็น endogenous metabolites ทั่วไป (global) และที่จำเพาะต่อการรักษา (specific) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการเปลี่ยนแปลง (biomarker) ในการประเมินภาวะต่างๆในการตอบสนองโดยระบบของร่างกาย

ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) เป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในประเทศไทย ได้มีการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างกว้างขวาง เพื่อเสริมสุขภาพ บรรเทาอาการต่างๆจาก ภาวะหมดประจำเดือน ซึ่งในพืชชนิดนี้ประกอบไปด้วยสารต่างๆที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน เป็นสารประเภท diarylheptanoid โดยเฉพาะสาร (3*R*)-1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD) ที่แยกได้จากว่านชักมดลูก สารนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง รวมทั้งฤทธิ์ที่คล้ายกับ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Suksamran et al. 2008, Winuthayanon et al. 2009a,b) ปัจจุบันพบว่าสาร DPHD นี้สามารถกระตุ้นการทำงานของกระบวนการสร้างกระดูก ด้วยการกระตุ้น Wnt/ β -catenin signaling และสามารถทำให้จำนวนของ mouse preosteoblastic cells (MC3T3-E1) เพิ่มขึ้น โดยออกฤทธิ์ผ่าน estrogen receptor pathway เหมือนกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Bhukhai et al. 2012) นอกจากนี้ สาร DPHD ยังสามารถเพิ่มจำนวนและกระตุ้นการทำงานของ human osteoblast cells (Tantikanlayaporn et al. 2013a) โดยเสริมการแสดงออกของ RUNX2 และ osterix ซึ่งเป็น osteoblast transcription factor จากการศึกษาพบว่า สาร DPHD สามารถเร่งการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกคือ COL1A1 และ osteocalcin เทียบได้กับฮอร์โมนมาตรฐาน (17β -estradiol; E2)

จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสาร DPHD และสารสกัดจากว่านชักมดลูกในหนูเพศเมียตัดรังไข่ (OVX rats) พบว่าสาร DPHD ที่ขนาดต่างๆ (25-100 mg/kgBW) ต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีผล บำรุงรักษาค่าปริมาตร จำนวน และความหนาของกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) มวลกระดูก (BMD) ของ tibial metaphysis ในหนูตัดรังไข่ที่ลดลงได้ ประกอบกับผลการวิเคราะห์ทาง histomorphometric ของโครงสร้างกระดูกชี้ให้เห็นผลของการให้สาร DPHD ที่ช่วยบรรเทาการสูญเสียของมวลกระดูกได้ คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนมาตรฐาน (Tantikanlayaporn et al. 2013a) สาร DPHD สามารถลด การทำงานของดัชนีชี้วัดของกระบวนการสร้างและสลายกระดูก (bone turnover) ประกอบด้วย osteocalcin และ tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร DPHD ที่แยก ได้จากว่านชักมดลูก เป็นสารที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเพื่อป้องกันภาวะกระดูกโปร่งบางในสตรีวัย หมดประจำเดือนได้ต่อไป (Tantikanlayaporn et al. 2013b)

ด้วยว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ที่สามารถบรรเทาอาการไม่พึงประสงค์อื่นๆใน สตรีวัยหมดประจำเดือนได้อีกหลายอย่าง ได้แก่ การลดการอักเสบ ลดระดับไขมันในเลือด ลดความเสี่ยง ของผนังหลอดเลือด ลดภาวะกระดูกโปร่งบาง เพื่อความเข้าใจในการทำงานของว่านชักมดลูกในร่างกาย ในการวิจัยนี้จึงจะนำวิธีทางด้านเมทาบอลอเมติกส์ (metabolomics) มาศึกษาฤทธิ์ของว่านชักมดลูกและ สารสำคัญที่ได้จากว่านชักมดลูก โดยใช้หนูทดลองที่จำลองภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยการตัดรัง ไข่ วิธีการนี้เป็นหนึ่งในแนวทางการวิจัยชีววิทยาเชิงระบบ (systems biology) ซึ่งจะเป็นการประเมินผล

ลัพท์ของการตอบสนองในภาพรวม ใช้หนูทดลองเพศเมียตัดรังไข่ทำให้เกิดภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในระยะยาว (long term estrogen deficiency) เป็น disease model ของการศึกษา จะทำการวัดประเมินผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กหรือเมทาบอลไลท์ (metabolite) ในซีรัมและปัสสาวะของหนู หลังการนั้นทำการศึกษาผลจากการรักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน และสารจากว่านชั้กมดลูก ซึ่งคาดว่าจะพบการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลท์ในเชิงบวกเมื่อได้รับสารจากว่านชั้กมดลูก การเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลท์ในสภาวะต่างๆดังกล่าว อาจจะนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ในการทำนายการเกิดโรค และบ่งชี้ผลของการรักษาโรคด้วยสมุนไพรว่านชั้กมดลูก ต่อภาวะกระดูกโปร่งบางได้ โดยที่ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะนำไปสู่ความรู้ในกลไกของอาการเนื่องมาจากการพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและผลของการรักษาของว่านชั้กมดลูก ในสตรีวัยหมดประจำเดือนได้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการนำร่องเพื่อนำวิธีวิจัยทาง Metabolomics มาใช้ศึกษาฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์ของสารจากสมุนไพรไทยที่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์อยู่แล้ว โดยจะใช้สมุนไพรเชิงเดี่ยวได้แก่ว่านชั้กมดลูก มีรายละเอียดดังนี้

- 2.1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ metabolites ในหนูที่ตัดรังไข่ (*in vivo* experiment) เป็นระยะเวลา 3 เดือนเปรียบเทียบกับหนูปกติ
- 2.2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของว่านชั้กมดลูกในการรักษาภาวะไขมันในเลือดสูง และภาวะกระดูกโปร่งบาง ในหนูที่ตัดรังไข่เป็นระยะเวลา 3 เดือนเปรียบเทียบกับหนูปกติ
- 2.3. เปรียบเทียบผลกับฤทธิ์ของฮอร์โมนมาตรฐาน estrogen และทำการวิเคราะห์สารที่อาจจะเป็นตัวชี้วัดของการเกิดโรคที่มีความจำเพาะ

3. วิธีวิจัย

3.1 การเตรียมสารจากว่านชั้กมดลูก

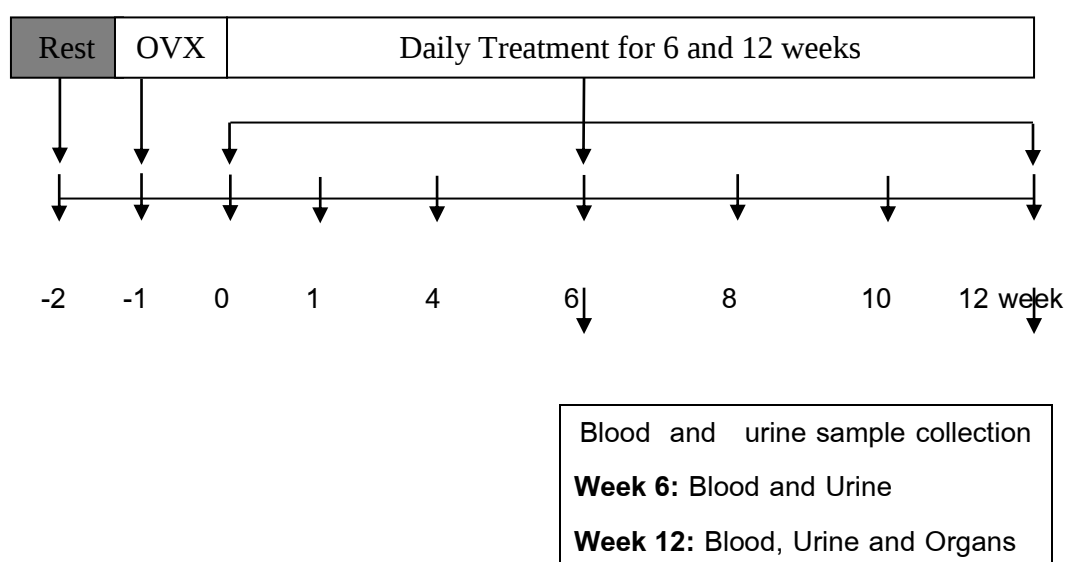
ว่านชั้กมดลูก หัวใต้ดินจากแหล่งปลูกที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ผงว่านที่ใช้ได้จากการปั่นขึ้นว่านแห้งจนเป็นผง และร่อนด้วยตระแกรงขนาด #60-80 ส่วนสารสกัดหยาบที่ใช้ทำการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ Ethanol 95 % จำนวน 3 ครั้ง ระเหย solvent ออกภายใต้ความดันสารสกัดดังกล่าวได้ดำเนินการทำ finger print เทียบกับสารมาตรฐาน Diarylheptanoid (DPHD) หรือสารASPP 049 จากว่านชั้กมดลูก ที่ใช้ในการศึกษานี้จัดเตรียมโดย ศ.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

3.2 การศึกษาในสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกโปรงบาง

ประกอบด้วยกลุ่มต่างๆ 7 กลุ่ม กลุ่มละ 7-8 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1. กลุ่มควบคุมปกติ (Sham operated control, SHAM)
- กลุ่มที่ 2. กลุ่มควบคุมที่ตัดรังไข่ (Ovariectomized control, OVX)
- กลุ่มที่ 3. กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับสาร 17β -estradiol ขนาด $10 \mu\text{g/kgBW}$ (E2, s.c.)
- กลุ่มที่ 4. กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับสาร ASPP 049 ขนาด 50 mg/kgBW (DPHD, s.c.)
- กลุ่มที่ 5. กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับสารสกัดวานชักมดลูก ขนาด 500 mg/kgBW (EXT, p.o.)
- กลุ่มที่ 6. กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับผงวานชักมดลูก ขนาด 1000 mg/kgBW (P1000, p.o.)
- กลุ่มที่ 7. กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับผงวานชักมดลูก ขนาด 2000 mg/kgBW (P2000, p.o.)

สัตว์ทดลองทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มควบคุมปกติ ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกโปรงบางด้วยการตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง เพื่อจำลองภาวะโรคกระดูกโปรงบางในสตรีวัยหมดประจำเดือนและสูงอายุ หลังการตัดรังไข่ 1 สัปดาห์ ให้สารทดสอบจากวานชักมดลูกหรือให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน (12 สัปดาห์) ซึ่งกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนนี้จะใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ในระหว่างการศึกษาจะติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองจนครบ 12 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 6 และ 12 สัปดาห์ จะได้เก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ในเลือดของสัตว์ทดลองต่อไป



แผนผัง-1 แสดงช่วงเวลาที่ทำการตัดรังไข่ การให้สารทดสอบต่างๆ และการเก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และอวัยวะต่างๆ

3.3. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในซีรัมแบบไม่มีเป้าหมาย (untargeted metabolomics) โดยวิธี LC-MS

3.3.1. การเตรียมตัวอย่างซีรัม

ทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ตามที่มีการรายงานไว้แล้ว (Want EJ et al., 2006) โดยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ดังนี้

1) ทำการตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างซีรัม 100 ไมโครลิตรด้วยเมทานอลแช่เย็น (ice cool methanol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มี trimipramine เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard; 50 ng/mL) ทำการปั่นตัวอย่างด้วย vortex mixer นาน 10 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างใส่ไว้ในตู้แช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2) นำตัวอย่างไปปั่นแยกที่ความเร็ว 15,000×g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปิดสารละลายส่วนใส ปริมาตร 450 ไมโครลิตรใส่หลอดทดสอบชนิดกันแหลม และระเหยตัวอย่างให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส

3) ละลายตะกอน (residue) ด้วยสารละลายผสม water/acetonitrile (80:20 v/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างถ่ายใส่ micro-volume insert ใน 2.0 mL vial ฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ทั้งขั้วบวกและขั้วลบ (Positive/Negative ionization mode)

3.3.2. การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ด้วย LC-MS

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมโดยใช้เทคนิค LC-MS ภาวะที่ใช้สามารถแยกสารเมตาบอไลต์ได้ทั้งกลุ่มมีขั้ว (polar) กลุ่มมีขั้วปานกลาง (mid-polar) และกลุ่มสารที่มีความเป็นขั้วน้อย (less polar) โดยระบบ LC-MS ที่ใช้มีสภาวะดังนี้

1) ระบบ HPLC (LC; Ultimate 3000, Dionex) ใช้คอลัมน์ ชนิด Luna C18, 100 mm x 2.1 mm , 3 μ m ด้วยอัตราไหลของ Mobile Phase 0.300 มิลลิเมตรต่อนาที (mL/min) โดย mobile phase A ที่ใช้เป็นสารละลาย 5 mM ammonium acetate ในสารละลาย 0.1% (v/v) formic acid และ mobile phase B เป็นสารละลาย 0.1% (v/v) formic acid ใน acetonitrile การแยกสารเมตาบอไลต์ด้วย LC เริ่มต้นด้วยอัตราส่วนของ mobile phase B ต่อ mobile phase A เป็น 5% (v/v) นาน 2 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วนของ mobile phase B เป็น 80% (v/v) ภายในเวลา 15 นาที และ 95% (v/v) ภายในเวลา 25 นาที และคงอัตราส่วน 95% (v/v) mobile phase B นี้ไว้ต่ออีก 5 นาที รวมเป็นเวลาทั้งสิ้น 30 นาที

2) ระบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer; MS) เป็นชนิด Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer (QTOF-MS, micrOTOF-Q II, Bruker) ทำการวิเคราะห์ในโหมดการวิเคราะห์ขั้วบวก (Positive mode) และขั้วลบ (Negative mode) ในช่วงมวลสาร 50-1500 ดาลตัน (Da)

โดยมีพารามิเตอร์ต่างๆ ของ MS ดังนี้ คือ ESI capillary voltage -500 V, end plate offset -4500 V, dry gas flow 8.0 L/min, nebulizer pressure at 30 psi และ drying temperature at 200 °C โดยทำการฉีดสารละลาย sodium formate ความเข้มข้น 10 mM เพื่อทำการปรับเทียบภายใน (internal calibration) ความถูกต้องของเลขมวลสารในทุกตัวอย่าง

3.3.3. การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม XCMS

ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม XCMS โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ LC-MS Data และ XCMS processing ดังนี้

1) Calibrate LC-MS data (Internal Calibration) ของทุกโครมาโตแกรม โดยใช้สารละลาย 10 mM Sodium formate เพื่อปรับค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio; m/z) ให้ได้ค่าเลขมวลที่แม่นยำ (accurate mass) ทำการเปลี่ยนไฟล์ข้อมูลดิบที่เป็นนามสกุลเดิมของเครื่อง LC-MS ที่ใช้ (.D, Bruker Daltonics) ให้เป็นนามสกุล .mzXML โดยใช้โปรแกรม CompassXport (Bruker Daltonics)

2) ส่งไฟล์ข้อมูล .mzXML เข้าโปรแกรม XCMS เพื่อทำ Normalization ของทุกข้อมูลและทำการเปรียบเทียบข้อมูลของกลุ่มควบคุม (SHAM) และกลุ่มทดลองต่าง (OVX, E2, DPHD, EXT, P1000 และ P2000) นำข้อมูล metabolites ion intensity ที่ได้จากโปรแกรม XCMS มาคำนวณค่าการเปลี่ยนแปลง (fold change) ทำการ normalize และเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลทุกกลุ่มการทดลอง

3) กำหนดค่า m/z ที่เป็น isotopic ion ให้เหลือเพียง protonated/adducted molecular ion ($[M+H]^+$ หรือ $[M+NH_4]^+$) โดยการตรวจสอบความถูกต้องจากโปรแกรมที่ใช้ในการประมวลผลของเครื่อง LC-MS (Compass data analysis, Bruker Daltonics) จากนั้นจึงนำ metabolite m/z features ค้นหาสารเมแทบอไลต์ในฐานข้อมูล METLIN (http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php) หรือ HMDB (<http://www.hmdb.ca/spectra/spectra/ms/search>) สร้างบัญชีรายชื่อสารหรือ metabolite feature (ion) ที่มีความแตกต่างระหว่างหนูกุ่มควบคุมปกติกับหนูกุ่มดัดแปลง เพื่อใช้เป็นสารตัวชี้วัดการรักษาด้วยสารมาตรฐานและวามเข้มข้น

3.3.4. การวิเคราะห์ยืนยันชนิดสารด้วย LC-MS/MS

นำไอออนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะพรีไอออนโมโนสโตรเจนที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS มาทำการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS เพื่อยืนยันความถูกต้องของสาร โดยใช้วิธีวิเคราะห์ด้วย LC เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ด้วย LC-MS ที่กล่าวไว้ในข้างต้น ส่วนขั้นตอนของการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวด้วยเทคนิค MS/MS ใช้การวิเคราะห์ในแบบ Multiple Reaction Monitoring (MRM) โดยเจาะจงเลือกไอออนที่ต้องการทำให้แตกตัวด้วย MS/MS ในรายการ precursor ion และใช้ความกว้างของการ

แยกมวลที่ $m/z \pm 0.5$ โดยใช้พลังงานการชน (collision energy) 20 Volt และ 40 Volt ทำการเก็บข้อมูล ในช่วง mass range 50-1500 Da ในการฉีดตัวอย่างแต่ละครั้ง

3.4 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ประเภทไขมัน (lipids) ในซีรัมด้วยวิธีการลิพิดอมิกส์แบบไม่มีเป้าหมาย (untargeted lipidomics) โดยเทคนิค LC-MS

3.4.1. การสกัดไขมันจากซีรัม

ทำการสกัดไขมันโดยดัดแปลงการสกัดจากวิธีที่มีการรายงานไว้แล้ว (Saghatelian, Trauger et al. 2004) ดังนี้ นำซีรัม 100 μ L มาเจือจางด้วยสารละลาย 1% NaCl 900 μ L จากนั้นนำไปสกัดด้วยสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม (2 mL) และเมทานอล (1 mL) เขย่าและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 $\times$ g อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที ทำการแยกชั้นสารละลายอินทรีย์ (ชั้นล่าง) และนำไประเหยตัวทำละลายภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ C

ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง liquid chromatography (LC)-mass spectrometer (MS) นำสารมาละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 160 μ L เพื่อฉีดสารละลายที่ได้ปริมาตร 50 μ L เข้าไปใน LC-MS ต่อไป

3.4.2. การวิเคราะห์ไขมันด้วยวิธี LC-MS

ทำการวิเคราะห์ไขมันด้วยวิธี LC-MS ตามวิธีที่มีการรายงานไว้แล้ว (Vinayavekhin, Mahipant et al. 2015) ดังนี้ การวิเคราะห์แบ่งเป็น 2 โหมด ได้แก่ ขั้วบวก (positive mode) และขั้วลบ (negative mode) การวิเคราะห์ในขั้วบวกใช้คอลัมน์ Luna C5 (5 μ m, 4.6 $\times$ 50 mm) และ guard column จาก Phenomenex โดย mobile phase A ประกอบด้วยน้ำ 95% (v/v)/ เมทานอล 5% (v/v) ส่วน mobile phase B ประกอบด้วย isopropanol 60% (v/v)/ เมทานอล 35% (v/v)/ น้ำ 5% (v/v) โดย mobile phase ทั้งสองชนิดมี 0.1% (v/v) formic acid และ 5 mM ammonium formate เป็นองค์ประกอบ การวิเคราะห์ในขั้วลบใช้คอลัมน์ Gemini C18 (5 μ m, 4.6 $\times$ 50 mm) และ guard column จาก Phenomenex โดยใช้ mobile phase A และ mobile phase B เหมือนในขั้วบวก แต่ใช้ 0.1% (v/v) sodium hydroxide เป็นองค์ประกอบเสริมแทน 0.1% (v/v) formic acid และ 5 mM ammonium formate

การวิเคราะห์สารด้วย LC ใช้เวลาทั้งสิ้น 60 นาทีต่อตัวอย่าง โดย mobile phase เริ่มต้นจาก 0% B นาน 5 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.1 mL/min จากนั้นเปลี่ยนสัดส่วน mobile phase เป็น 20% B และค่อยๆ เพิ่มสัดส่วนขึ้นไปจนถึง 100% B ในเวลา 45 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.4 mL/min วิเคราะห์ต่อที่สัดส่วนคงที่ที่ 100% B นาน 8 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/min ก่อนปรับสัดส่วน %B เป็น 0 และปล่อยไหลนาน 7 นาที ด้วยอัตราการไหล 0.5 mL/min

การวิเคราะห์ด้วย MS ใช้พารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ end plate offset ที่ -500 V, capillary voltage ที่ 4000 V, nebulizer pressure ที่ 3.0 bar, dry gas ที่ 8.0 L/min, dry temp ที่ 200 °C, collision RF ที่ 150.0 Vpp เก็บข้อมูลในช่วง mass range 100-1500 Da และใช้ 10 mM sodium formate เป็น calibrant

3.4.3. การวิเคราะห์ข้อมูลจาก LC-MS ด้วยวิธีการลิปโดมิกส์แบบไม่มีเป้าหมาย (untargeted lipidomics)

นำข้อมูลโครมาโทแกรมที่ได้รับจากเครื่อง LC-MS มาวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม XCMS โปรแกรม XCMS จะทำการค้นหาพีค (peak) ของไอออนต่างๆ ในตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง นำมาจับคู่กัน และทำการวิเคราะห์ปริมาณของไอออนต่างๆ ที่ค้นพบ ข้อมูลที่ได้ออกมาจากโปรแกรม XCMS (XCMS output file) ประกอบด้วยค่ามวลต่อประจุ (m/z) ค่า retention time และค่า integrated mass ion intensity ของแต่ละไอออนในตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบไอออนต่างๆ ในกลุ่ม ovx เทียบกับกลุ่ม sham โดยมีการคัดกรองไอออนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน ด้วยเงื่อนไขดังนี้ (ก) ไอออนมีอัตราส่วนการเปลี่ยนแปลง mass ion intensity ในตัวอย่าง 2 กลุ่ม (fold change) ตั้งแต่ 2.0 เท่าขึ้นไป (ข) นัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธีการ Student's t-test ได้ $p < 0.05$ (ค) mass ion intensity (MSII) ของกลุ่มที่มีปริมาณมากกว่า มีค่าอย่างน้อย 5000 counts ซึ่งประมาณค่าต่ำสุดที่วัดได้จากเครื่องมือที่ใช้ จากนั้น นำไอออนเหล่านี้มาตรวจสอบอีกครั้งในโครมาโทแกรมที่ได้รับจากเครื่อง LC-MS เพื่อกำจัดไอโซโทป (isotope) หรือค่าผลบวกหลง (false positive) ออกไป

3.4.4. การวิเคราะห์สารด้วย LC-MS/MS

นำไอออนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยใช้วิธีวิเคราะห์ด้วย LC เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ไขมันด้วย LC-MS ที่กล่าวไว้ในข้างต้น ส่วนขั้นตอนของ MS/MS ใช้การวิเคราะห์ในแบบ auto MS/MS โดยเจาะจงไอออนที่ต้องการทำ MS/MS ในรายการ precursor ion ใช้ความกว้างของการแยกที่ $m/z \pm 0.5$ กำหนดจำนวน precursor ion ในแต่ละรอบไว้ที่ 3 ไอออน และสำหรับไอออนที่มี MS/MS 3 สเปกตรัมแล้ว จะไม่มีการทำ MS/MS ไปอีก 0.30 นาที่ (active exclusion) พลังงานการชน (collision energy) ที่ใช้มีการตั้งค่าสำหรับ m/z ที่ต่างกัน ดังนี้ 30 V สำหรับ m/z 500.00, 45 V สำหรับ m/z 1000.00 และ 60 V สำหรับ m/z 2000.00 โดยถ้าไอออนมีค่า m/z อยู่ระหว่างค่านี้ ใช้ค่าที่ได้จาก linear interpolation ของค่า m/z และพลังงานการชนที่ใกล้ที่สุด เก็บข้อมูลในช่วง mass range 50-1500 Da ในการฉีดตัวอย่างแต่ละครั้ง ใช้สารละลายของสารสกัดไขมัน 50 μL หรือใช้สารละลายมาตรฐาน 500-625 pmol

3.4.5. การวิเคราะห์ผลการรักษาด้วยสาร E₂, DPHD และสารสกัดหรือผงว่านชักมดลูก

นำไอออนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ได้ข้างต้นมาเปรียบเทียบเชิงปริมาณในกลุ่มหนู ovx ที่ไม่ได้รับสาร กับกลุ่มที่ได้รับสาร E₂, DPHD หรือสารสกัดหรือผงว่านชักมดลูก โดยใช้ค่าอัตราส่วนการเปลี่ยนแปลง mass ion intensity (fold change) และ Student's t-test ($p < 0.05$) ในการระบุความมีนัยสำคัญทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงที่สนใจนั้นๆ

3.5 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์แบบมีเป้าหมาย (targeted metabolomics) ในซีรัมโดยเทคนิค GC-MS

3.5.1. การเตรียมตัวอย่างซีรัม

การวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมโดยใช้เทคนิค GC-MS เพื่อหาสาร metabolite ที่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลง แต่ไม่สามารถวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS ได้ โดยการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

1) ทำการตกตะกอนโปรตีนตัวอย่างซีรัม 50 ไมโครลิตรด้วยเมทานอลแช่เย็น ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่น (Centrifuge) ที่ความเร็ว $15,000 \times g$ รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 400 ไมโครลิตรใส่หลอดทดสอบชนิดกันแหลมและระเหยตัวอย่างให้แห้งสนิทด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส

2) ละลายตะกอน (residue) ด้วยสาร N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำอนุพันธ์สาร (Derivatisation) และถ่ายตัวอย่างใส่ micro-volume insert ใน 2.0 mL vial ฉีดตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตรวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

3.5.2. การวิเคราะห์สารด้วย GC-MS

ระบบ Gas Chromatograph (Model 7890A, Agilent) ใช้คอลัมน์ Capillary ชนิด DB-5MS ขนาดความยาว 15 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร โดยใช้แก๊สฮีเลียม (He) เป็น Carrier gas ด้วยอัตราไหลของแก๊ส 1 mL/min อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตู้อบคอลัมน์ (Oven) เป็น 80 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพิ่มขึ้นจนถึง 200 องศาเซลเซียส ในอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที นาน 3 นาที และเพิ่มขึ้นอีก 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 330 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6.5 นาที รวมเป็นเวลาวิเคราะห์นาน 25 นาที

ระบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer) เป็นชนิด Single Quadrupole Mass Spectrometer (5975C MSD, Agilent) โดยใช้ Electron Ionization (EI) mode ทำการสแกน (Scan

mode) มวลสารตั้งแต่ 40 ถึง 600 ดาลตัน โดยทำการปรับจูนเครื่องด้วยสาร Perfluorotributylamine (PFTBA) โดยใช้โหมด Autotune (Atune.m) ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.5.3. การวิเคราะห์ GC-MS data

ทำการวิเคราะห์ GC-MS data โดยใช้โปรแกรม MSD Chemstation Data Analysis (Agilent Technologies) โดยการเปรียบเทียบ spectrum สาร unknown กับ NIST library (2011) และใช้สารมาตรฐานเปรียบเทียบเวลาริเทนชัน (Retention time) ทำการ integrate เพื่อหาพื้นที่ใต้พีคโดยใช้ โดยใช้ characteristic ion ของสารนั้นๆ จากนั้นนำข้อมูลส่งออกในรูปแบบไฟล์ .csv (comma separate value) แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel ต่อไป

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของเมทาบอลิท์แบบพหุตัวแปร (multivariate data analysis)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลแบบพหุตัวแปรด้วยโปรแกรม SIMCA 14 (Umetrics, Umeå, Sweden) ทั้งนี้ ได้นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS และโปรแกรม XCMS ทั้งในข้อบวกและข้อลบ ที่มีการทำให้อยู่ตรงกลางและปรับตาม Pareto variance แล้ว มาทำการหา score plot ด้วยวิธี PCA และ OPLS-DA เพื่อจำแนกกลุ่มของตัวอย่างต่อไป

3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติและการแปลผล

ผลการวิจัยแสดงด้วยค่า mean $\pm$ SEM โดยข้อมูลแต่ละกลุ่มจะทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วย student's *t-tets* หรือ One-way ANOVA ($p < 0.05$) แล้วทำการตรวจสอบระดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มต่อไปด้วยระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

4. ผลการวิจัย

5.

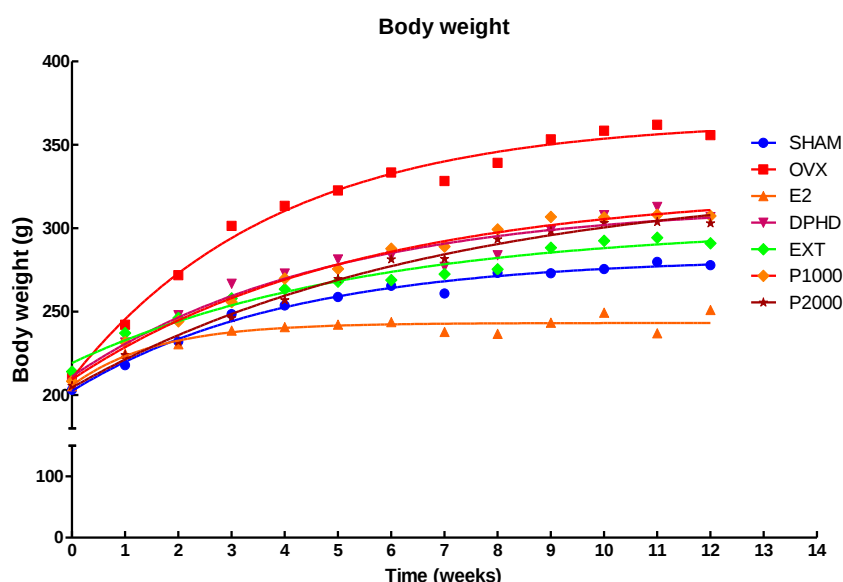
4.1 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักร่างกาย

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลิซึมในร่างกายของหนูตัวเต็มวัย และหนูตัวเต็มวัยที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนและวุ้นช็อคโกแลตเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการบันทึกสุขภาพ และน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง พบว่าน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง โดยเฉพาะหนูกลุ่มที่ตัวเต็มวัย (OVX) มีน้ำหนักตัวเพิ่มมากที่สุดเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มปกติ (Sham) การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) มีผลด้านการเพิ่มน้ำหนักตัวจากการตัดรังไข่ หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนนี้มีน้ำหนักตัวต่ำกว่าหนูกลุ่มปกติ การได้รับวุ้นช็อคโกแลต (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) มีผลด้านการเพิ่มน้ำหนักตัวจากการตัดรังไข่ได้เช่นกัน โดยหนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวสูงกว่าหนูกลุ่มปกติเล็กน้อย

ด้วยวุ้นช็อคโกแลตมีสาร phytoestrogens ที่ออกฤทธิ์ได้แบบฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ดังกล่าวจากน้ำหนักของมดลูก พบว่าน้ำหนักมดลูกของหนูที่ตัวเต็มวัย (OVX) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ลดลงอย่างมาก การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) มีผลเพิ่มขนาดของมดลูกในหนูตัวเต็มวัยอย่างมาก น้ำหนักมดลูกของหนูเพิ่มเป็น 2 เท่าของน้ำหนักมดลูกหนูปกติ (SHAM) สารจากวุ้นช็อคโกแลต (DPHD) มีผลเพิ่มน้ำหนักของมดลูก น้ำหนักสูงกว่ามดลูกหนูปกติ สารสกัดและผงวุ้นช็อคโกแลต (EXT, P1000 และ P2000) มีผลเพิ่มน้ำหนักมดลูกได้เท่าหนูปกติ

ตารางที่ 1. แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูแรทเมื่อเริ่มการทดลองและที่ 12 สัปดาห์ของการทดลอง

Treatments	Body weights (g)		
	Initial	Final	Gain
SHAM (n = 7)	203.1 ± 3.6	277.9 ± 12.4	74.8 ± 9.8
OVX (n = 7)	210.4 ± 4.9	355.9 ± 11.5**	145.4 ± 11.0**
E2 (n = 7)	205.4 ± 3.8	251.0 ± 5.2	45.7 ± 3.7
DPHD (n = 7)	207.3 ± 3.8	306.8 ± 5.3	99.5 ± 1.9
EXT (n = 6)	214.1 ± 4.4	291.0 ± 7.3	76.9 ± 8.2
P1000 (n = 8)	208.3 ± 1.6	307.4 ± 5.1	99.1 ± 6.3
P2000 (n = 7)	205.6 ± 3.7	303.1 ± 8.6	97.5 ± 8.6



รูปที่ 1. กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูทดลอง 12 สัปดาห์ของการทดลองแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูที่ตัดรังไข่ (OVX) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารเอสโตรเจน (E2) และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารจากवानชัมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) เทียบกับหนูปกติ (SHAM)

SHAM = กลุ่มควบคุมปกติ (Sham operated control)

OVX = กลุ่มควบคุมที่ตัดรังไข่ (Ovariectomized control)

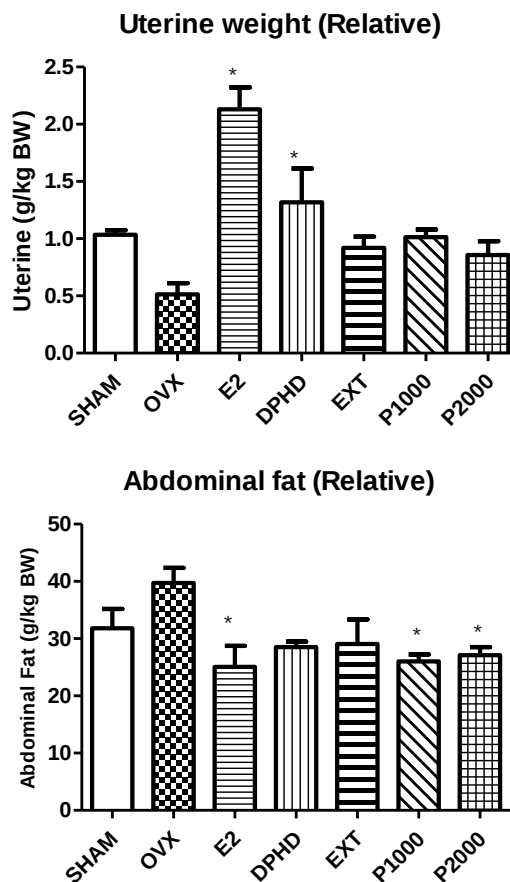
E2 = กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับสาร 17 β -estradiol ขนาด 10 μ g/kgBW, s.c.

DPHD = กลุ่มตัดรังไข่และได้รับสาร ASPP 049 ขนาด 50 mg/kgBW, s.c.

EXT = กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับสารสกัดวานชัมดลูก ขนาด 500 mg/kgBW, p.o.

P1000 = กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับผงวานชัมดลูกขนาด 1000 mg/kgBW, p.o.

P2000 = กลุ่มที่ตัดรังไข่และได้รับผงวานชัมดลูกขนาด 2000 mg/kgBw, p.o.



รูปที่ 2. แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ (a) ขนาดมดลูก และ (b) ปริมาณไขมันในช่องท้อง ของหนูที่ตัดรังไข่ (OVX) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) หรือได้รับสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 หรือ P2000) เทียบกับกลุ่มหนูปกติ (SHAM) ค่าที่แสดงเป็น means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนูที่ตัดรังไข่

4.2 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีในเลือด

ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีในซีรัม พบว่าหนูกลุ่มตัดรังไข่ (OVX) มีระดับไขมัน Cholesterol เพิ่มขึ้นใน มีค่าเป็น 118 ± 2.3 mg% เมื่อเทียบกับหนูปกติซึ่งมีค่าเท่ากับ 83 ± 7.8 mg% และเมื่อได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) ระดับ Cholesterol ลดลงเล็กน้อย เป็น 100 ± 2.0 mg% หนูกลุ่มที่ได้รับสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) มีค่า Cholesterol ลดลง เมื่อเทียบกับหนูตัดรังไข่ ลดลงเป็น 69 ± 4.6 , 33 ± 3.3 , 85 ± 9.2 และ 51 ± 7.5 mg% ตามลำดับ

ระดับไขมัน Triglyceride ในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ cholesterol กล่าวคือจะเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มตัดรังไข่ (OVX) เมื่อเทียบกับหนูปกติ และมีระดับลดลงเล็กน้อยเมื่อได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) และได้รับสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, P1000 และ P2000)

การศึกษาผลของการให้สารจากว่านชักมดลูก และฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นระยะเวลานาน 3 เดือนต่อระดับเอนไซม์จากตับได้แก่ Alkaline phosphatase (ALP), Aspartate aminotransferase (AST) และเอนไซม์ Alanine aminotransferase (ALT) และการทำงานของไต Creatinine, Blood urea nitrogen (BUN) และ Uric acid ทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติ แสดงว่าการให้สารในขนาดดังกล่าวเป็นเวลานาน 3 เดือน มีความปลอดภัย ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของตับและไต

4.3 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา

ตารางที่ 3 ได้ทำการศึกษาผลของการให้สารจากว่านชักมดลูกและฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยาของเม็ดเลือดชนิดต่างๆ คือเม็ดเลือดขาว (White blood cells; WBCs) เม็ดเลือดแดง (Red blood cells; RBCs) ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin; HGB) และค่าอื่นๆ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อค่าทางโลหิตวิทยาของหนูในกลุ่มที่ให้สารจากว่านชักมดลูก ได้แก่ สารสกัดเอทานอล (EXT) สาร ASPP 049 (DPHD) ผงว่านชักมดลูกที่ 1000 mg/kg BW (P1000) และผงว่านชักมดลูกที่ 2000 mg/kg BW (P2000) เมื่อเทียบกับหนูปกติ ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) มีค่า RBC และ WBC เป็น 6.67 ± 0.12 และ 1.03 ± 0.07 ลดลงเมื่อเทียบกับหนูปกติซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.82 ± 0.19 และ 1.74 ± 0.35 ตามลำดับ

ตารางที่ 2. แสดงค่าทางชีวเคมีของสารต่างๆในซีรัมหนูกลุ่มทดลองที่ตัดรังไข่ (OVX) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารเอสโตรเจน (E2) และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) เทียบกับหนูปกติ (SHAM)

Parameters	Treatments						
	SHAM	OVX	E2	DPHD	EXT	P1000	P2000
ALP (U/L)	52 ± 1.8	57 ± 3.4	44 ± 2.2	68 ± 2.1	73 ± 1.5	62 ± 1.7	71 ± 1.8
AST (U/L)	143 ± 8.8	129 ± 3.8	122 ± 1.5	123 ± 9.4	135 ± 15.2	113 ± 7.7	137 ± 14.9
ALT (U/L)	41 ± 3.5	43 ± 2.0	49 ± 1.7	38 ± 1.8	54 ± 9.0	50 ± 6.2	54 ± 6.5
BUN (mg/dL)	20 ± 1.6	19 ± 0.4	20 ± 1.2	20 ± 1.5	18 ± 1.4	17 ± 0.5	15 ± 0.7
Creatinine (mg/dL)	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02
Uric acid (mg/dL)	0.9 ± 0.13	1.5 ± 0.21	1.0 ± 0.25	1.2 ± 0.22	0.8 ± 0.08	0.7 ± 0.04	0.7 ± 0.04
Triglyceride (mg/dL)	37 ± 3.6	50 ± 3.4	45 ± 4.0	43 ± 4.4	58 ± 2.1	32 ± 1.0	44 ± 6.3
Cholesterol (mg/dL)	83 ± 7.8	118 ± 2.3	100 ± 2.0	69 ± 4.6	33 ± 3.3	85 ± 9.2	51 ± 7.5
Urea/Creatinine	54.0 ± 3.2	51.6 ± 3.3	57.1 ± 2.7	56.0 ± 4.1	56.0 ± 3.8	54.0 ± 4.5	48.9 ± 3.5

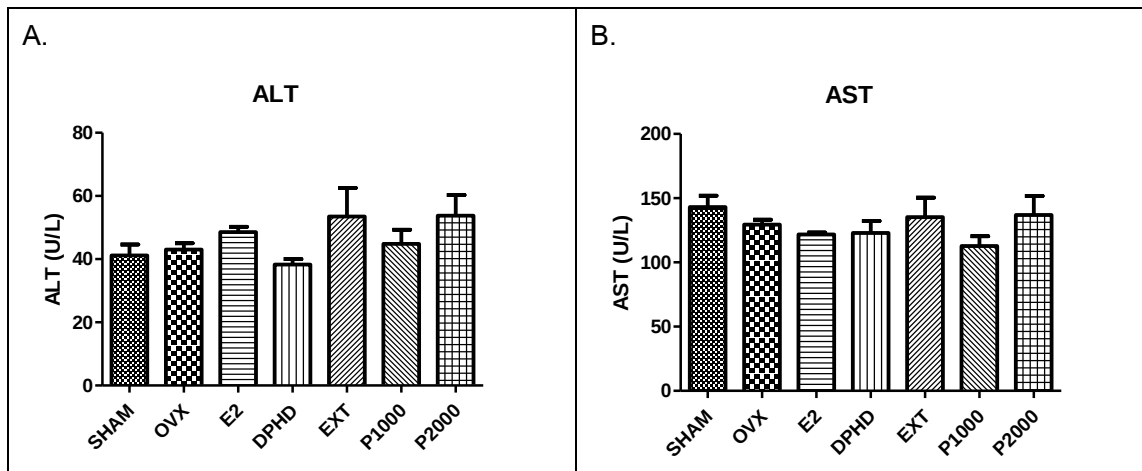
ค่าที่แสดงเป็นค่า means ± SEM. จากหนู 6-8 ตัว,
 SHAM = กลุ่มควบคุมปกติ (Sham operated control)
 OVX = กลุ่มควบคุมที่ตัดรังไข่ (Ovariectomized control), E2 = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้สาร 17β-estradiol ขนาด 10 µg/kgBW, s.c., DPHD = ตัดรังไข่แล้วให้สาร ASPP 049 ขนาด 50 mg/kgBW, s.c., EXT = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้สารสกัดเอธานอลว่านชักมดลูก ขนาด 500 mg/kgBW, p.o.; P1000 = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้ผงว่านชักมดลูก ขนาด 1000 mg/kgBW, p.o.; P2000 = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้ผงว่านชักมดลูก ขนาด 2000 mg/kgBw, p.o.

ตารางที่ 3 แสดงค่าเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มทดลอง

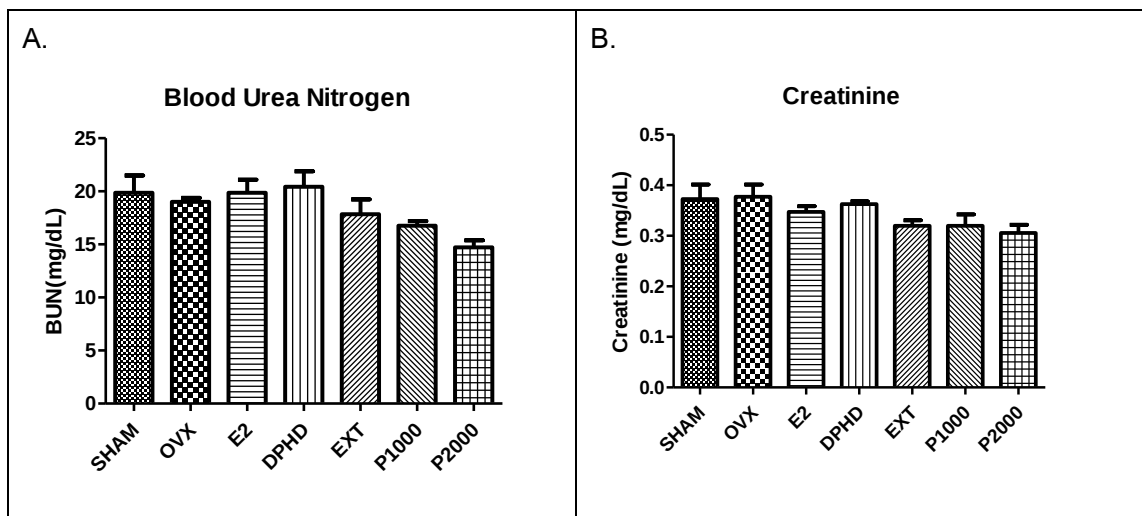
	Treatments (mean±SEM.)						
Parameters	SHAM	OVX	E2	DPHD	EXT	P1000	P2000
WBC (10 ³ /cumm)	1.74 ± 0.35	1.90 ± 0.24	1.03 ± 0.07	2.23 ± 0.37	1.70 ± 0.18	1.55 ± 0.12	1.78 ± 0.17
RBC (10 ⁶ /cumm)	7.82 ± 0.19	7.80 ± 0.09	6.67 ± 0.12	7.55 ± 0.17	7.40 ± 0.18	7.49 ± 0.17	8.07 ± 0.09
HGB (g/dL)	14.06 ± 0.26	14.16 ± 0.15	12.45 ± 0.20	13.70 ± 0.24	13.54 ± 0.22	13.75 ± 0.22	14.50 ± 0.11
HCT (%)	43.23 ± 0.98	41.87 ± 1.08	36.65 ± 0.88	40.67 ± 1.33	40.49 ± 1.44	41.58 ± 0.87	44.50 ± 0.71
MCV (fL)	55.84 ± 0.88	53.71 ± 1.25	54.96 ± 0.64	53.85 ± 0.75	54.65 ± 0.67	55.56 ± 0.68	55.17 ± 0.74
MCH (pg)	18.03 ± 0.20	18.23 ± 0.15	18.69 ± 0.10	18.18 ± 0.25	18.30 ± 0.20	18.39 ± 0.42	17.99 ± 0.19
MCHC (g/dL)	32.60 ± 0.81	34.06 ± 0.82	34.01 ± 0.46	33.77 ± 0.82	33.57 ± 0.66	33.11 ± 0.47	32.63 ± 0.57
RDW (%)	13.36 ± 0.76	13.30 ± 0.57	12.30 ± 0.66	12.40 ± 0.96	12.18 ± 0.96	11.71 ± 0.75	13.31 ± 0.68
PLT (10³/cumm)	687 ± 44	670 ± 35	664 ± 19	721 ± 27	670 ± 17	718 ± 18	667 ± 82
MPV (fL)	7.69 ± 0.09	8.30 ± 0.62	7.01 ± 0.65	7.68 ± 0.13	7.60 ± 0.15	9.41 ± 0.76	8.27 ± 0.62
Plt Smear	Increase	Increase	Increase	Increase	Increase	Increase	Increase
Neutrophils (%)	18 ± 3	16 ± 4	21 ± 5	23 ± 4	19 ± 1	18 ± 1	17 ± 2
Lymphocyte(%)	80 ± 3	77 ± 3	73 ± 3	71 ± 5	77 ± 1	79 ± 1	81 ± 2
Monocyte (%)	1 ± 0	4 ± 2	4 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	1 ± 0	2 ± 1
Eosinophils (%)	1 ± 0	2 ± 1	1 ± 0	2 ± 1	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0
Basophil (%)	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	0 ± 0

ค่าที่แสดงเป็น means ± SEM. จากหนู 6-8 ตัว

ค่าที่แสดงเป็น means ± SEM. จากหนู 6-8 ตัว, SHAM = กลุ่มควบคุมปกติ (Sham operated control) OVX = กลุ่มควบคุมที่ตัดรังไข่ (Ovariectomized control), E2 = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้สาร 17β-estradiol ขนาด 10 µg/kgBW, s.c., DPHD = ตัดรังไข่แล้วให้สาร ASPP 049 ขนาด 50 mg/kgBW, s.c., EXT = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้สารสกัดเอธานอลว่านชักมดลูก ขนาด 500 mg/kgBW, p.o.; P1000 = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้ผงว่านชักมดลูก ขนาด 1000 mg/kgBW, p.o.; P2000 = กลุ่มที่ตัดรังไข่แล้วให้ผงว่านชักมดลูก ขนาด 2000 mg/kgBw, p.o.



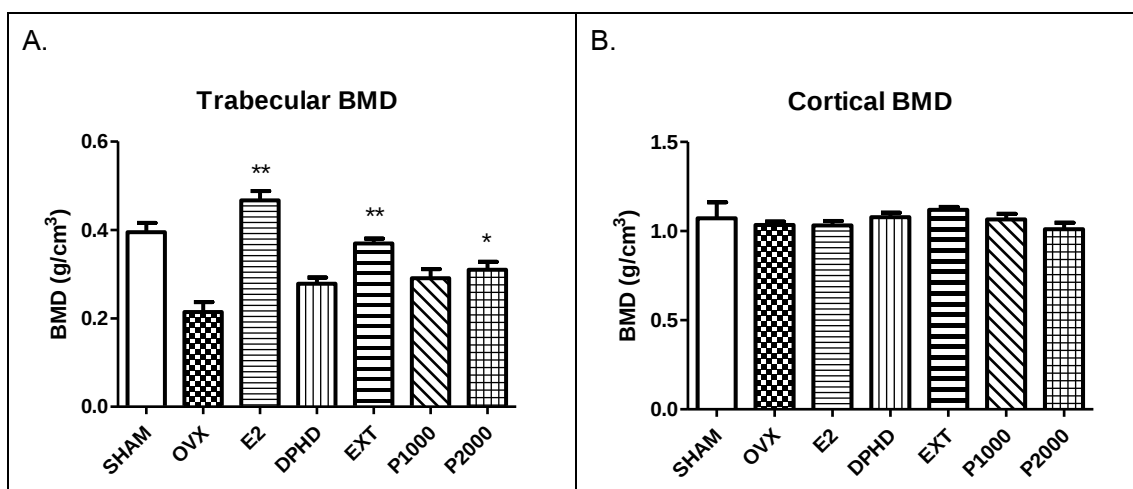
รูปที่ 3. แสดงถึงระดับของ Alanine Aminotransferase (ALT) และ Aspartate Aminotransferase (AST) ในซีรัมหนูกลุ่มทดลองที่ตัดรังไข่ (OVX) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารเอสโตรเจน (E2) และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) เทียบกับหนูปกติ (SHAM) ค่าที่แสดงเป็น means $\pm$ SEM.



รูปที่ 4. แสดงถึงระดับของ Blood Urea Nitrogen (BUN) และ Creatinine ในซีรัมหนูกลุ่มทดลองที่ตัดรังไข่ (OVX) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารเอสโตรเจน (E2) และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) เทียบกับหนูปกติ (SHAM) ค่าที่แสดงเป็น means $\pm$ SEM.

4.4 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของมวลกระดูก

ในตารางที่ 1 ได้ทำการศึกษาผลของการตัดรังไข่เป็นเวลา 3 เดือนและ ให้สารจากवानชักมดลูกหรือให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความหนาแน่นของกระดูก โดยวิเคราะห์ทั้งกระดูกเนื้อโปร่ง (Trabecular BMD) และกระดูกเนื้อแน่น (Cortical BMD) ด้วยเครื่อง micro-computed tomography (micro-CT) พบว่าในหนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างมีค่าความหนาแน่นของมวลกระดูกโปร่ง (Trabecular bone) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับมวลกระดูกในหนูกลุ่มควบคุม โดยเปลี่ยนแปลงจาก $0.39 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ ในหนูกลุ่มควบคุม เป็น $0.21 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ หนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออก ส่วน Cortical bone ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูก เมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) หลังการตัดรังไข่ 1 สัปดาห์ไปตลอดการทดลอง 3 เดือน พบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนในขนาด $10 \text{ } \mu\text{g/Kg BW/day}$ สามารถป้องกันการเกิดภาวะกระดูกโปร่งบางจากการตัดรังไข่ได้ชัดเจน ความหนาแน่นกระดูกส่วน Trabecular bone มีค่า เป็น $0.467 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ การให้สารจากวานชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) เช่นกัน มีผลป้องกันภาวะกระดูกโปร่งบางได้ชัดเจน แต่ไม่สมบูรณ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจน ความหนาแน่นกระดูกในหนูที่ได้รับสารจากวานชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) มีค่า เป็น 0.28 ± 0.01 , 0.37 ± 0.01 , 0.29 ± 0.02 และ $0.31 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูตัดรังไข่ออกมีค่า $0.21 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$



รูปที่ 5. แสดงระดับความหนาแน่น (BMD) ของกระดูกหน้าขา Tibia (Tibia bone) ในส่วนของ Trabecular และ Cortical ของหนูกลุ่มทดลองที่ตัดรังไข่ (OVX) หนูกลุ่มตัดรังไข่ที่ได้รับสารเอสโตรเจน (E2) หรือ ได้รับสารจากวานชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 หรือ P2000) เทียบกับกลุ่มหนูปกติ (SHAM) ค่าที่แสดงเป็น means $\pm$ SEM. ** $P < 0.01$ เทียบกับหนูควบคุมที่ตัดรังไข่ (OVX)

4.5 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในซีรัม

4.5.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในซีรัม

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของ metabolite profile ที่ได้รับจากกลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่ม หลังจากการทำ LC-MS data normalization และ peak features detection โดยใช้โปรแกรม XCMS และทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี multivariate data analysis ผลจากการวิเคราะห์การแยกของ disease model (ภาวะตัดรังไข่) กับกลุ่มควบคุม โดยใช้ Principle component analysis (PCA) ที่สร้างภาพจากโปรแกรม SIMCA 14 พบว่า Metabolites profile (global metabolites) ของหนูกลุ่มที่พร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (OVX) มีการเปลี่ยนแปลง มีความแตกต่างแยกตัวออกมา อย่างชัดเจนจากหนูกลุ่มปกติ (Sham) ตามที่แสดงในรูปที่ 6 (A) เป็นภาพ 2 มิติ (two dimension, 2D) ของ scatter score plot แสดงให้เห็นทั้งรูปแบบ (Pattern) และแนวโน้ม (Trend) ของกลุ่มทดลอง

ข้อมูลจากภาพนี้มีเป็นจุดสำคัญของการวิจัย แสดงให้เห็นถึง *diseases model* ที่ดำเนินการโดยตัดรังไข่เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน นานเพียงพอที่จะสามารถจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในร่างกาย อาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงในหลายระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับโมเลกุลภายในเซลล์จนส่งผลมาถึงการทำงานของเซลล์ และ *metabolite* ที่ผลิตออกมาอยู่ใน *circulation*

ในรูปที่ 6 (B) แสดงให้เห็นความแตกต่างของ Metabolites profile ของหนูกลุ่มที่ตัดรังไข่ (OVX) และได้รับสารต่างๆกัน ได้แก่หนูควบคุมที่ตัดรังไข่ (OVX) ที่ไม่ได้รับการรักษา กับกลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) หรือได้รับสารจากवानชัมดลูก (DPHD, EXT และ P2000) ในหลักการเช่นเดียวกันกับรูป 6A. เป็นภาพแสดง 2 มิติ พบว่าในกลุ่มหนู OVX จะมีความแปรปรวนของ global metabolites ภายในกลุ่ม (within group variation) ค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือ สารจากवानชัมดลูกซึ่งพบความแปรปรวนภายในกลุ่มน้อยกว่า โดยเฉพาะหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดวานชัมดลูก (EXT) และผงวานชัมดลูก (P2000) ซึ่งจะมีการกระจายของกลุ่มน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ตัดรังไข่

รูปที่ 6 (C) และ รูปที่ 7 แสดงให้เห็นผลของวานในการรักษาภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยมีแนวโน้ม (Trend) การออกฤทธิ์ของสารจากวานชัมดลูกถึงกลุ่ม metabolites ในหนู OVX ที่เปลี่ยนไป กลับเข้าใกล้ค่าของหนูควบคุมปกติ (SHAM) โดยที่ผลของการให้สารต่างๆจากวานชัมดลูก ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดวานชัมดลูก (EXT) และผงวานชัมดลูกมีแนวโน้มที่ให้ผลเหมือนกัน โดยจะมีบางส่วนของกลุ่ม metabolite ซ้อนทับกัน (Overlap)

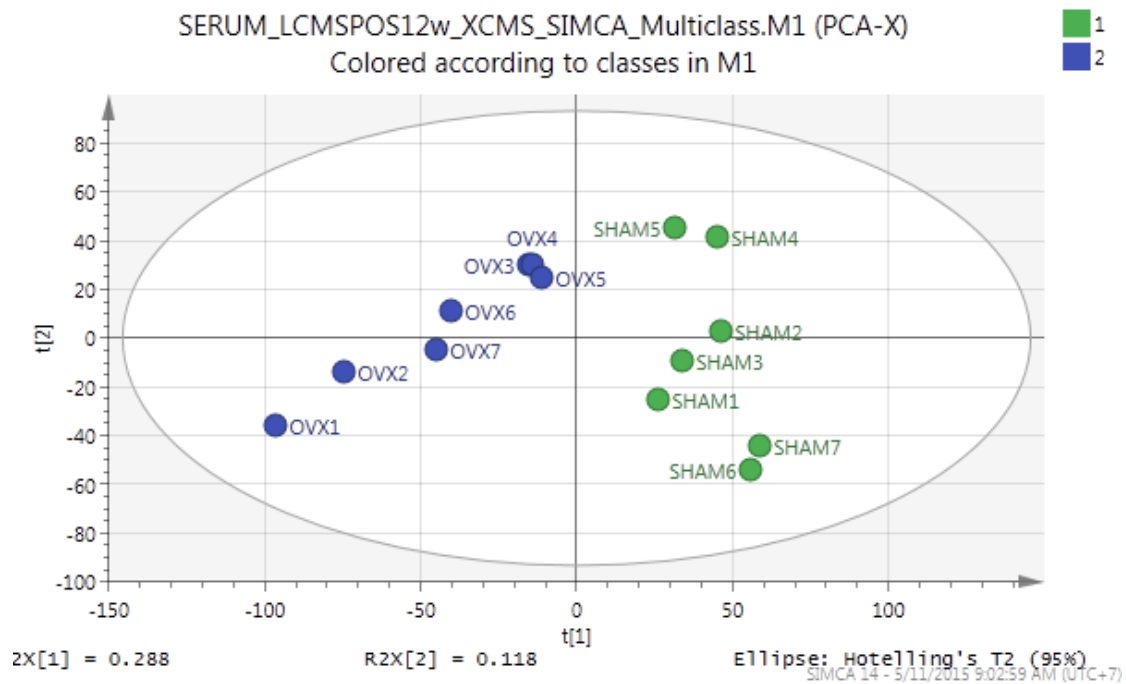


Fig. 6A. PCA-X เปรียบเทียบ global metabolites profile ระหว่างกลุ่มหนูปกติ (SHAM) และ หนูตัดรังไข่ (OVX)

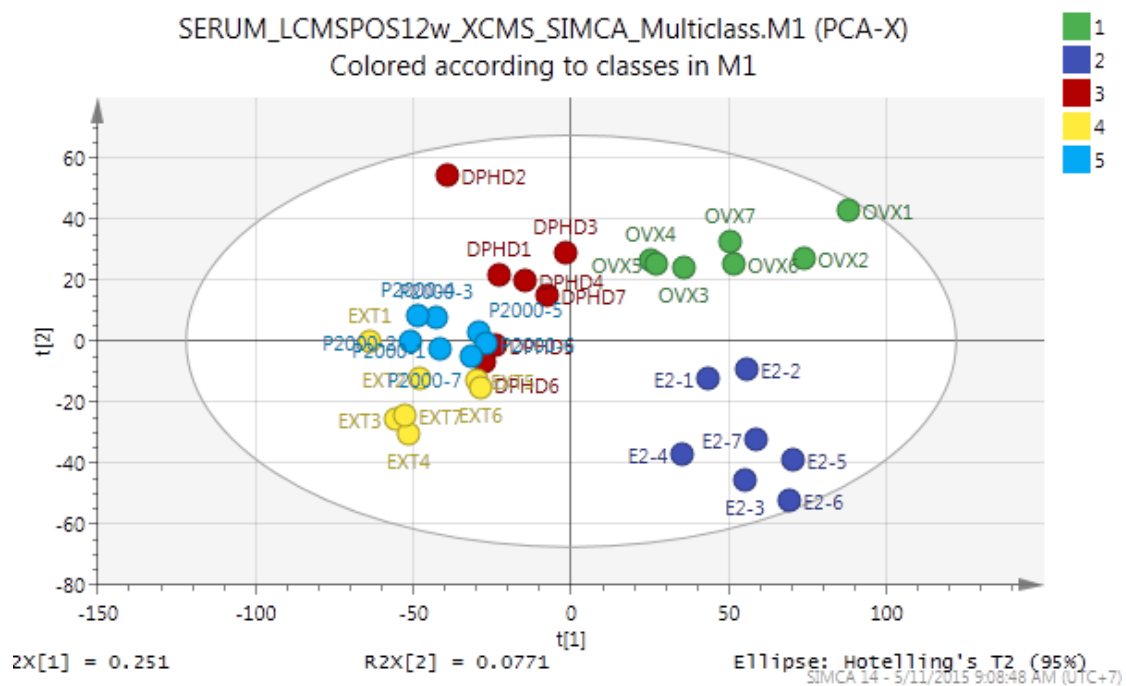


Fig. 6B. -PCA-X เปรียบเทียบ global metabolites profile ระหว่างกลุ่มหนูควบคุมตัดรังไข่ (OVX) และหนูที่ให้อาหารต่างๆ (E2, DPHD, EXT และ P2000)

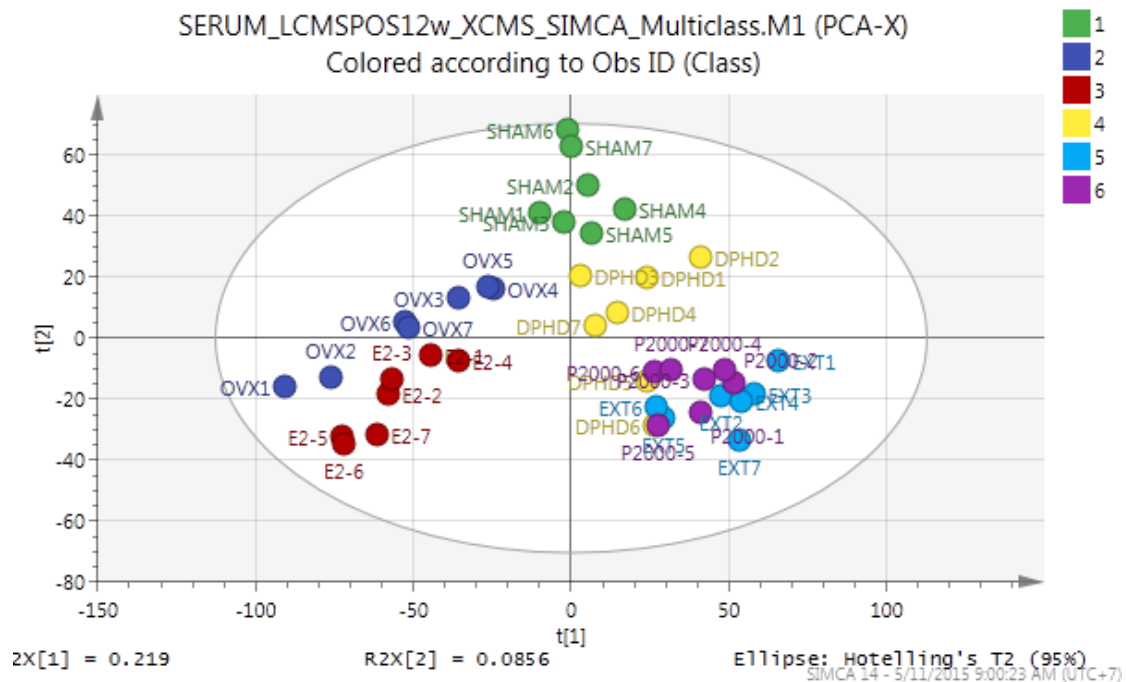


Fig.6 C .PCA-X เปรียบเทียบ global metabolites profile ระหว่างกลุ่มหนูปกติ (SHAM) หนูควบคุม ตัดรังไข่ (OVX) และหนูที่ให้สารต่างๆ (E2, DPHD, EXT และ P2000)

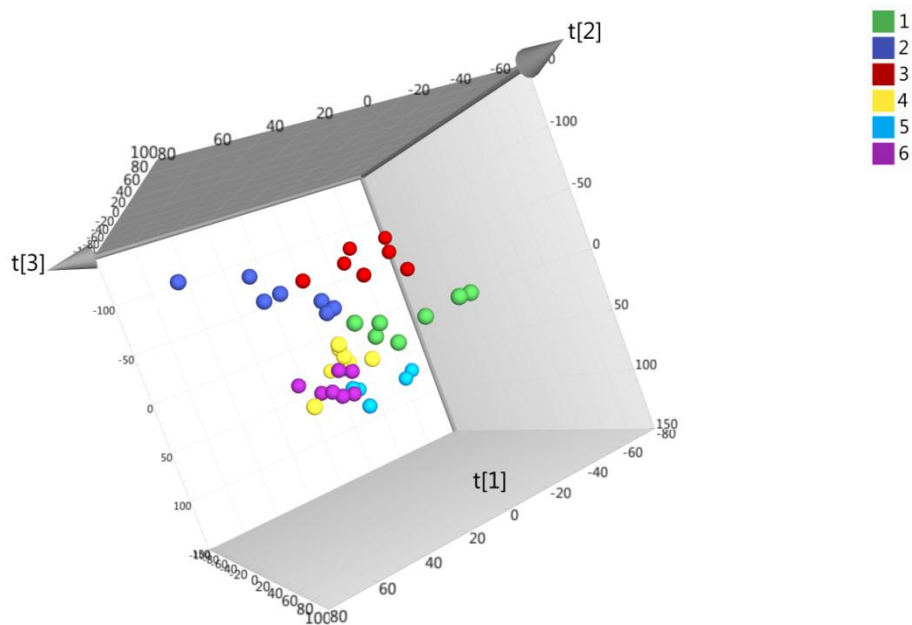
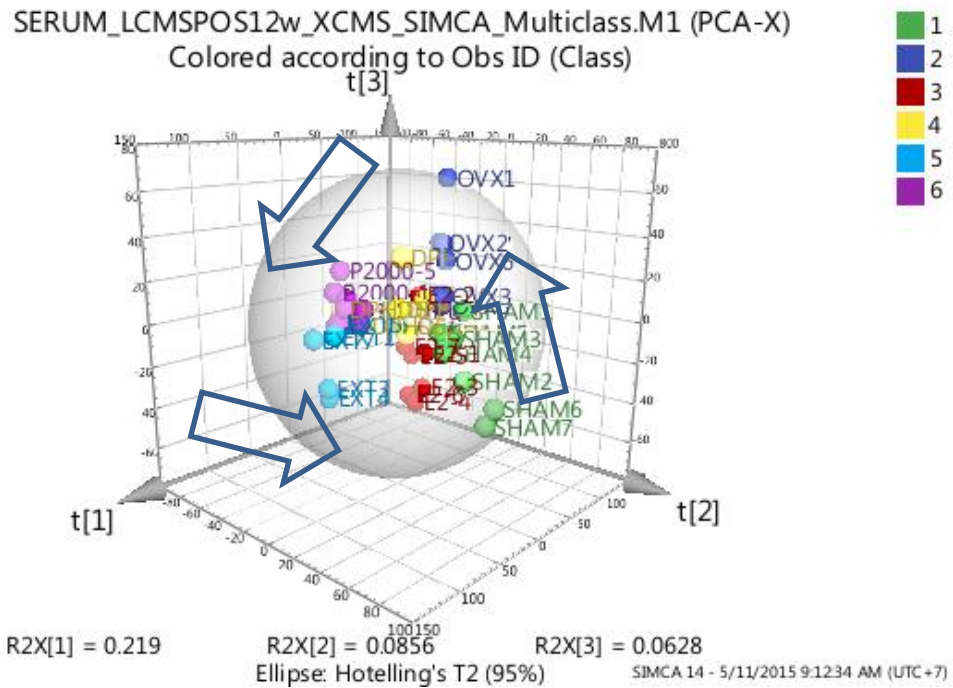
รูปที่ 6. Principle component analysis of raw data (PCA-X) score scatter plot แสดงถึง global metabolites profile ที่ได้จากหนูกลุ่มต่างๆ พบว่ามีความแตกต่าง แยกตัวของ metabolites กลุ่มต่างๆ อย่างชัดเจน

(A) PCA-X เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูปกติ (SHAM) และ หนูตัดรังไข่ (OVX)

(B) PCA-X เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูควบคุมตัดรังไข่ (OVX) และหนูที่ให้สารฮอร์โมนเอสโตรเจน และสารต่างๆ จากवानชักมดลูก (E2, DPHD, EXT และ P2000) และ

(C) PCA-X เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูปกติ (SHAM) หนูควบคุมตัดรังไข่ (OVX) และหนูที่ให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือสารต่างๆ จากवानชักมดลูก (E2, DPHD, EXT และ P2000)

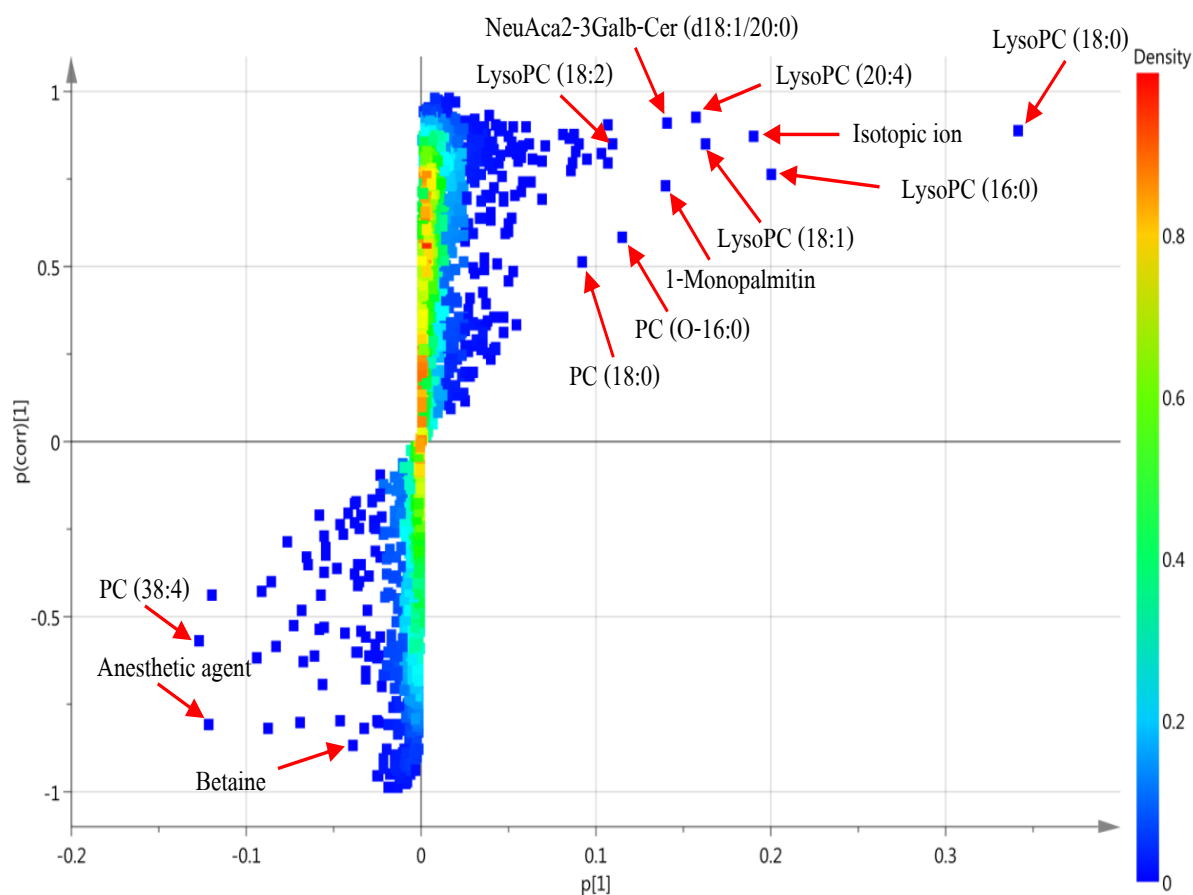
รูปที่แสดงสร้างจากโปรแกรม SIMCA 14 (Umetrics, Sweden)



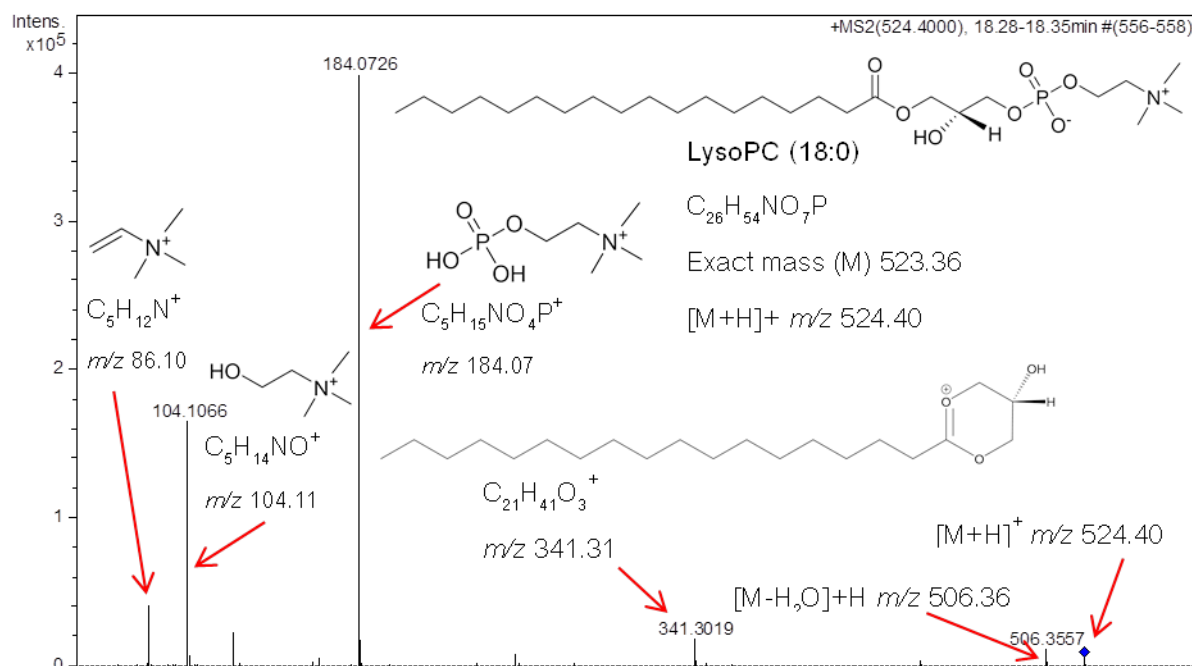
(B)

รูปที่ 7. Principle component analysis of raw data (PCA-X) scatter 3D plot แสดงถึง metabolites ที่ได้จากหนู เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูปกติ (SHAM) หนูควบคุมตัดรังไข่ (OVX) และหนูที่ให้สารฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารต่างๆ จากवानชักมดลูก (E2, DPHD, EXT และ P2000) พบว่ามีความแตกต่างแยกตัวของกลุ่มต่างๆ อย่างชัดเจน (A) PCA สามมิติ (3D) แสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในหนูตัดรังไข่ ที่มีการแยกของกลุ่มออกจากหนูปกติอย่างชัดเจน และแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงกลับเข้าสู่สภาวะปกติของหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารวานชักมดลูก (B)

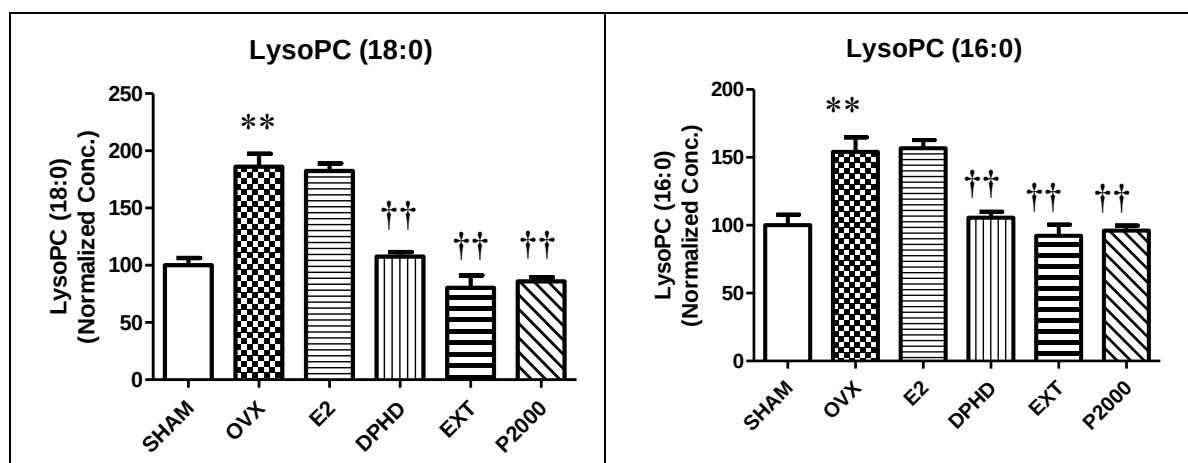
PCA สามมิติ แสดงการแยกของกลุ่มต่างๆ โดยไม่ระบุกลุ่มเพื่อให้เห็นภาพแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงชัดเจนขึ้น วงกลมที่บิสเขียว (1) แสดงกลุ่ม SHAM วงกลมที่บิสน้ำเงิน (2) แสดงกลุ่ม OVX วงกลมที่บิสแดง (3) แสดงกลุ่ม E2 วงกลมที่บิสเหลือง (4) แสดงกลุ่ม DPHD วงกลมที่บิสฟ้า (5) แสดงกลุ่ม EXT และวงกลมที่บิสม่วง (6) แสดงกลุ่ม P2000

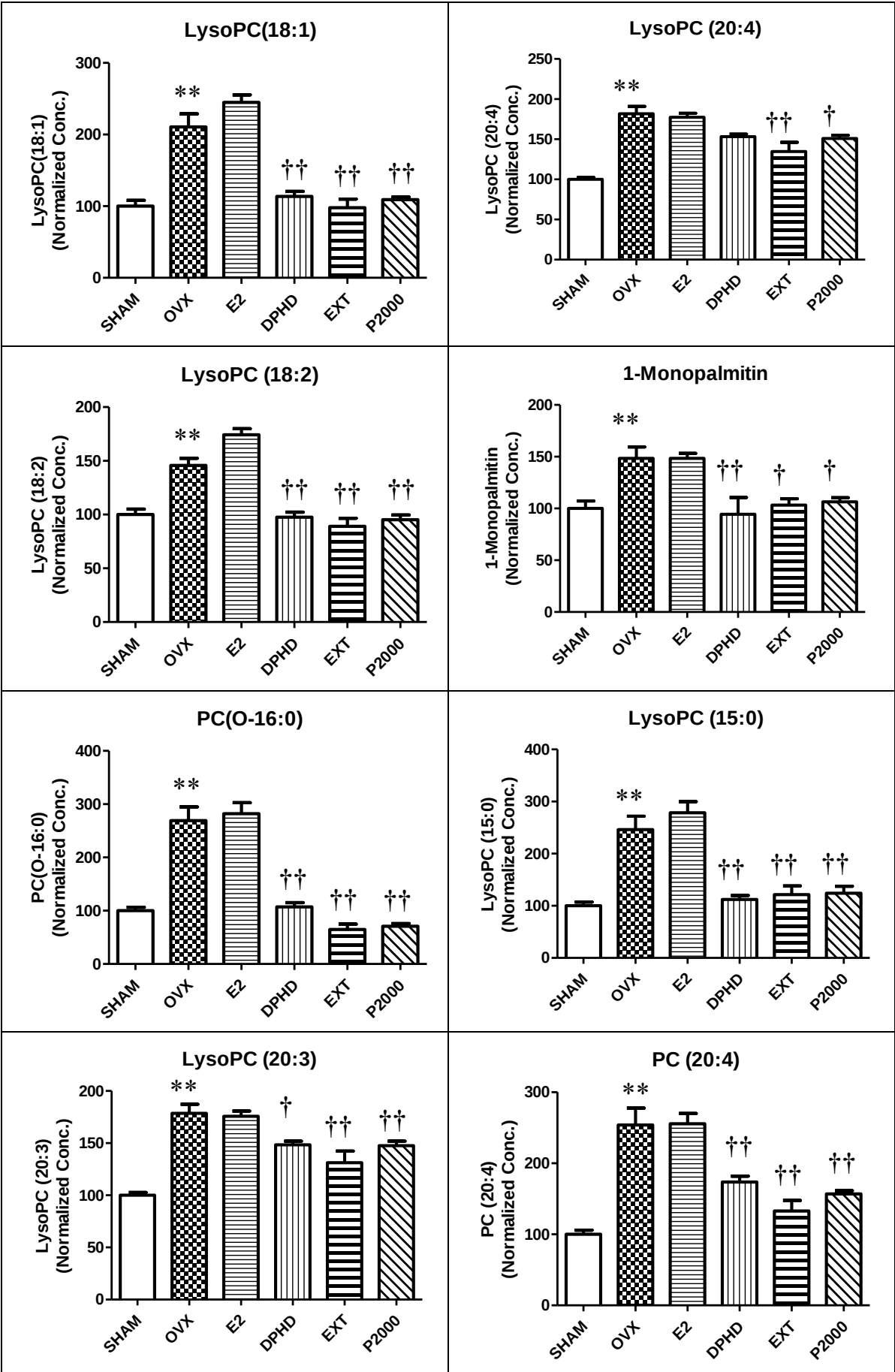


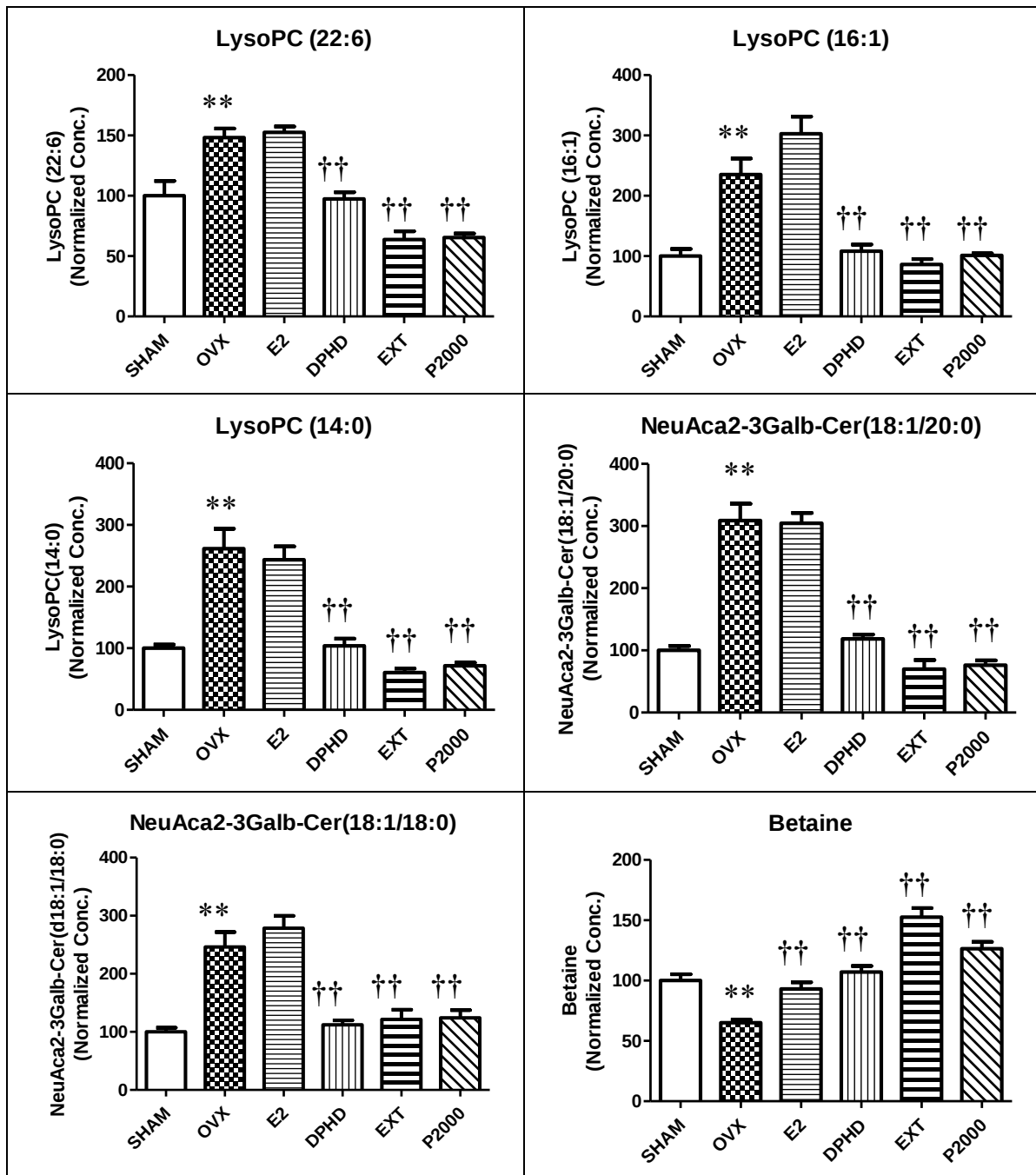
รูปที่ 8. S-plot แสดงให้เห็น Feature ID ของ ions ต่างๆ ของสารเมทาบอลิไทน์ในซีรัมของหนู โดยการวิเคราะห์ด้วย LC-MS สีที่ระบุบอกถึงระดับความหนาแน่นของสารเมทาบอลิไทน์ สีแดงหมายถึงจุดที่มีความหนาแน่นสูงสุด หรือไม่มีความแตกต่างของสารเมทาบอลิไทน์ของทั้งสองกลุ่ม สีน้ำเงินหมายถึงมีจุดที่มีความหนาแน่นของสารเมทาบอลิไทน์น้อยที่สุด (มีมากหรือน้อยในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง) แสดงถึงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม สีน้ำเงินที่กระจายอยู่ด้านขวาบนหรือซ้ายล่าง หมายถึง putative metabolite ที่มีความจำเพาะมาก



รูปที่ 9. LC-MS/MS ions spectrum แสดงการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันความถูกต้องของสารเมทาบอไลต์ประเภทไขมัน Glycerophospholids ที่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นในซีรัมของหนูตัดรังไข่ รูปที่แสดงคือสาร LysoPC (18:0) มวลโมเลกุล 523.36 Da; $[M+H]^+$ m/z 524.40 Da ทำการแตกตัวใน Collision cell โดยใช้พลังงานการชน (Collision Energy) 40 Volt (V) และใช้แก๊ส Nitrogen เป็น collision gas







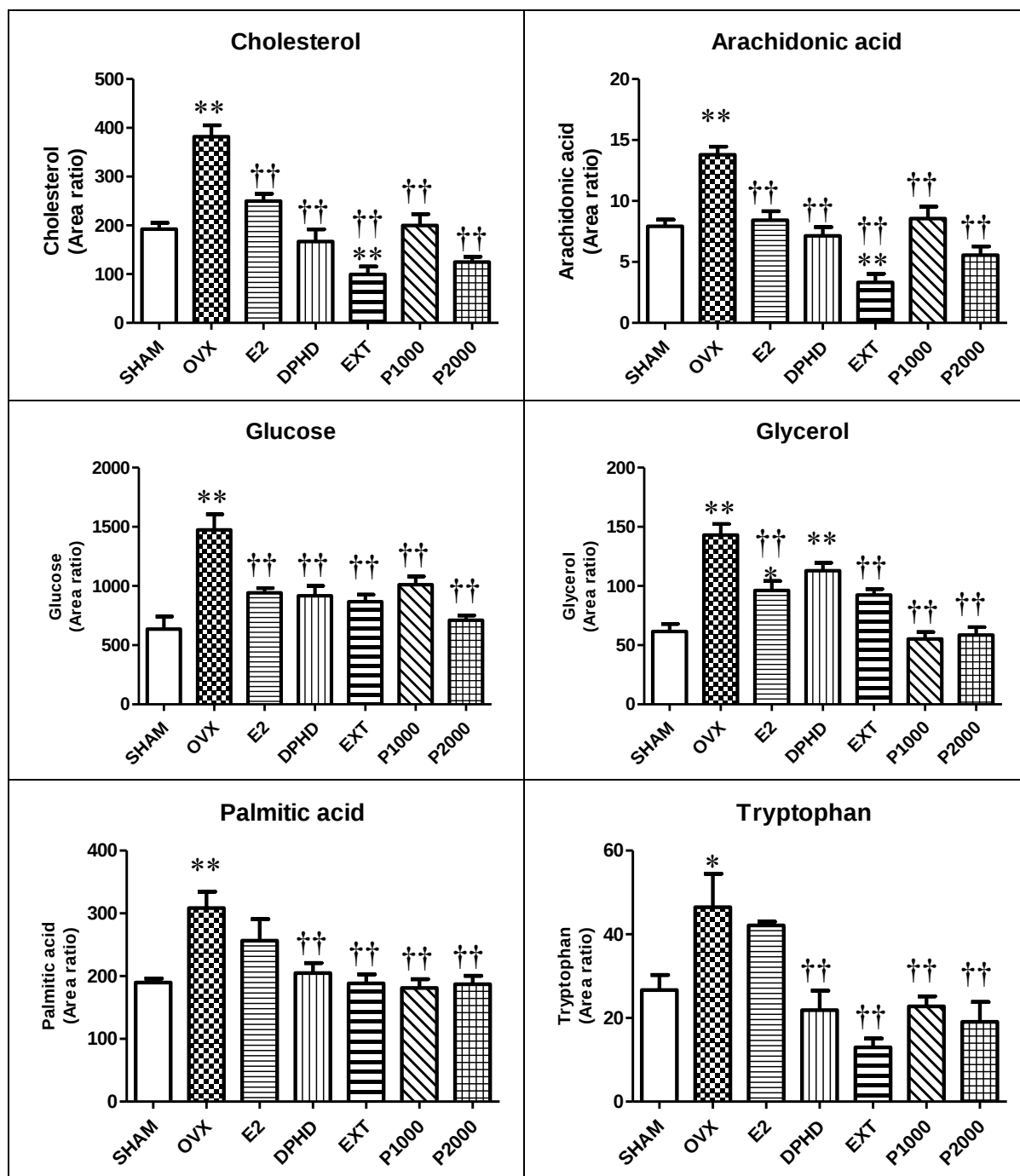
รูปที่ 10. แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ที่มีในซีรัมหนูตัดรังไข่ (OVX) เทียบกับหนูปกติ (SHAM) และการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) และสารจากวุ้นชั่งมดลูก (DPHD, EXT และ P2000) ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนู SHAM; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนู OVX

4.5.2. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในซีรัมแบบมีเป้าหมาย

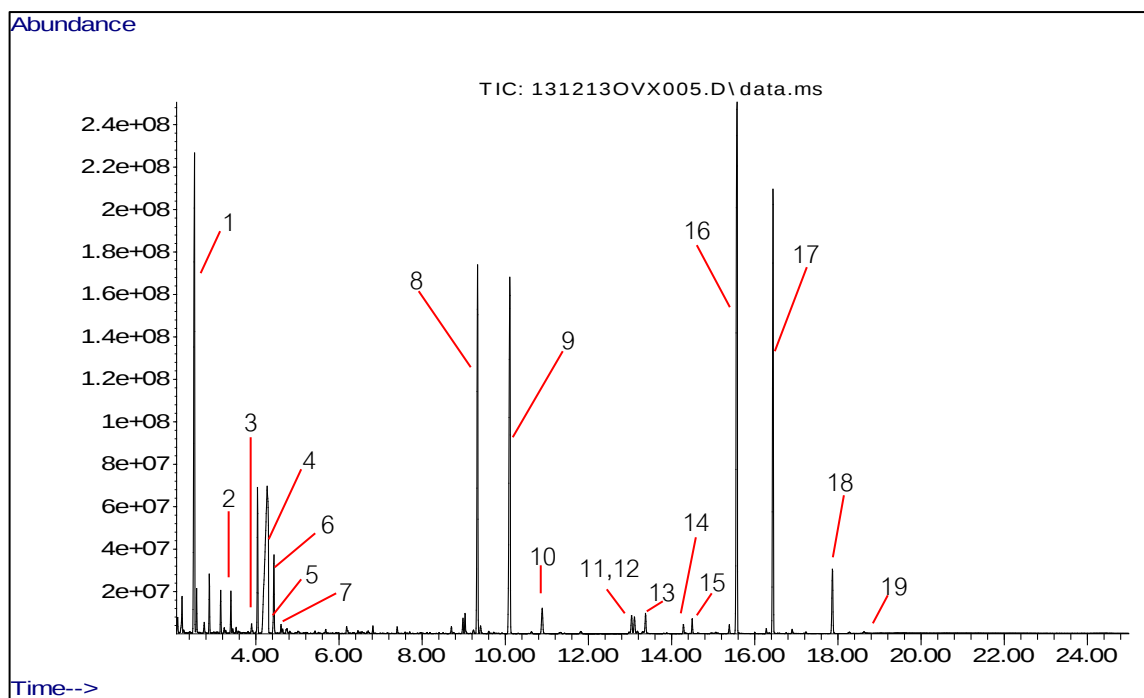
ตารางที่ 4 แสดงค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสาร metabolites ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าสามารถตรวจพบสารได้หลายประเภท ได้แก่ amino acids, fatty acid, lipids, carbohydrates และสารอื่นๆ ซึ่งไม่สามารถตรวจได้จากระบบที่ setup ไว้โดยเทคนิค LC-MS ที่ใช้ (Reverse Phase-LC-MS) ผลการวิเคราะห์พบการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites หลายชนิดในหนูตัดรังไข่เมื่อเทียบกับหนูควบคุมปกติ ได้แก่ cholesterol, arachidonic acid, glycerol, glucose, palmitic acid และ tryptophan พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นในหนูตัดรังไข่ เทียบกับหนูปกติ โดยมีการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ดังกล่าวจาก 100.0 ± 6.7 , 100.0 ± 6.9 , 100.0 ± 10.4 , 100.0 ± 16.8 , 100.0 ± 3.3 และ 100.0 ± 13.4 เป็น 198.6 ± 11.9 , 174.3 ± 8.4 , 232.3 ± 15.4 , 231.8 ± 20.7 , 162.5 ± 13.6 และ 174.2 ± 29.9 ตามลำดับ หลังจากให้สารจากवानชักมดลูก พบว่าสารเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงลดลง แสดงถึงผลของการรักษาภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสาร metabolites ในซีรัมโดยเทคนิค GC-MS

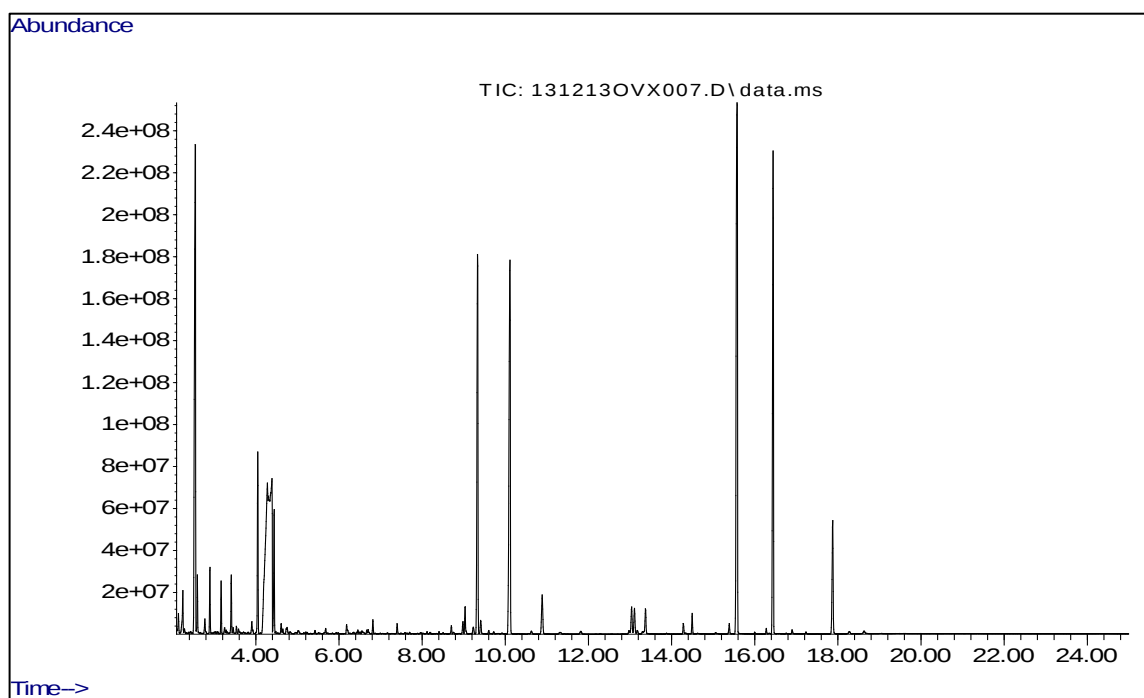
Metabolite Name	Treatments (Mean $\pm$ SEM)						
	SHAM	OVX	E2	DPHD	EXT	P1000	P2000
Amino acids							
Alanine	100.0 $\pm$ 13.6	177.4 $\pm$ 35.2	371.0 $\pm$ 40.4	194.9 $\pm$ 45.5	109.7 $\pm$ 18.2	85.0 $\pm$ 8.7	147.0 $\pm$ 36.5
Glycine	100.0 $\pm$ 18.1	208.9 $\pm$ 52.6	264.7 $\pm$ 36.8	211.5 $\pm$ 57.6	93.3 $\pm$ 13.7	88.8 $\pm$ 9.3	139.9 $\pm$ 39.3
Valine	100.0 $\pm$ 14.2	143.7 $\pm$ 39.2	236.3 $\pm$ 26.3	166.3 $\pm$ 36.3	128.7 $\pm$ 16.4	93.3 $\pm$ 8.6	157.6 $\pm$ 32.7
Leucine	100.0 $\pm$ 18.0	134.7 $\pm$ 37.0	221.3 $\pm$ 25.7	158.0 $\pm$ 30.6	137.3 $\pm$ 22.8	91.4 $\pm$ 7.7	165.7 $\pm$ 34.3
Isoleucine	100.0 $\pm$ 17.7	136.2 $\pm$ 35.4	214.5 $\pm$ 25.6	161.2 $\pm$ 32.0	148.9 $\pm$ 19.2	92.0 $\pm$ 7.8	163.6 $\pm$ 32.6
Proline	100.0 $\pm$ 23.4	112.7 $\pm$ 27.1	326.8 $\pm$ 48.0	234.1 $\pm$ 53.2	160.9 $\pm$ 19.2	137.8 $\pm$ 21.2	162.1 $\pm$ 48.8
Serine	100.0 $\pm$ 9.6	140.2 $\pm$ 29.4	256.5 $\pm$ 30.3	179.7 $\pm$ 44.3	100.1 $\pm$ 12.5	105.0 $\pm$ 14.9	146.0 $\pm$ 30.4
Threonine	100.0 $\pm$ 11.	148.7 $\pm$ 38.8	204.4 $\pm$ 23.1	152.0 $\pm$ 40.4	86.2 $\pm$ 9.3	93.6 $\pm$ 12.2	123.5 $\pm$ 26.6
Methionine	100.0 $\pm$ 18.2	141.8 $\pm$ 43.7	207.9 $\pm$ 34.9	82.0 $\pm$ 23.2	40.7 $\pm$ 11.1	52.4 $\pm$ 19.5	85.0 $\pm$ 41.5
Phenylalanine	100.0 $\pm$ 9.9	151.3 $\pm$ 31.0	181.8 $\pm$ 20.7	123.5 $\pm$ 22.6	92.1 $\pm$ 9.5	73.9 $\pm$ 7.7	123.9 $\pm$ 28.4
Tyrosine	100.0 $\pm$ 21.2	186.3 $\pm$ 48.8	183.5 $\pm$ 17.9	113.2 $\pm$ 32.5	58.9 $\pm$ 5.9	90.7 $\pm$ 9.6	115.8 $\pm$ 28.9
Tryptophan	100.0 $\pm$ 13.4	174.2 $\pm$ 29.9	175.0 $\pm$ 17.4	82.0 $\pm$ 17.4	48.6 $\pm$ 8.0	85.4 $\pm$ 8.9	99.9 $\pm$ 32.1
Fatty acids							
Palmitic acid, methyl ester	100.0 $\pm$ 19.2	130.6 $\pm$ 18.7	173.6 $\pm$ 30.2	174.5 $\pm$ 17.2	164.0 $\pm$ 21.4	70.8 $\pm$ 3.5	152.3 $\pm$ 25.4
Methyl stearate	100.0 $\pm$ 20.9	146.3 $\pm$ 20.2	173.4 $\pm$ 24.2	163.1 $\pm$ 12.7	119.7 $\pm$ 14.9	54.0 $\pm$ 2.9	104.6 $\pm$ 18.0
Myristic acid	100.0 $\pm$ 10.3	169.5 $\pm$ 20.8	127.8 $\pm$ 27.5	136.4 $\pm$ 10.8	125.3 $\pm$ 16.1	56.8 $\pm$ 5.8	95.1 $\pm$ 15.9
Palmitoleic acid	100.0 $\pm$ 11.3	172.2 $\pm$ 19.3	139.3 $\pm$ 40.9	157.4 $\pm$ 18.6	146.4 $\pm$ 19.3	54.0 $\pm$ 4.3	107.0 $\pm$ 21.5
Palmitic acid	100.0 $\pm$ 3.3	162.5 $\pm$ 13.6	155.0 $\pm$ 25.0	121.4 $\pm$ 15.4	99.3 $\pm$ 7.6	88.1 $\pm$ 9.7	98.7 $\pm$ 7.0
Margaric acid	100.0 $\pm$ 22.6	128.0 $\pm$ 19.4	124.2 $\pm$ 15.2	144.2 $\pm$ 9.8	100.2 $\pm$ 8.8	90.4 $\pm$ 11.1	104.6 $\pm$ 13.5
Linoleic acid	100.0 $\pm$ 5.9	167.4 $\pm$ 17.1	145.5 $\pm$ 23.7	112.7 $\pm$ 13.9	85.5 $\pm$ 10.5	70.5 $\pm$ 7.8	81.7 $\pm$ 7.5
Oleic acid	100.0 $\pm$ 6.5	141.8 $\pm$ 14.2	124.5 $\pm$ 24.7	117.2 $\pm$ 14.8	96.6 $\pm$ 8.5	65.0 $\pm$ 5.8	85.2 $\pm$ 8.7
trans-13-Octadecenoic acid	100.0 $\pm$ 13.4	124.9 $\pm$ 12.5	143.4 $\pm$ 40.5	84.2 $\pm$ 10.6	78.7 $\pm$ 14.0	73.2 $\pm$ 8.6	69.9 $\pm$ 9.2
Stearic acid	100.0 $\pm$ 12.5	175.5 $\pm$ 17.6	199.1 $\pm$ 25.7	88.5 $\pm$ 13.5	57.2 $\pm$ 8.5	103.5 $\pm$ 13.8	75.3 $\pm$ 7.7
Lipids							
Arachidonic acid methyl ester	100.0 $\pm$ 35.5	163.1 $\pm$ 30.9	255.7 $\pm$ 52.4	264.5 $\pm$ 47.7	206.6 $\pm$ 48.6	80.4 $\pm$ 18.5	228.6 $\pm$ 39.6
Arachidonic acid	100.0 $\pm$ 6.9	174.3 $\pm$ 8.4	106.4 $\pm$ 9.3	90.2 $\pm$ 9.1	41.9 $\pm$ 8.9	99.9 $\pm$ 13.5	70.3 $\pm$ 8.9
Myristic acid 1-monoglyceride	100.0 $\pm$ 17.7	94.7 $\pm$ 40.7	94.3 $\pm$ 41.4	96.3 $\pm$ 30.8	63.9 $\pm$ 16.9	117.2 $\pm$ 32.8	96.4 $\pm$ 18.9
2-Monopalmitoylglycerol	100.0 $\pm$ 7.5	160.1 $\pm$ 15.5	177.4 $\pm$ 25.4	95.5 $\pm$ 15.6	84.4 $\pm$ 6.5	120.8 $\pm$ 12.8	104.1 $\pm$ 13.0
Glyceryl palmitate	100.0 $\pm$ 10.1	152.7 $\pm$ 20.5	154.2 $\pm$ 22.9	95.2 $\pm$ 22.0	64.8 $\pm$ 6.9	122.5 $\pm$ 14.1	88.4 $\pm$ 20.1
beta-Glyceryl monostearate	100.0 $\pm$ 12.8	177.0 $\pm$ 20.5	218.5 $\pm$ 34.0	92.6 $\pm$ 13.6	62.5 $\pm$ 6.5	107.8 $\pm$ 14.9	79.0 $\pm$ 10.9
Glycerol monostearate	100.0 $\pm$ 9.8	157.4 $\pm$ 19.9	164.1 $\pm$ 21.9	98.4 $\pm$ 19.1	61.9 $\pm$ 8.5	104.9 $\pm$ 13.0	84.5 $\pm$ 19.9
Cholesterol	100.0 $\pm$ 6.7	198.6 $\pm$ 11.9	129.8 $\pm$ 7.8	86.7 $\pm$ 12.9	51.7 $\pm$ 8.4	89.4 $\pm$ 15.4	64.9 $\pm$ 5.6
Campesterol	100.0 $\pm$ 10.7	250.6 $\pm$ 17.4	208.8 $\pm$ 22.0	85.5 $\pm$ 12.2	55.3 $\pm$ 10.9	76.5 $\pm$ 13.7	56.0 $\pm$ 9.9
beta-Sitosterol	100.0 $\pm$ 12.2	263.2 $\pm$ 16.0	223.0 $\pm$ 24.2	91.7 $\pm$ 11.3	56.7 $\pm$ 10.8	89.3 $\pm$ 12.2	68.7 $\pm$ 6.6
Organic acids							
Lactic acid	100.0 $\pm$ 11.9	143.4 $\pm$ 13.5	167.4 $\pm$ 19.4	130.2 $\pm$ 16.3	102.5 $\pm$ 14.8	84.1 $\pm$ 15.5	97.3 $\pm$ 22.9
2-Propenoic acid	100.0 $\pm$ 17.7	160.5 $\pm$ 10.8	74.5 $\pm$ 34.4	145.8 $\pm$ 8.7	108.3 $\pm$ 23.1	89.5 $\pm$ 17.1	104.2 $\pm$ 20.9
2-Hydroxybutyric acid	100.0 $\pm$ 6.0	119.6 $\pm$ 32.9	239.6 $\pm$ 23.3	110.1 $\pm$ 11.6	89.4 $\pm$ 10.7	71.5 $\pm$ 13.5	99.4 $\pm$ 15.8
3-Hydroxybutyric acid	100.0 $\pm$ 10.9	142.8 $\pm$ 21.8	93.2 $\pm$ 19.6	151.9 $\pm$ 16.1	197.1 $\pm$ 40.3	184.7 $\pm$ 29.0	218.2 $\pm$ 23.5
4-Hydroxybutyric acid	100.0 $\pm$ 14.1	93.2 $\pm$ 41.7	93.5 $\pm$ 31.8	193.9 $\pm$ 28.3	295.2 $\pm$ 56.7	329.9 $\pm$ 70.7	316.7 $\pm$ 70.2



รูปที่ 11. แสดงถึงสาร metabolites ที่มีการเปลี่ยนแปลงในหนูตัดรังไข่ (OVX) เทียบกับหนูปกติ (SHAM) และการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) และสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนู SHAM; ^{††} $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับหนู OVX



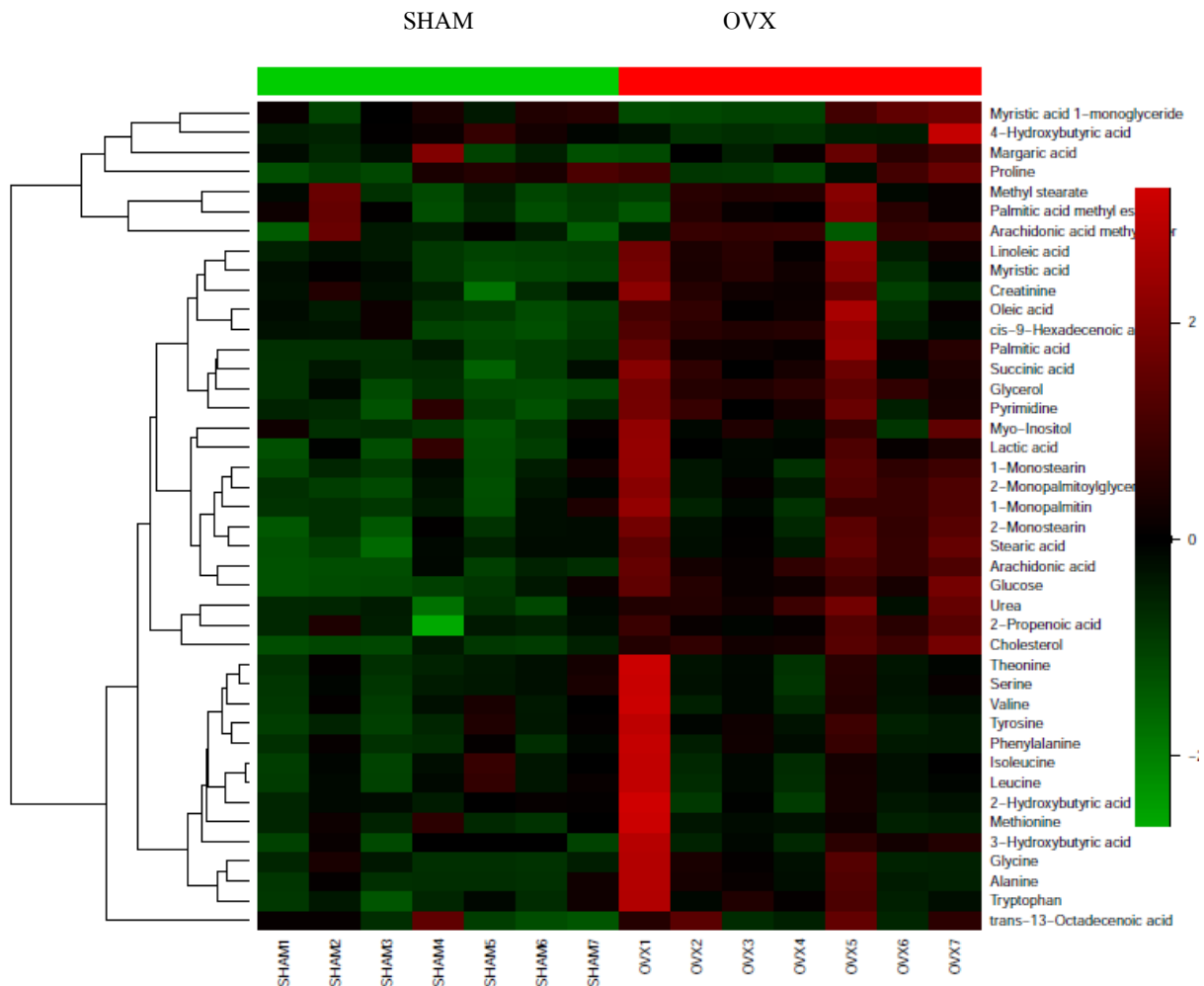
(a)



(b)

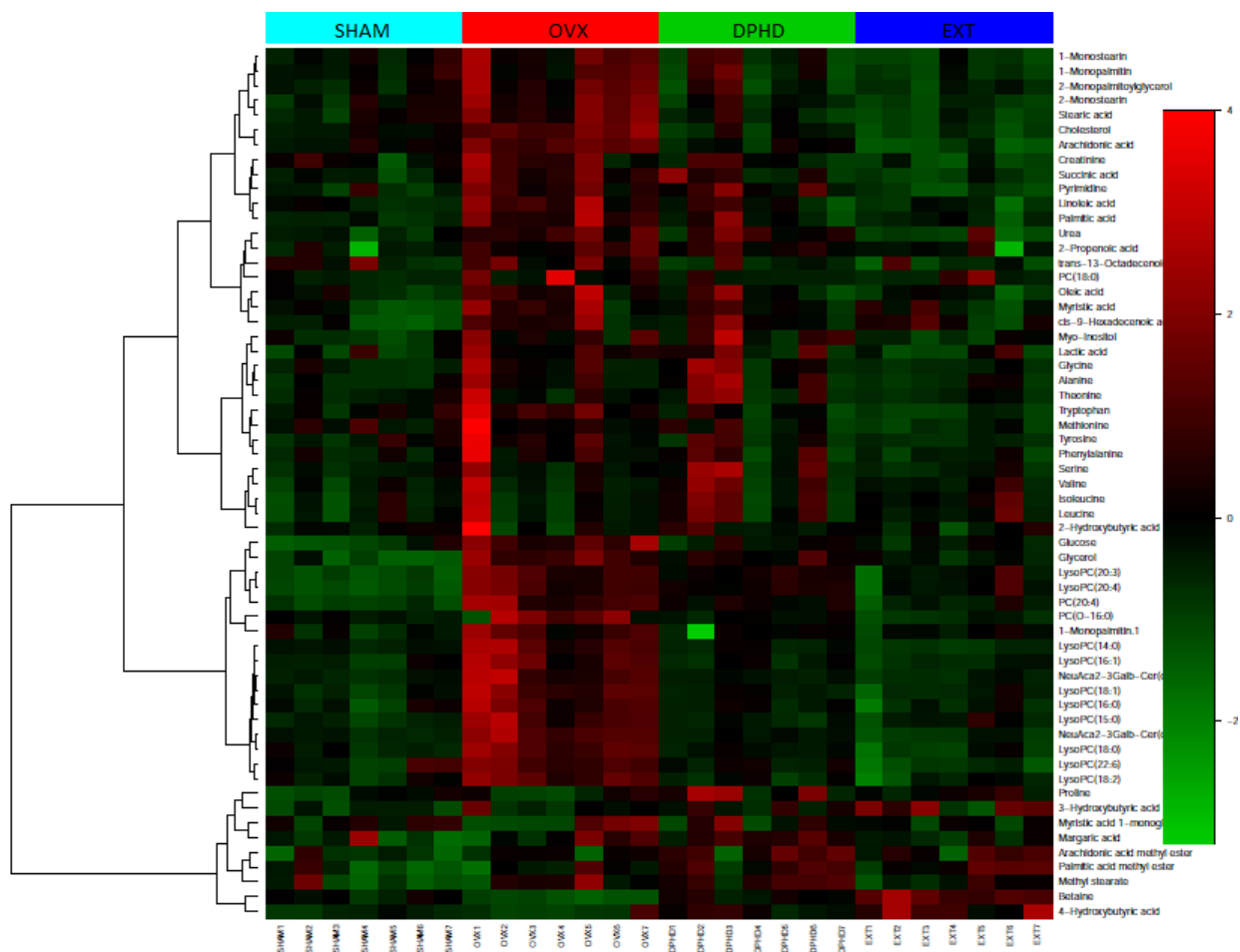
รูปที่ 12. แสดง GC-MS Total Ion Chromatogram (TIC) เปรียบเทียบระหว่าง (a) ซีรัมหนูควบคุมปกติ , SHAM และ (b) หนูควบคุมที่ตัดรังไข่ (OVX).

สาร Lactic acid (1), 3-hydroxybutyric acid (2), Valine (3), Urea (4), Glycerol (5), Leucine (6), Iso-leucine (7), Mannopyranose (8), Glucose (9), Palmitic acid (10), Linoleic (11), Palmitoleic acid (12), Stearic acid (13), Arachidonic acid (14), Myristic acid (15), Glyceryl palmitate (16), Monostearin (17), Cholesterol (18), beta-Sitosterol (19)



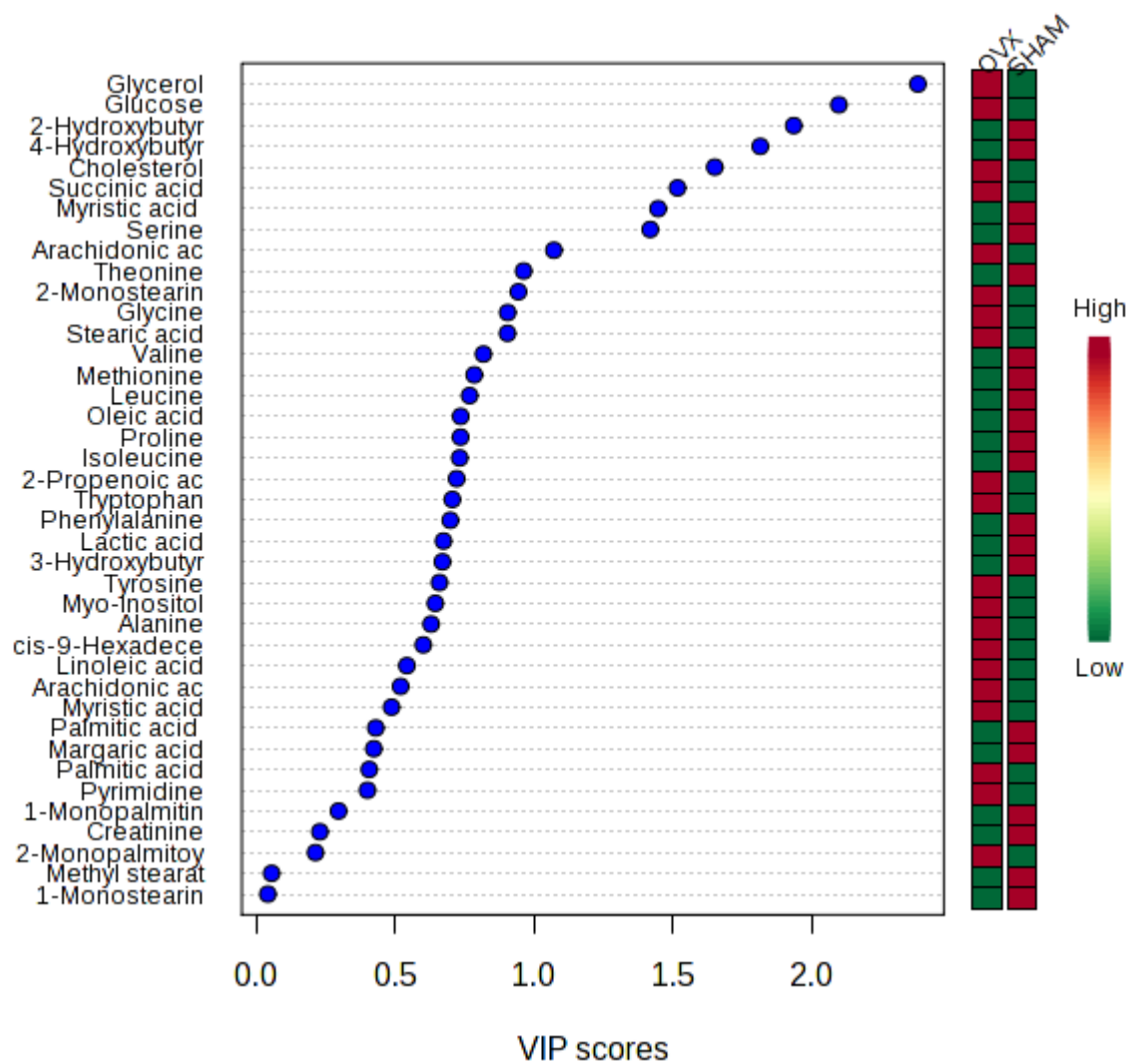
รูปที่ 13. Heat map ของการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ภาพแบบ color square แสดงความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ที่เปลี่ยนแปลงในหนูปกติ และหนูตัดรังไข่ แถบสีระบุถึงค่าที่สูงหรือต่ำเมื่อเทียบกับข้อมูลทั้งหมด แถบสีแดงสุดแสดงถึงปริมาณของสาร metabolite ที่มีมากที่สุด แถบสีเขียวสุดแสดงถึงปริมาณของสาร metabolite ที่มีปริมาณน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับข้อมูลทั้งหมดในระนาบเดียวกัน เส้นเชื่อมโยงด้านซ้าย แสดงถึงความเหมือนกัน (Similarity) ของตัวอย่างและสาร metabolite แต่ละตัว

ภาพที่แสดงสร้างจากโปรแกรม MetATT (<http://www.metatt.metabolomics.ca/MetATT>)

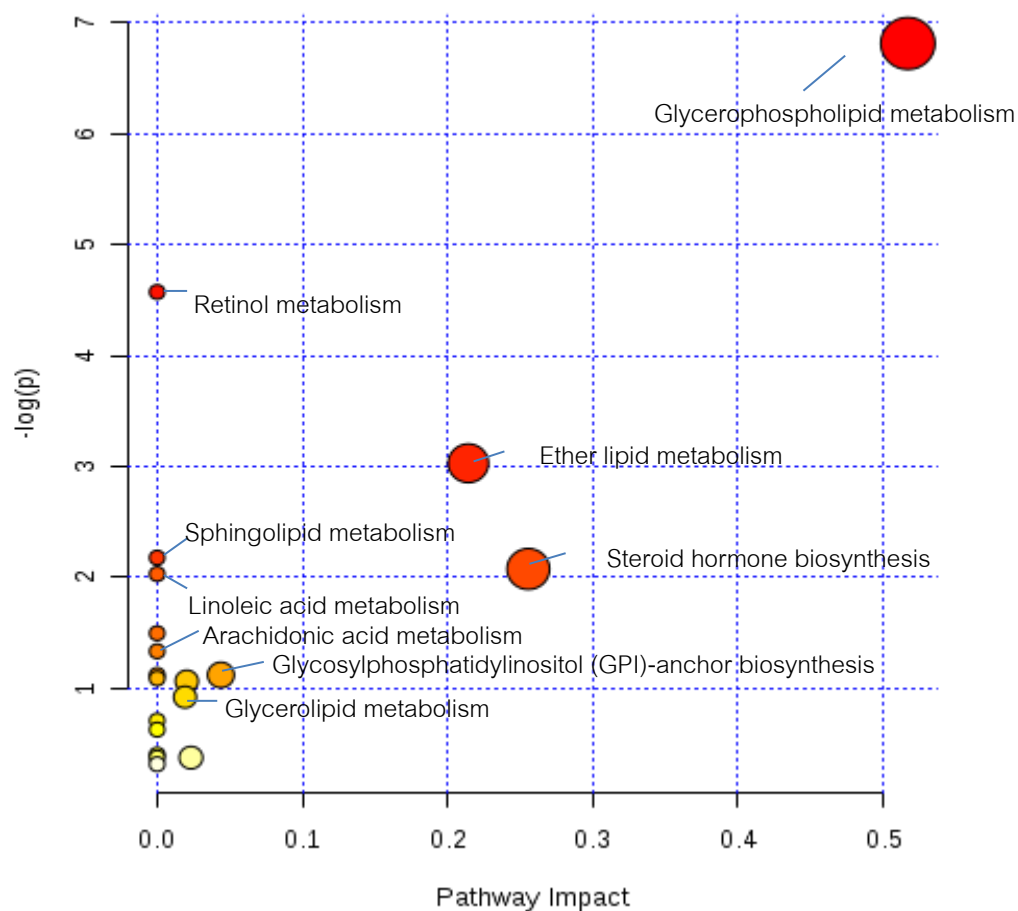


รูปที่ 14. Heat map ของการวิเคราะห์ด้วย GC-MS และ LC-MS ภาพแบบ color square แสดงความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ที่เปลี่ยนแปลงในหนูปกติ หนูตัดรังไข่ และหนูที่ได้รับสารจากว่านชักมดลูก แถบสีระบุถึงค่าที่สูงหรือต่ำเมื่อเทียบกับข้อมูลทั้งหมด แถบสีแดงสุดแสดงถึงปริมาณของสาร metabolite ที่มีมากที่สุด แถบสีเขียวสุดแสดงถึงปริมาณของสาร metabolite ที่มีปริมาณน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับข้อมูลทั้งหมดในระนาบเดียวกัน เส้นเชื่อมโยงด้านซ้าย แสดงถึงความเหมือนกัน (Similarity) ของตัวอย่างและสาร metabolite แต่ละตัว

ภาพที่แสดงสร้างจากโปรแกรม MetATT (<http://www.metatt.metabolomics.ca/MetATT>)

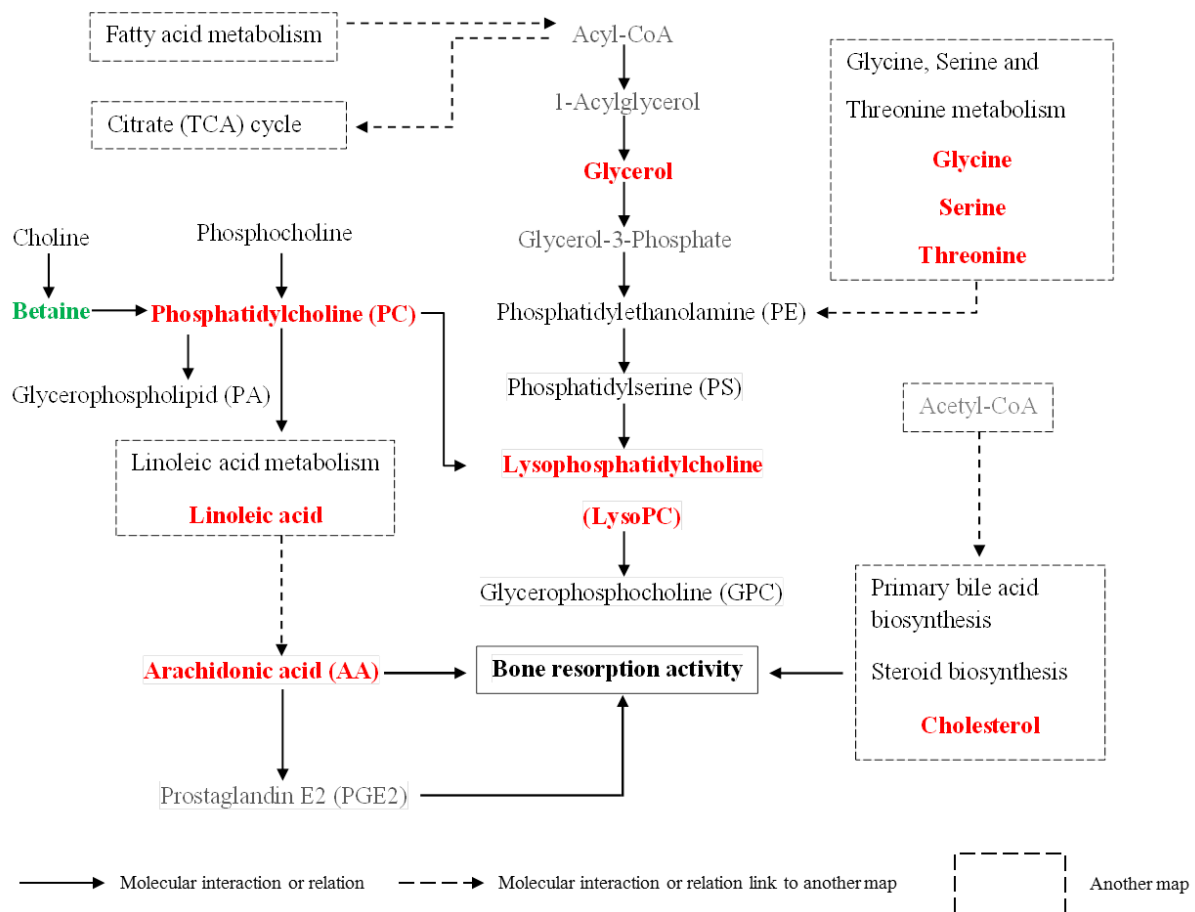


รูปที่ 15. PLS VIP score แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ในหนูตัดรังไข่ (OVX) เทียบกับหนูปกติ (SHAM) สีแดงแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้น สีเขียวแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่ลดลง ภาพที่แสดงสร้างจากโปรแกรม MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>)



รูปที่ 16. แสดง Pathway Impact ของเมทาบอลิท์จากการตรวจวิเคราะห์แบบ untargeted metabolomics ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในหนูกลุ่มที่พร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (OVX) โดยพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและการเปลี่ยนแปลงของ metabolites ในหลาย pathway โดยเฉพาะ Glycerophospholipid, Ether lipid และ Steroid biosynthesis

ภาพข้างต้นสร้างจากโปรแกรม MetaboAnalyst v.2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) โดยใช้ ข้อมูลสารเมทาบอลิท์ที่คาดว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงในหนูกลุ่มตัวจริงไข



รูปที่ 17. แสดง Metabolic Pathway ที่อาจจะเกิดขึ้นของสารเมตาบอไลต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในหนูกลุ่มที่พร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (OVX) สารเมตาบอไลต์ที่พิมพ์ด้วยอักษรสีแดง แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นในหนูตัวจริงไข่ สารเมตาบอไลต์ที่พิมพ์ด้วยอักษรสีเขียว แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงในหนูตัวจริงไข่ สารเมตาบอไลต์ที่พิมพ์ด้วยอักษรสีดำ หมายถึงการไม่เปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นในหนูตัวจริงไข่ สารเมตาบอไลต์ที่พิมพ์ด้วยอักษรเทา หมายถึงสารที่ไม่สามารถวัดได้โดยวิธีนี้ (not detectable) แต่เป็นสารตัวกลางที่มีความสำคัญหรือเป็นสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ต่อ bone turnover

Pathway ที่สร้างขึ้นอ้างอิงจาก KEGG Pathway database (<http://www.genome.jp/kegg/>) และ HMDB database (<http://www.hmdb.ca/>)

4.5.3. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไขมันในซีรัมแบบไม่กำหนดเป้าหมาย

นอกจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในซีรัมของหนูโดยใช้วิธี untargeted metabolomics และ targeted metabolomics โดยเทคนิค LC-MS และ GC-MS แล้ว ทีมวิจัยได้ทำการเปรียบเทียบลิพิดในซีรัมของหนูในกลุ่ม ovx เทียบกับ sham ด้วยวิธีการลิพิดมิกส์แบบไม่มีเป้าหมาย (untargeted lipidomics) ซึ่งทำได้โดยการสกัดไขมันในซีรัมด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS ด้วยวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Vinayavekhin, Mahipant et al. 2015) วิธีการนี้จะทำให้สามารถตรวจวัดไขมันได้หลายประเภท อาทิเช่น กรดไขมัน ฟอสโฟลิปิด สฟริงโกลิปิด และกลีเซอโรลิปิด จากนั้น ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม XCMS เพื่อระบุไอออนของไขมันที่มีการแตกต่างเชิงปริมาณระหว่างกลุ่ม sham กับกลุ่ม ovx อย่างน้อย 2 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งความแตกต่างนี้สามารถเห็นได้ชัดเจนใน extracted ion chromatogram

จากการวิเคราะห์ดังกล่าว ณ เวลา 6 สัปดาห์หลังจากการผ่าตัดรังไข่ ผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจากหนูกลุ่ม ovx กับกลุ่ม sham มากนัก โดยมีไอออนของไขมันที่มีประจุบวกเพียง 1 ไอออนและประจุลบเพียง 4 ไอออนเท่านั้นที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม ovx ส่วนไอออนที่มีปริมาณลดลงเท่ากับ 5 ไอออนที่พบในขั้วบวกและ 11 ไอออนที่พบในขั้วลบ เนื่องจากมีไขมันจำนวนน้อยมากที่มีการเปลี่ยนแปลง ณ เวลาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงตัดสินใจที่จะไม่วิเคราะห์ผลของไอออนเหล่านี้ต่อ

ณ เวลา 12 สัปดาห์หลังจากการผ่าตัดรังไข่ ผู้วิจัยพบความแตกต่างของไอออนระหว่างตัวอย่างจากหนูกลุ่ม ovx กับกลุ่ม sham จำนวนเพิ่มขึ้น โดยมีไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม ovx จำนวน 4 ไอออนจากการวิเคราะห์ในขั้วบวกและ 75 ไอออนจากการวิเคราะห์ในขั้วลบ ส่วนไอออนที่มีปริมาณลดลงในหนูกลุ่ม ovx มีจำนวน 50 ไอออนที่พบในขั้วบวกและ 5 ไอออนในขั้วลบ

จากนั้นจึงทำการระบุเอกลักษณ์ของไอออนที่แตกต่างกันเหล่านี้โดยการใช้ข้อมูลจากมวลอะตอมที่แท้จริง (accurate mass), สเปกตรัมจากเทคนิคการต่ออนุกรมของส่วนวิเคราะห์มวล (tandem mass spectrum), เวลาเก็บ (retention time) และสารมาตรฐาน ที่มียังสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ที่มีโอกาสเป็นไปได้สูงของไอออนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างกลุ่ม ovx จำนวน 41 ไอออน โดยทั้งหมดเป็นไอออนในขั้วลบ ซึ่งมาจากกลุ่มไขมัน 5 กลุ่ม ได้แก่ 1-O-alkenyl-lysophosphatidylethanolamine (alkenyl-LPE), lysophosphatidylethanolamine (LPE), ceramide-1-phosphate (CerP), ceramide (Cer) และ sphingomyelin (Cer-PC) ส่วนไอออนที่มีปริมาณลดลงในตัวอย่างกลุ่ม ovx เมื่อเทียบกับ sham ที่มียังสามารถทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ทั้งหมด 25 ไอออน ซึ่งเป็นไอออนในขั้วบวกทั้งหมด และมาจากกลุ่มไขมันประเภท monoacylglycerol (MAG) และ triacylglycerol (TAG) นอกจากนี้ สำหรับไอออนอีก 10 ไอออน ทางที่มียังสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอออนได้ทั้งเต็มส่วนและบางส่วน แต่เนื่องจากไอออนเหล่านี้เป็นไอออนของไขมันซึ่งไม่สามารถรวมกลุ่มกับไอออนตัวอื่นได้ จึงมีความเป็นไปได้สูงว่า ไอออนเหล่านี้จะไม่มี ความเกี่ยวข้องกับสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างแท้จริง ทางที่มียังจึงไม่ได้สนใจที่จะทำการศึกษาไขมันเหล่านี้ต่อไป ดังนั้น สรุปแล้วจากการใช้วิธีลิปิโดมิกส์แบบไม่มีเป้าหมาย ทางที่มียังสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอออนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ทั้งสิ้น 57%

ผลการรักษาด้วยสาร E₂, DPHD และสารสกัดหรือผงว่านชักมดลูก

ไขมันที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงไปในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดสภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตได้ โดยหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (กลุ่ม ovx) แล้วควรมีปริมาณไขมันต่างๆ เหล่านี้ในซีรัมใกล้เคียงกับของกลุ่มควบคุม (sham) มากขึ้น ถ้าสารที่ให้ไปมีประสิทธิผลในการรักษา ด้วยเหตุผลนี้ ทางที่มียังจึงได้วัดเปรียบเทียบปริมาณของไขมันที่มีการเปลี่ยนแปลงในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้ว ในซีรัมจากตัวอย่างกลุ่มที่ได้รับการสาร E₂, DPHD และสารสกัดหรือผงว่านชักมดลูกทุกวันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ การวัดปริมาณดังกล่าวทำได้โดยใช้วิธีการลิปิโดมิกส์ด้วย LC-MS ดังการทดลองระหว่างตัวอย่างของหนูกลุ่ม sham และ ovx

จากตารางแสดงผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่า Cer เป็นไขมันกลุ่มเดียวที่มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญในซีรัมของหนู ovx ที่ได้รับสาร E₂ เมื่อเทียบกับปริมาณที่วัดได้ในซีรัมของหนู ovx ที่ได้รับเพียงตัวนำพา (vehicle) เท่านั้น ทั้งนี้ ปริมาณของ Cer ในตัวอย่างกลุ่ม ovx+E₂ นี้มีความใกล้เคียงกับปริมาณของ Cer ในตัวอย่างกลุ่ม sham ซึ่งถือว่าเป็นสภาวะปกติค่อนข้างมากด้วย

สำหรับผลของการรักษาด้วย DPHD ที่มียังพบว่า กลุ่มไขมันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างกลุ่ม ovx เมื่อเทียบกับ sham (alkenyl-LPE, LPE, CerP, Cer และ Cer-PC) มีปริมาณลดลงทั้งหมดจากกลุ่ม ovx ถึงแม้ว่า การลดลงนี้จะไม่มากพอที่จะทำให้ระดับของไขมันเหล่านี้ในซีรัมลดลงมาจนเท่ากับสภาวะ

ปกติก็ตาม เมื่อวัดระดับไขมันในลักษณะเดียวกันกับกลุ่มตัวอย่าง ovx ที่มีการให้สารสกัดหรือผลจากว่านชักมดลูก ที่ความเข้มข้นหลากหลาย (หนูกลุ่ม ovx+Ext, ovx+P1000, และ ovx+P2000) พบว่าการรักษาด้วยสารผสมนี้ให้ประสิทธิผลดีกว่าการรักษาด้วย DPHD โดยปริมาณของไขมันกลุ่มนี้ลดลงมาใกล้เคียงกับระดับในสภาวะปกติที่พบในตัวอย่างจากหนูกลุ่ม sham มากกว่า อย่างไรก็ตาม สำหรับไขมันที่มีปริมาณลดลงในตัวอย่างจากหนูกลุ่ม ovx เมื่อเทียบกับ sham ซึ่งก็คือ MAG และ TAG พบว่ามีเพียงการรักษาด้วยสารสกัดจากว่านชักมดลูกเท่านั้น (หนูกลุ่ม ovx+Ext) ที่ทำให้ปริมาณของ TAG บางตัวเพิ่มมากขึ้น แต่การรักษาด้วยสารสกัดนี้ก็ไม่มีผลใดๆ ต่อระดับของ MAG จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมานี้ เราจะเห็นได้ว่า สาร DPHD และสารผสมจากว่านชักมดลูกให้ผลการรักษาหนูที่อยู่ในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนได้เป็นที่น่าพึงพอใจมาก โดยสามารถปรับระดับของไขมันที่เปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่ให้กลับเข้าสู่สภาวะปกติได้

ตารางที่ 5 ปริมาณเชิงเปรียบเทียบของกลุ่มไขมันที่ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์ ในตัวอย่างกลุ่มต่างๆ

Lipid class	Fold ^{a,b} (ovx/)					
acyl chain	Sham	ovx+E ₂	ovx+DPHD	ovx+E500	ovx+P1000	ovx+P200
ไขมันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างกลุ่ม ovx						
Alkenyl-LPE						
O-16:1	10.3*	2.0	4.6*	11.6*	18.3*	12.0*
O-18:2	9.9*	2.1	5.3*	10.2*	17.0*	12.9*
LPE						
16:0	5.0 [†]	1.0	2.7*	3.6*	8.6 [†]	5.8 [†]
18:0	9.6*	1.6	6.3*	7.0*	15.8*	9.5*
18:2	3.8 [†]	0.9	2.2*	3.0*	6.1 [†]	4.6 [†]
18:1	8.8*	1.3	3.6*	5.1*	10.5*	7.1*
20:4	6.1 [†]	1.0	2.4*	3.0*	7.2 [†]	4.6 [†]
CerP						
d18:1/14:0	2.1 [§]	1.4 [†]	2.1 [†]	5.3 [§]	3.0 [§]	3.2 [§]
Cer						
d18:1/16:0	2.3 [†]	2.1 [†]	2.1 [†]	2.0 [†]	2.1 [†]	2.1 [†]
d18:1/18:0	2.9 [†]	2.0 [†]	2.3 [†]	3.8 [†]	2.8 [†]	2.8 [†]
d18:1/20:0	3.7 [†]	2.8*	2.2*	3.9 [†]	3.6 [†]	2.6*
d18:1/22:0	3.1 [†]	2.2 [†]	2.2*	2.8 [†]	2.5 [†]	2.1 [†]
d18:1/23:0	2.8 [†]	1.9*	2.6 [†]	2.7 [†]	2.6 [†]	2.2 [†]
d18:1/22:1	4.7 [†]	2.8*	3.3 [†]	5.4 [†]	4.8 [†]	3.7 [†]
d18:1/23:1	4.0 [†]	2.3 [†]	3.4 [†]	5.0 [†]	4.8 [†]	3.8 [†]
d18:1/24:1	3.2 [†]	2.0*	2.1*	2.6 [†]	2.5 [†]	1.9*
d18:1/25:1	3.3 [†]	2.1*	3.3 [†]	3.4 [†]	3.0*	2.8*

Lipid class acyl chain	Fold ^{a,b} (ovx/)					
	Sham	ovx+E ₂	ovx+DPHD	ovx+E500	ovx+P1000	ovx+P200
Cer-PC						
d18:1/16:1	2.1 [§]	1.5 [‡]	2.3 [‡]	5.4 [§]	2.9 [§]	3.3 [§]
d18:1/18:1	2.1 [‡]	1.7 [‡]	2.1 [‡]	4.7 [§]	2.4 [‡]	2.5 [§]
d18:1/22:0	2.9 [†]	1.5	2.0 [§]	4.0 [§]	2.2 [§]	2.7 [§]
ไขมันที่มีปริมาณลดลงในตัวอย่างกลุ่ม ovx เมื่อเทียบกับ sham						
MAG						
22:0	3.1*	6.9	3.3	2.1	0.5*	1.0
24:0	4.2*	5.5	3.4	2.1	0.8	1.0
24:2	3.3*	6.0	3.2*	1.8	0.6	1.0
24:1	3.4*	4.8	3.1	2.0	0.7	1.2
26:4	3.9*	14.4	3.7	2.3	0.5	1.2
TAG						
18:0/18:1/20:0	2.1 [§]	1.9	0.9	3.6*	1.3	2.2
18:2/20:1/20:1	2.0 [§]	1.8	1.1	3.2*	1.2	2.2
18:2/20:0/20:1	2.4 [§]	2.4	0.9	4.0*	1.3	2.4
16:0/18:1/24:1	2.3 [§]	2.2	0.8	3.9*	1.2	2.1
16:0/18:1/24:0	2.1 [‡]	1.9	0.8	3.4*	1.2	2.1
18:2/18:2/24:0	2.2 [§]	2.0	0.8	3.7*	1.3	2.3
18:1/18:2/24:0	2.3 [§]	2.1	0.7	3.6*	1.2	2.0
18:1/18:1/24:0	2.2 [‡]	2.1	0.6	3.3*	1.1	1.8
18:0/18:1/24:0	2.1 [†]	1.8	0.6	2.8	1.1	1.7
18:3/20:4/24:0	2.0 [§]	1.7	0.9	2.8*	1.4	2.3*
18:2/20:4/24:0	2.0 [‡]	1.6	0.8	2.9*	1.3	2.1*
18:3/20:2/24:0	2.2 [‡]	1.6	0.8	3.2*	1.4	2.2
18:2/20:2/24:0	2.3 [‡]	1.9	0.6	3.2*	1.2	2.0
18:2/20:1/24:0	2.2 [†]	2.0	0.5*	2.9	1.0	1.7
18:1/20:1/24:0	2.2*	2.0	0.5*	2.6	0.9	1.5
18:2/20:1/26:2	2.0*	1.4	0.6	2.5	1.2	1.6
18:2/20:1/26:1	2.3*	1.8	0.5*	2.5	1.0	1.6
18:1/22:1/24:0	2.0*	1.9	0.4*	2.2	0.8	1.3
18:2/24:1/24:1	2.1*	1.8	0.5*	2.5	0.9	1.5

^aFold คืออัตราส่วนของค่า MSII เฉลี่ย ที่พบในตัวอย่างกลุ่ม ovx เทียบกับค่า MSII เฉลี่ยในตัวอย่างกลุ่มต่างๆ หรือกลับกัน (ตัวเอียง)

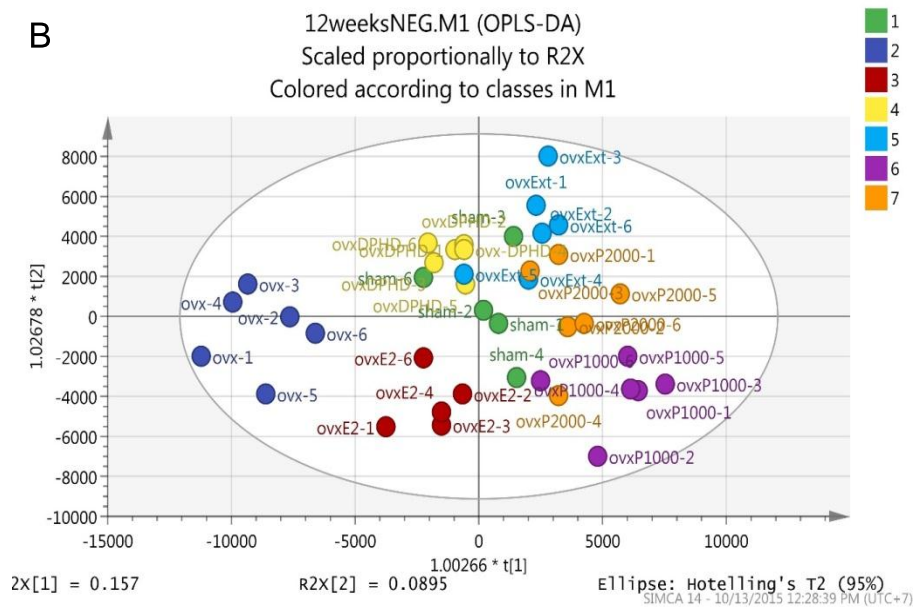
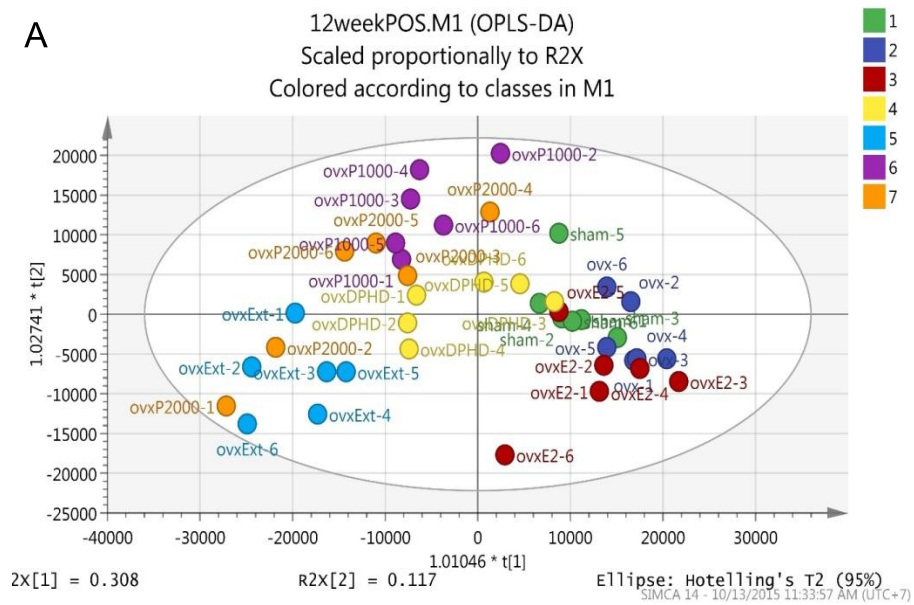
^bStudent's t-test: *, p < 0.05; †, p < 0.01; ‡, p < 0.005; §, p < 0.001; N = 5-6.

การวิเคราะห์ข้อมูลแบบพหุตัวแปร (multivariate data analysis)

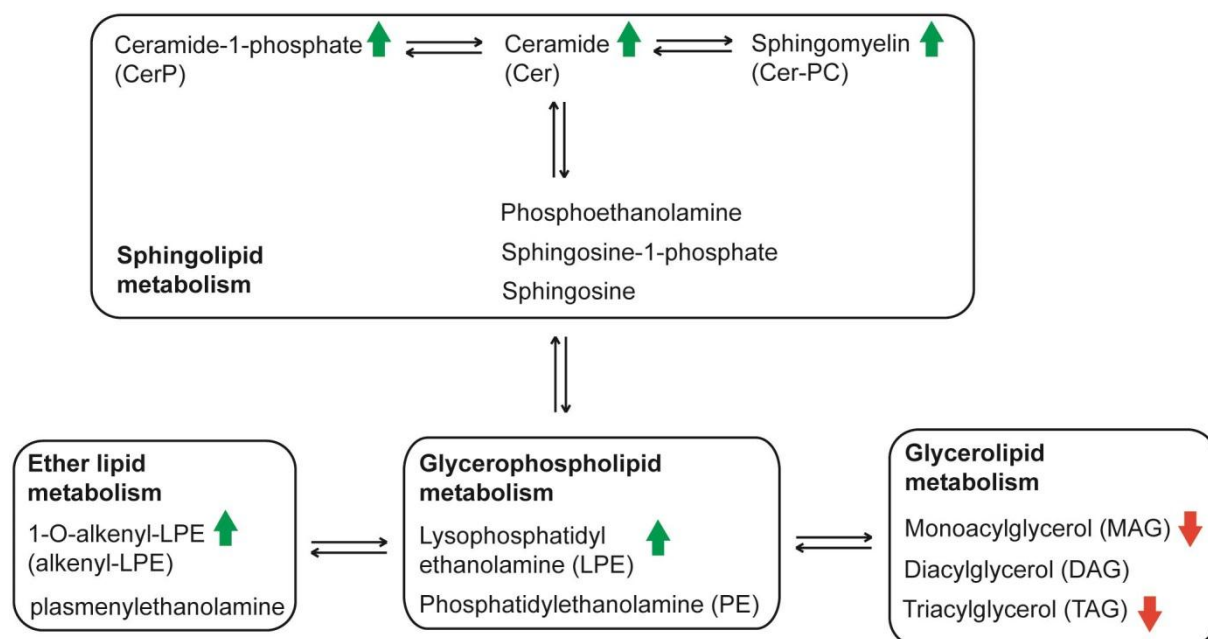
ทีมวิจัยทำการวิเคราะห์ข้อมูลแบบพหุตัวแปร เพื่อตรวจสอบการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างกลุ่มต่างๆ ในที่นี้ ทีมวิจัยได้ทำการหา score plot ของข้อมูลไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย MS ทั้งในข้อบวกและข้อลบด้วยวิธี OPLS-DA (รูปที่ 18)

สำหรับข้อมูลที่ได้จากข้อบวก การจัดกลุ่มของข้อมูลบน score plot ไม่สามารถใช้ในการระบุความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกลุ่ม ovx กับกลุ่ม sham ได้ ในขณะเดียวกัน การให้สาร E_2 หรือ DPHD ก็ไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมากนัก แต่ถ้าสังเกตผลจากการให้สารผสมจากว่านชักมดลูก ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดหรือผงว่าน จะสามารถเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงเมทาโบไลต์ค่อนข้างมากจากกลุ่ม ovx และ sham จนทำให้ตัวอย่างจากกลุ่มเหล่านี้มีการแยกกลุ่มออกมาอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่ว่าการเปลี่ยนแปลงของลิพิดในซีรัมของหนูกลุ่มนี้เป็นผลมาจากสารอื่นในสารผสมจากว่านชักมดลูกที่ไม่ใช่ DPHD

สำหรับข้อมูลที่ได้จากข้อลบ พบว่าข้อมูลนี้สามารถจำแนกตัวอย่างกลุ่ม ovx ออกจากกลุ่ม sham ได้เป็นอย่างดีบน score plot ของวิธี OPLS-DA ดังนั้นจึงอาจใช้ข้อมูลจากข้อลบนี้ในการประเมินผลการรักษาด้วยสารต่างๆ ได้ โดยดูว่าข้อมูลจากตัวอย่างแต่ละกลุ่มอยู่ใกล้กลุ่ม ovx ซึ่งเป็นสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือกลุ่ม sham ซึ่งเป็นสภาวะปกติมากกว่ากัน ซึ่งในส่วนนี้พบว่า การให้สาร E_2 กับหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมทาโบไลต์มากพอที่จะทำให้ข้อมูลกลุ่ม ovx+ E_2 เคลื่อนไปอยู่ระหว่างข้อมูลกลุ่ม ovx และกลุ่ม sham แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงไขมันบางส่วนจากการรักษาด้วย E_2 ส่วนการรักษาด้วยสาร DPHD หรือสารผสมจากว่านชักมดลูก พบว่าข้อมูลจากทุกกลุ่มอยู่ทางด้านขวาของพล็อต ซึ่งใกล้เคียงกับข้อมูลจากกลุ่ม sham และห่างออกไปจากข้อมูลจากกลุ่ม ovx หมายความว่า สาร DPHD หรือสารผสมจากว่านชักมดลูกสามารถเปลี่ยนแปลงระดับของไขมันได้จนทำให้ลิพิดของหนู ovx เข้าใกล้กับสภาวะปกติมากขึ้น ซึ่งสนับสนุนผลการทดลองการเปรียบเทียบระดับของไขมันกลุ่มต่างๆ ดังแสดงด้านบนในตารางที่ 6 สุดท้าย ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ นี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการใช้วิธีการลิพิดอมิกส์แบบไม่มีเป้าหมายเพื่อประเมินผลการรักษาของสารสกัดหรือผลว่านชักมดลูกได้ ซึ่งก็สามารถขยายผลไปถึงการประเมินผลการรักษาด้วยสมุนไพรในอนาคตได้อีกด้วย



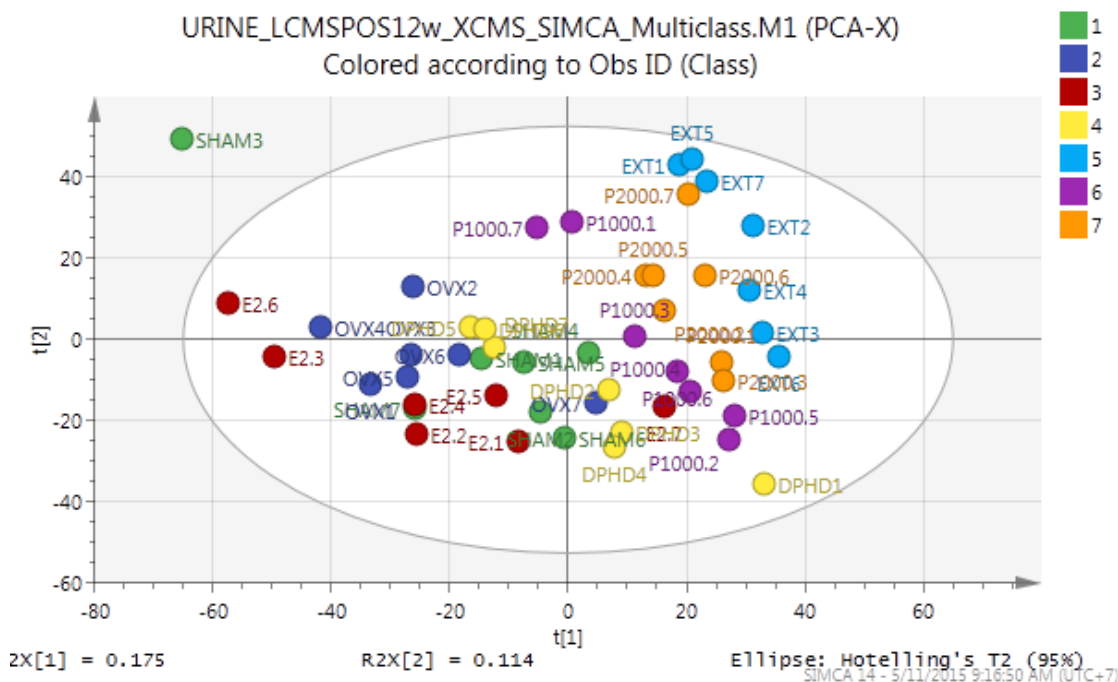
รูปที่ 18. Score plot ของวิธี OPLS-DA จากข้อมูลการวิเคราะห์ไขมันด้วย LC-MS ใน (A) ขั้วบวก และ (B) ขั้วลบ



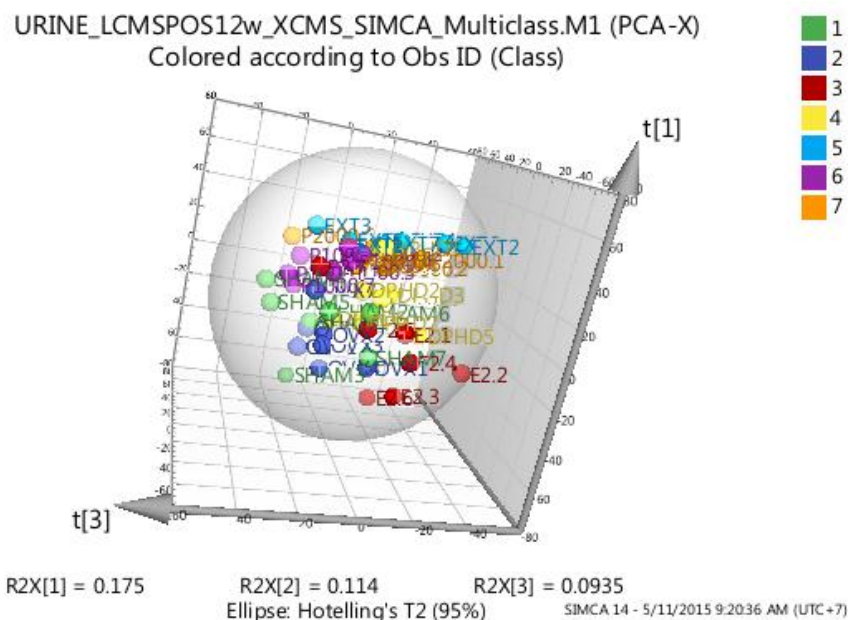
รูปที่ 19. กระบวนการสร้างและสลายไขมันของ sphingolipid, ether lipid, glycerophospholipid และ glycerolipid ลูกศรระบุไขมันที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น (ลูกศรชี้ขึ้น) หรือลดลง (ลูกศรชี้ลง) ในตัวอย่างกลุ่ม ovx เมื่อเทียบกับ sham

4.6. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ในปัสสาวะ

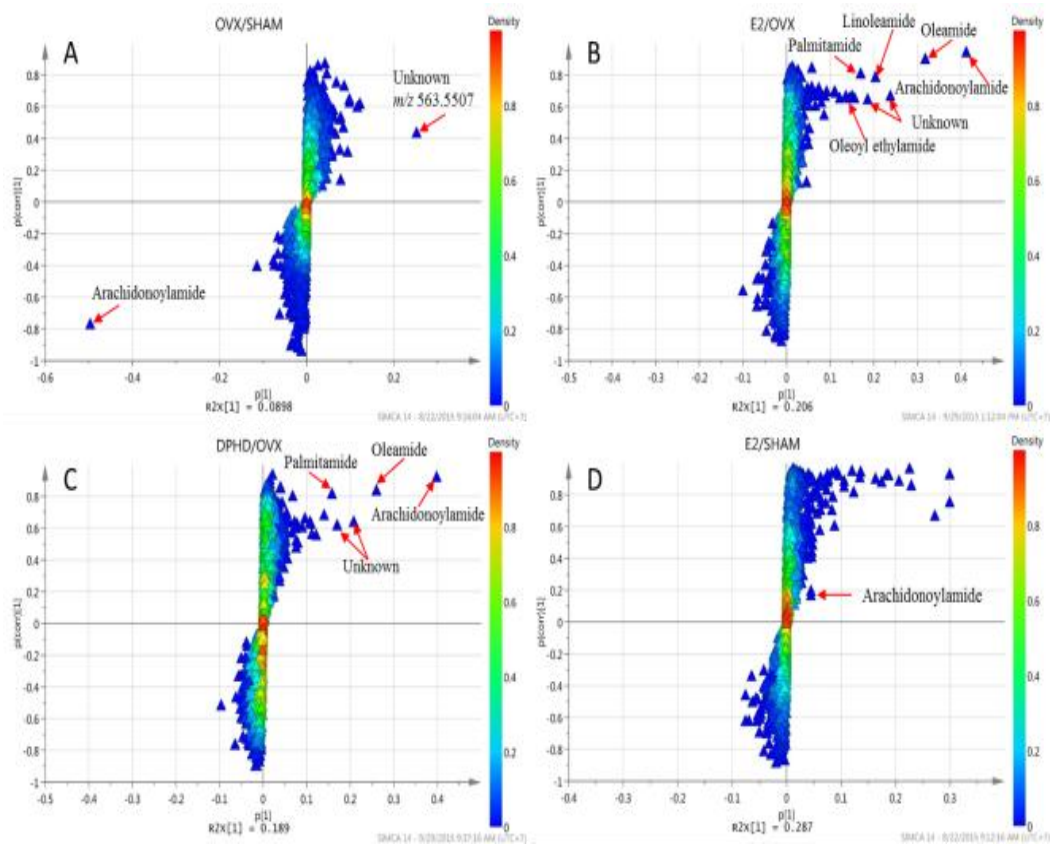
ปัสสาวะของหนูทุกกลุ่มทดลองเก็บข้ามคืน โดยใช้ metabolic cage 1 คืน ก่อนทำการการฉาหนู โดยได้งดอาหารแต่ได้รับน้ำอย่างอิสระระหว่างการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเทคนิค LC-MS และทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม XCMS เพื่อทำการ Normalize ข้อมูล LC-MS ตามขั้นตอนข้อ 2.2.5 แล้ว นำข้อมูลที่อยู่ในรูปแบบ spreadsheet (.csv file) วิเคราะห์การแยกกลุ่ม (Classification) โดยโปรแกรม SIMCA 14 (Umetrics, Sweden) เพื่อประเมินผลของการรักษาภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยใช้ตัวอย่างแบบ non-invasive biological fluid พบว่าการแยกกลุ่มของกลุ่มที่ให้สารต่าง ๆ มีการแยกของกลุ่มหนูควบคุมปกติ (SHAM) กับหนูควบคุมที่ตัดรังไข่ (OVX) ยังไม่ชัดเจน โดยยังมีหนูปกติบางตัวมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับหนูตัดรังไข่และมีหนูตัดรังไข่บางตัวเข้ากลุ่มกับหนูปกติ และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (E2) และกลุ่มที่ได้รับสารจากว่านชักมดลูก (DPHD, EXT, P1000 และ P2000) ซึ่งมีการซ้อนทับของข้อมูลกันในบางส่วน ภาพที่ 20 และ 21 แสดงให้เห็นถึงการแยกกันของกลุ่มหนูปกติกับหนูตัดรังไข่ ที่มีการแยกออกจากกันไม่ชัดเจนและมีการกระจายของข้อมูลมาก ซึ่งอาจจะเป็นข้อบ่งชี้ให้เห็นว่าปัสสาวะเป็นตัวอย่างที่มีความแปรปรวนค่อนข้างมากและเกือบจะไม่มี ความแตกต่างของสารเมตาบอไลต์ระหว่างหนูปกติกับหนูตัดรังไข่ อาจจะไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการบ่งชี้ผลของการรักษาภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่อย่างไรก็ตาม ผลจาก S-plot ของ OPLS-DA model พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารเมตาบอไลต์ประเภท fatty amide คือ arachidonoylamide ซึ่งเป็น amine ของ arachidonic acid พบว่าลดลงในหนูตัดรังไข่ และเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับการรักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารจากว่านชักมดลูก



รูปที่ 20. Principle component analysis (PCA) score scatter plot แสดงถึง metabolites ที่ได้จากปัสสาวะหนู PCA-X เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูปกติ (SHAM) หนูควบคุมตัดรังไข่ (OVX) และหนูที่ให้สารฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารต่างๆ จากवानชักมดลูก (E2, DPHD, EXT, P1000 และ P2000)



รูปที่ 21. Principle component analysis of raw data (PCA-X) scatter 3D plot แสดงถึง metabolites ที่ได้จากปัสสาวะหนู เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูปกติ (SHAM) หนูควบคุมตัดรังไข่ (OVX) และหนูที่ให้สารฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารต่างๆ จากวานชักมดลูก (E2, DPHD, EXT, P1000 และ P2000) พบว่ามีความแตกต่างของ metabolites แยกตัวของกลุ่มต่างๆ และมีการซ้อนทับกันของข้อมูลบางส่วน

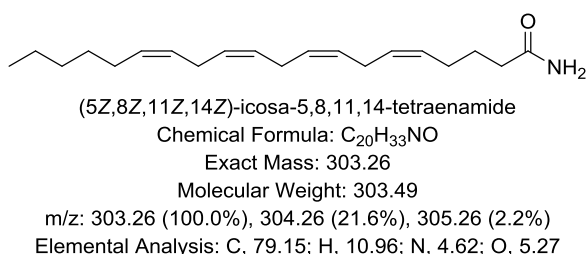
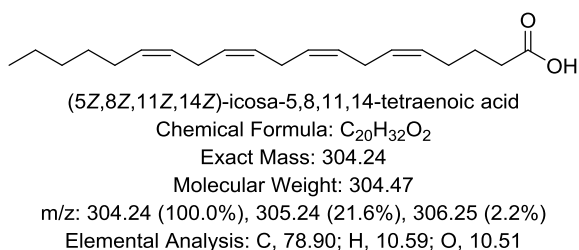


รูปที่ 22. S-plot แสดงให้เห็น Feature ID ของ ions ต่างๆ ของสารเมทาบอลิไทน์ในปัสสาวะของหนู โดยการวิเคราะห์ด้วย LC-MS (a) เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลิไทน์ระหว่างหนูตัดรังไข่กับหนูปกติ (b) หนูตัดรังไข่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนกับหนูตัดรังไข่ควบคุม (c) หนูตัดรังไข่ได้รับสาร DPHD กับหนูตัดรังไข่ควบคุม และ (d) หนูตัดรังไข่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนกับหนูปกติ โดยที่จุดสามเหลี่ยมที่อยู่บนมุมขวาบนเป็นสารเมทาบอลิไทน์ที่เพิ่มขึ้น และจุดสามเหลี่ยมที่อยู่บนมุมล่างซ้ายเป็นสารเมทาบอลิไทน์ที่ลดลง

ตารางที่ 6 แสดงความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสาร fatty amide โดยวิธี LC-MS

Metabolite Name	Ion	R.T(min)	Fold Change			
			OVX/SHAM	E2/OVX	DPHD/OVX	EXT/OVX
Arachidonoylamide	304.2613	20.23	0.5**	2.2**	2.0**	2.1**
Linoleamide	280.2637	18.99	0.6	1.5**	0.9	1.4*
Oleoyl ethylamide	310.3104	22.51	0.9	1.3*	1.2*	1.2
Palmitamide	256.2641	19.59	0.9	1.2**	1.2**	1.2*
Oleamide	282.2800	20.08	0.6	1.3**	1.2**	1.3**

ค่าที่แสดงเป็น Mean $\pm$ SEM, * P < 0.05; ** P < 0.01



รูปที่ 23. แสดงโครงสร้างทางเคมีของ arachidonic acid (บน) และ arachidonoylamide (ล่าง)
 ภาพสร้างจากโปรแกรม ChemBioDraw Ultra14

6. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในการแพทย์แผนไทยมีการใช้สมุนไพรไทยหลากหลายชนิดในการรักษา โดยในตำรับยาสมุนไพรแต่ละตำรับที่นำมาใช้ อาจประกอบด้วยสมุนไพรมากกว่า 10 ชนิด ถึงแม้ว่าตำรับยาเหล่านั้นจะให้ได้ผลในทางการแพทย์แผนไทยก็ตาม แต่ด้วยตำรับยาประกอบด้วยสารหลายชนิด ขาดมาตรฐานในการทำตำรับ การวัดประสิทธิผลของตำรับและสารในตำรับเป็นไปได้ยากในทางวิทยาศาสตร์ ไม่สามารถจะบอกถึงกลไกการทำงาน การจะประเมินผลที่ชัดเจนของการรักษาด้วยตำรับสมุนไพรไทยที่ซับซ้อนเหล่านั้นได้ หลายประเทศได้มีนวัตกรรมการที่ประเมินผลในภาพรวมมาใช้วิเคราะห์ผลของการรักษาสมุนไพร มากกว่าการประเมินฤทธิ์ของสารแต่ละชนิดต่อระบบการทำงานแต่ละระบบแยกกัน ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้ประยุกต์ใช้วิธี metabolomics รวมถึง lipidomics (ลิพิดโอมิกส์) ในการตรวจวัดติดตามความเปลี่ยนแปลงของเมทาโบไลต์ประเภทไขมันในซีรัมของหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกไป และเมื่อมีการรักษาด้วยสมุนไพรว่านชักมดลูก เนื่องจากการวิจัยถึงฤทธิ์ของสมุนไพรว่านชักมดลูกก่อนหน้านี้ สาร Diarrylheptanoid ที่พบในว่านชักมดลูกสามารถออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำสารและสารสกัดจากว่านชักมดลูกมาทำการศึกษาผลต่อภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการนำร่อง การวิจัยที่นำวิธีการชีววิทยาระบบ (systems biology) มาเป็นเครื่องมือในการศึกษา

ในการศึกษาที่ใช้แบบจำลองของพยาธิสภาพในสัตว์ทดลองเหมือนการวิจัยก่อนหน้านี้ ใช้หนูสายพันธุ์เดียวกับทั้งอายุและน้ำหนักที่ใกล้เคียงกัน เพื่อให้เทียบเคียงอ้างอิงผลได้ การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ endogenous metabolite ในซีรัมและปัสสาวะของหนูที่จำลองภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยการตัดรังไข่หนูเพศเมีย 3 เดือน ภายหลังจากการตัดรังไข่ทำให้หนูมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณไขมันสะสมใต้ผิวหนังในปริมาณมาก มีภาวะกระดูกพร่องบาง สารจากว่านชักมดลูกทั้งสารสกัดเอทานอลและผงว่านชักมดลูก ทำให้ค่า BMD ของกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ที่ลดลงในหนูตัดรังไข่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับหนูปกติ แต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) โดยที่สารสกัดเอทานอลของว่านชักมดลูก ให้ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่ามวลกระดูกชัดเจนกว่าสาร DPHD และผงว่านชักมดลูก การศึกษาผลต่อค่าทางชีวเคมีโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ค่าเอนไซม์ AST, ALT และผลทางโลหิตวิทยาอยู่ในระดับปกติ แสดงว่าสารจากว่านชักมดลูกไม่มีพิษต่อตับและการเปลี่ยนแปลงของระบบโลหิต

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาโบไลต์ที่เป็นผลกระทบมาจากการตัดรังไข่ในหนู ด้วยการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ 2 ชนิดคือ LC-MS เพื่อทำการตรวจวัดสารเมทาโบไลต์แบบไม่เจาะจงชนิดของสาร (non-targeted) และใช้ GC-MS เพื่อทำการตรวจวัดสารเมทาโบไลต์ที่ทราบ (targeted) เพิ่มเติมจากส่วนที่อาจจะขาดหายไปจากการศึกษาแบบ non-targeted method การเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ในเลือดหลังการตัดรังไข่ 6 สัปดาห์ ไม่ชัดเจน การเปลี่ยนแปลงพบได้ชัดเจนที่เวลา 12 สัปดาห์หลังจากตัดรังไข่ ผลการวิจัยนี้เป็นประเด็นที่สำคัญของงานวิจัยนี้ โดยจะใช้เป็น disease model

ในการวิจัยต่อไป โดยสรุปคือการตัดรังไข่ 12 สัปดาห์ หรือ 3 เดือนนานพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ในร่างกาย ที่ชัดเจน ส่งผลและทำให้สาร metabolite ในกระแสเลือดมีการเปลี่ยนแปลง เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารกลุ่มต่างๆเป็นจำนวนมาก เช่น สารไขมันพวก fatty acids, phosphatidyl cholines, lysophosphatidylcholines และ amino acids และสารอื่น พบว่า amino acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโปรตีนต่างๆในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นในหนูตัดรังไข่ โดยเฉพาะ Serine ที่เพิ่มขึ้น 2.1 เท่าจากหนูปกติ นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงของ amino acid ชนิดอื่นอีก อาทิเช่น tyrosine, alanine, phenylalanine, tryptophan, serine และ threonine เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าทำให้สารฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้ amino acids ในเลือดเพิ่มขึ้น เช่น alanine, proline และ glycine ที่เพิ่มขึ้นจากหนูปกติเป็น 3.7, 3.3 และ 2.6 เท่า ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเกิดจากฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระบวนการย่อยสลายโปรตีน (protein catabolism) เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อไป (Obayashi M. et al., 2004) หรืออาจเกิดจากการที่เซลล์ลดการนำสารเมทาบอลไลท์เหล่านี้ไปใช้งาน อย่างไรก็ตามในกลุ่มหนูที่ได้รับสารจากว่านชักมดลูกช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของ amino acids ได้ดีกว่าฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งสารสกัดเอทานอลและผงว่านชักมดลูกสามารถช่วยรักษาระดับของ amino acids ให้อยู่ระดับเดียวกับหนูปกติมากกว่าสาร DPHD ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับ amino acid metabolism อย่าง glycine, serine และ threonine metabolism และมีความเกี่ยวข้องกับการ lipid metabolism (Wang X. et al., 2014) นอกจาก amino acids แล้ว การเปลี่ยนแปลงของ primary metabolite ที่เกี่ยวข้องกับ fatty acid metabolism ได้แก่ linoleic acid, stearic acid, และ palmitic acid มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกับ amino acids กล่าวคือมีระดับที่สูงขึ้นในหนูที่ตัดรังไข่ ไม่สามารถรักษาให้เป็นปกติได้ด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่สามารถรักษาได้สารจากว่านชักมดลูก การเปลี่ยนแปลงนี้คาดว่าจะส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการของ lipid metabolism (Phospholipids) ผ่าน intermediate ที่สำคัญอย่าง acyl-CoA และ glycerol ซึ่งก็พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของ phospholipids ในกลุ่ม phosphatidylcholine (PC) และ lysophosphatidylcholine (LysoPC) หลายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LysoPC(18:0) โดยที่การเปลี่ยนแปลงของ lipids กลุ่มนี้ในหนูตัดรังไข่ ไม่สามารถรักษาได้ด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่สามารถรักษาได้ด้วยสารจากว่านชักมดลูก ทั้ง สาร DPHD สารสกัดเอทานอลและผงว่านชักมดลูก

จากการเปลี่ยนแปลงของสาร metabolites ที่เกี่ยวข้องกับ fatty acid และ lipid metabolism ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในระดับโมเลกุลแล้ว ยังไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลท์ดังกล่าวกับฤทธิ์ของสารจากว่านชักมดลูก และฮอร์โมนเอสโตรเจน ในการรักษาภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ เนื่องจากในการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า สาร Diarylheptanoid จากว่านชักมดลูกสามารถออกฤทธิ์ estrogenic effect ได้โดยผ่าน estrogen receptor (Winuthayanon W. et al., 2009) ดังนั้น ผลของสารจากว่านชักมดลูก จึงน่าจะมีส่วนที่คล้ายกับผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนในการ

รักษาภาวะกระดูกโปรงบาง และภาวะไขมันในเลือดสูง พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ cholesterol, glucose, glycerol และ arachidonic acid หลังจากได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารจากवानชักมดลูก มีการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ในกลุ่มการทดสอบต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับของ cholesterol ที่เพิ่มขึ้นในหนูตัวผู้สามารถป้องกันได้ด้วยสารจากวานชักมดลูก ยังพบว่า arachidonic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสร้างสารกลุ่ม eicosanoid ในเซลล์ ทำหน้าที่เป็นได้ทั้ง mediators และ regulators ในหลาย cellular process เช่น การแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกาะตัวของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) การยืดหดของกล้ามเนื้อ (smooth muscle contraction) การสร้าง inflammatory cytokine และระบบภูมิคุ้มกัน (immune function) ในงานวิจัยโดยใช้วิธีเมทาบอลิซึม เพื่อศึกษาผลของภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนเพื่อจำลองภาวะกระดูกโปรงบาง พบระดับของ arachidonic acid เพิ่มขึ้นในหนูตัวผู้ (Ma, et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ ในส่วนของฤทธิ์ต่อเซลล์กระดูก มีรายงานว่า arachidonic acid สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์กระดูก MC3T3-E1 ซึ่งเป็น osteoblastic cell โดยทำงานผ่าน cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) dependent pathway (Yoshida K. et al., 2007) ซึ่ง cPLA2 เป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่สร้าง arachidonic acid จาก phospholipid stores ในเซลล์ MC3T3-E1 (Leis HJ. et al., 2015) จากการศึกษาการให้สาร arachidonic acid ปริมาณสูงในอาหาร พบว่า arachidonic acid ทำให้กระบวนการสร้างและสลายกระดูกของ dermal skeleton ในสัตว์ทดลองเพิ่มมากขึ้น โดยการเพิ่ม matrix resorption ในระดับ ontogenetic scale (de Vrieze E., 2014)

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า Prostaglandin E2 (PGE2) สาร secondary metabolite ที่ถูกสร้างมาจาก arachidonic acid โดยเอนไซม์ cyclooxygenase 2 (COX-2) สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างและสลายกระดูกได้ (Yoshida K. et al., 2002) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ สามารถที่จะสรุปได้ว่า arachidonic acid และ cholesterol เป็น endogenous metabolite ที่เกิดจากภาวะการพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งอาจนำไปใช้เป็น biomarker สำหรับการเกิดโรคในสตรีวัยหมดประจำเดือนหรือสตรีที่มีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน รวมถึงการใช้เป็น biomarker สำหรับการรักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน และสารจากพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ estrogenic effect ได้

คณะวิจัยได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารไขมันต่างๆ โดยใช้วิธีลิปิดมิกส์แบบไม่มีเป้าหมาย ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระดับของไขมันหลายชนิดในเวลาเดียวกัน ทั้งที่ทราบโครงสร้างและไม่ทราบโครงสร้าง โดยไม่มีความเจาะจง วิธีการนี้มีประโยชน์มากต่อการค้นหากลไกการทำงานของระบบทางชีววิทยาแบบใหม่ๆ (Saghatelian, Trauger et al. 2004) ในงานวิจัยนี้ การวิเคราะห์ด้วยวิธีลิปิดมิกส์แบบไม่มีเป้าหมาย ทำให้พบกลุ่มไขมันที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มหนูตัวผู้เมื่อเทียบกับหนูปกติ จำนวน 5 กลุ่มไขมัน ซึ่งอยู่ในกระบวนการสร้างและสลายไขมัน (lipid metabolism) 3 วิธีด้วยกัน ได้แก่ ether lipid (alkenyl-LPE), glycerophospholipids (LPE) และ sphingolipids (CerP, Cer และ

Cer-PC) และไขมันที่มีปริมาณลดลง 2 กลุ่ม ซึ่งอยู่ในเมแทบอลิซึมของ glycerolipids (MAG และ TAG) (รูปที่ 19) ตามฐานข้อมูลใน KEGG pathway (Ogata, Goto et al. 1999) ไขมันเหล่านี้มีความเชื่อมโยงต่อกัน ในเมแทบอลิซึมของ sphingolipid Cer เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ CerP และ Cer-PC โดยมี ceramide kinase และ sphingomyelin synthase เป็นตัวเร่ง ตามลำดับ ในขณะเดียวกัน Cer เชื่อมโยงกับ LPE ในเมแทบอลิซึมของ glycerophospholipid โดยมี sphingosine, sphingosine-1-phosphate และ phosphoethanolamine คณะวิจัยพบว่าสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนไม่มีผลต่อระดับของ sphingosine ในซีรัมหนู โดยสาร sphingosine-1-phosphate นั้นมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะตรวจพบได้ ส่วน phosphoethanolamine ยังไม่มีรายงานใดๆ กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงมาก่อน และส่วนสุดท้าย LPE เองสามารถแปลงเป็น alkenyl LPE ในเส้นทาง ether lipid หรือ MAG, TAG ในเส้นทาง glycerolipid ได้เช่นกัน

การที่ Cer และสฟริงโกลิปิดอื่นๆ มีระดับเพิ่มสูงขึ้นในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนนั้น อาจไม่เป็นที่น่าแปลกใจนัก ด้วย Cer เป็นสารสื่อสัญญาณ (signaling molecule) ที่ทำให้เกิดสมดุลของระบบเมแทบอลิซึมและสารอาหารในเซลล์ (Yuyama, Mitsutake et al. 2014) การที่มี Cer เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์ลดการดูดซึมสารอาหารหลัก 3 ชนิด (กลูโคส กรดไขมัน และกรดอะมิโน) โดยการลดการสังเคราะห์สารเหล่านี้ รวมถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งเมทาโบไลต์เหล่านี้เข้าสู่เซลล์ลง เช่น การลดการสังเคราะห์ glucose transporter 4 (GLUT4), fatty acid translocase (CD36) และ amino acid transporter 2 (SNAT2) เป็นต้น การยับยั้งการดูดซึมสารอาหารดังกล่าว จะทำให้สารเหล่านี้มีระดับเพิ่มสูงขึ้นในซีรัม ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองที่พบในหนูตัวเต็มวัยที่มีรายงานมา (Ma, Zhang et al. 2011, Manolagas, O'Brien et al. 2013) นอกจากนี้ การที่เซลล์ขาดสารอาหารยังทำให้เซลล์ตาย ซึ่งเป็นการเชื่อมโยงหน้าที่ของ Cer ในการควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์เข้ากับอีกหน้าที่หนึ่งในการควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และกับโรคต่างๆ เช่น โรคอ้วน เบาหวาน หัวใจ อัลไซเมอร์ และมะเร็ง (Snyder, Lee et al. 1997, Chaurasia and Summers 2015) ซึ่งมีระดับของ Cer เพิ่มขึ้นเช่นกัน

ในลักษณะเดียวกัน การเพิ่มขึ้นของ alkenyl-LPE ก็เชื่อมโยงกับสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนผ่าน platelet-activating factor (PAF; 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) alkenyl-LPE เป็นสารที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ PAF โดยช่วยรับไซ arachidonyl มาจาก 1-alkyl-2-acylglycero phosphocholine ทำให้ได้ 1-alkyl-sn- glycero-3-phosphocholine (lyso PAF) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PAF (Snyder, Lee et al. 1997) PAF ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ เช่น การกระตุ้นเกล็ดเลือด และความดัน ผ่านตัวรับ PAF ที่จับกับจี-โปรตีน (G-protein) ตัวรับ PAF นี้เองที่เป็นจุดเชื่อมโยงระหว่าง PAF, สภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน และโรคกระดูกพรุน เพราะมีการแสดงก่อนหน้านี้นี้ว่าการละลายของกระดูก (bone resorption) ลดลงเป็นอย่างมากในหนูที่ไม่มีตัวรับ PAF ที่

ได้รับการตัดรังไข่(Hikiji, Ishii et al. 2004) การที่ทีมวิจัยของเราพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ alkenyl-LPE ในตัวอย่างจากหนูที่ได้รับการตัดรังไข่เป็นการช่วยสนับสนุนการเชื่อมโยงนี้

สำหรับระดับของ LPE ที่เพิ่มขึ้น Park และคณะ(Park, Lee et al. 2013) ได้แสดงให้เห็นว่า LPE สามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น Ca^{2+} ภายในเซลล์ MDA-MB-231 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านม โดยกระตุ้นผ่านตัวรับ LPA_1 และ CD97 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย้ายที่และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การทดลองให้สาร E_2 ในเซลล์ชนิดเดียวกันนี้ที่มีการแสดงออกของตัวรับ $ER\alpha$ ทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์(Moggs, Murphy et al. 2005) จากข้อมูลทั้งหมดนี้ สรุปได้ว่า E_2 และ LPE ส่งผลตรงกันข้ามกันต่อเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 ซึ่งก็ตรงกับผลการทดลองลิปิโดมิกส์ของเราที่พบ LPE มีปริมาณเพิ่มขึ้นในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนของตัวอย่าง ovx

หนึ่งในข้อขัดแย้งที่พบระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้กับข้อมูลในงานวิจัยก่อนหน้านี้คือ ระดับของ TAG ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ Ma และคณะ(Ma, Zhang et al. 2011) ใช้ชุดอุปกรณ์พาณิชย์เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของ TAG ในซีรัมของหนู ovx และพบว่า TAG มีปริมาณเพิ่มขึ้น 1.3 เท่าเมื่อเทียบกับปริมาณใน sham ในขณะที่การวัดค่า TAG โดยใช้วิธีลิปิโดมิกส์ด้วย LC-MS นั้น ทางทีมวิจัยกลับพบปริมาณที่ลดลงของ TAG ซึ่งลดลง 2.0-2.4 เท่าในซีรัมของหนูที่อยู่ในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (ตารางที่ 5) หลังจากทางทีมวิจัยได้ตรวจสอบรายละเอียดของการทดลองอีกครั้ง ทีมวิจัยสันนิษฐานว่าผลการทดลองที่ต่างกันครั้งนี้อาจมีผลมาจากตัวแปรต่างๆ ดังนี้ (ก) เวลาเก็บซีรัมหลังการผ่าตัด (ณ สัปดาห์ที่ 6 ในรายงานก่อนหน้านี้ เทียบกับสัปดาห์ที่ 12 ในรายงานนี้) (ข) การกระทำกับสัตว์ และ (ค) ปริมาณ TAG ที่วัด (ปริมาณ TAG รวมในรายงานก่อนหน้านี้ เทียบกับปริมาณ TAG แต่ละชนิดในรายงานนี้) การจะตัดสินว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อความแตกต่างของปริมาณ TAG อย่างไรคงต้องทำการค้นหาต่อไป อย่างไรก็ตาม นอกจากงานวิจัยที่พูดถึงแล้ว ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่วัดปริมาณ TAG ในซีรัมของหนู ovx ณ เวลาต่างๆ หลังการผ่าตัดและพบว่า ระดับของ TAG รวมไม่มีความแตกต่างกับระดับใน sham อีกด้วย(Black, Sato et al. 1994, Armamento-Villareal, Sheikh et al. 2005, Martins-Maciel, Campos et al. 2013) ทำให้เป็นไปได้ว่า สภาพแวดล้อมและการกระทำต่อสัตว์อาจมีผลต่อปริมาณ TAG ที่พบในหนู ovx ได้

E_2 เป็นเอสโตรเจนหลักที่หลังจากรังไข่ การให้สาร E_2 แก่หนูกลุ่ม ovx จึงควรช่วยทำให้ระดับของไขมันที่มีการเปลี่ยนแปลงกลับคืนสู่ระดับปกติที่พบในหนูกลุ่ม sham อย่างไรก็ดี ในการทดลองของ ทีมวิจัย พบว่า การให้สาร E_2 ส่งผลต่อระดับของ Cer เท่านั้น ซึ่งเป็นไปได้อย่างยิ่งว่า การเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลต่อการจำแนกกลุ่มบน score plot ของวิธี OPLS-DA สำหรับข้อมูลชั่วลบ ซึ่งข้อมูลจากกลุ่ม ovx+ E_2 อยู่รวมกันระหว่างกลุ่ม ovx กับกลุ่ม sham ถึงแม้ว่าผลการทดลองจะไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ แต่มันตรงกับผลการทดลองในรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ต่อระดับของ TAG เมื่อให้สาร E_2 แก่หนูกลุ่ม ovx(Black, Sato et al. 1994) เนื่องจากรังไข่หลังฮอร์โมนชนิดอื่น

นอกเหนือจาก E₂ ด้วย เช่น estrone ข้อมูลจากการทดลองบ่งชี้ว่า ระดับของไขมันที่เกี่ยวข้องกับสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจอยู่ภายใต้การควบคุมของสัญญาณจากฮอร์โมนชนิดอื่นได้

ผลที่ได้จากलिपीโดมิคส์แสดงให้เห็นว่าหนู ovx ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสารสกัดหรือผงว่านชักมดลูกดีกว่าการรักษาด้วยสาร DPHD บริสุทธิ์เล็กน้อย เนื่องจากผลของยาไม่ได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นด้วย ทางทีมนักวิจัยจึงได้ทำการหาปริมาณ DPHD ในสารสกัดหรือผงว่านชักมดลูกที่ใช้ด้วย ผลปรากฏว่า ถ้าต้องการให้ได้ปริมาณ DPHD เท่ากับที่ใช้ในการให้สารบริสุทธิ์ DPHD คือ 50 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. เราจะต้องให้สารสกัดว่านชักมดลูกแก่หนู ovx 500 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. หรือให้ผงว่านชักมดลูก 2000 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. ซึ่งเท่ากับที่ให้กับหนูกลุ่ม ovx+Ext หรือ ovx+P2000 ตามลำดับ ผลต่อไขมันที่วัดได้ดีขึ้นเล็กน้อยจึงอาจมาจากการที่สารสกัดหรือผงว่านชักมดลูกมีสาร phytoestrogen อื่นๆ ด้วย เช่น (E)-1,7- diphenylhept-6-en-3-one และ (1E,3E,5E)-hepta-1,3,5-triene-1,7-diylidibenzene(Suksamrarn, Ponglikitmongkol et al. 2008) ซึ่งคงมีส่วนช่วยเสริมประสิทธิภาพของมัน อย่างไรก็ตาม ทางทีมนักวิจัยพบว่า การให้สารสกัดว่านชักมดลูกที่มีปริมาณ DPHD เพียงครึ่งหนึ่งของสาร DPHD บริสุทธิ์ที่ให้ ดังเช่นในกลุ่ม ovx+P1000 ก็ให้ประสิทธิผลในการทำให้ปริมาณไขมันในซีรัมของหนู ovx ใกล้เคียงกับหนูในสภาวะปกติดีกว่าการให้สารบริสุทธิ์เช่นกัน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ผลที่สังเกตได้อาจไม่ได้มาจากผลรวมของฤทธิ์ของสาร phytoestrogen ต่างๆ เท่านั้น แต่อาจจะมาจาก synergistic effect จากสารต่างๆ ในสารสกัดว่านชักมดลูกด้วย

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเป็นแปลงของ endogenous metabolite ในซีรัมและปัสสาวะของหนูที่จำลองภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยการตัดรังไข่ นั้น มีการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลท์ให้เห็นชัดเจนหลังจากตัดรังไข่นาน 3 เดือนหรือ 12 สัปดาห์ พบมีการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลท์หลายกลุ่ม ได้แก่ amino acids, fatty acids, organic acids, lipids, phospholipids และ primary metabolites และ intermediate เป็นต้น โดยที่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ในสภาวะพร่องของฮอร์โมนเอสโตรเจน การให้สารจากว่านชักมดลูก ให้ผลที่มีทั้งส่วนที่คล้ายและแตกต่างจากผลการรักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยที่สารสกัดเอทานอลและผงว่านจะให้ผลที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สาร DPHD มีแนวโน้มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลท์ในซีรัมคล้ายกับสารมาตรฐานเอสโตรเจน ได้พบการเปลี่ยนแปลงของสารเมทาบอลไลท์ที่อาจเป็น biomarker ที่สำคัญต่อภาวะกระดูกโปร่งบางและภาวะไขมันในเลือดสูงนั้น ได้แก่สาร arachidonic acid และไขมันประเภท phospholipid ได้แก่ phosphatidylcholine (PC) และ lysophosphatidylcholine (lysoPC) ที่เพิ่มขึ้นในหนูตัดรังไข่ และสามารถป้องกันได้ด้วยสารจากว่านชักมดลูก และฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการหาความสัมพันธ์ใน metabolic pathway ของสารเมทาบอลไลท์ที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว พบว่ามีความเกี่ยวข้องกันเชิงระบบ คือ การเปลี่ยนแปลงของไขมัน lysophosphatidylcholine ผ่าน phosphatidyl

ethanolamine (PE) และการเปลี่ยนแปลงของไขมัน phosphatidylcholine (PC) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ linoleic acid metabolism ซึ่งเป็นกระบวนการที่จะนำไปสู่การสร้าง arachidonic acid ซึ่งเป็น biomarker ที่สำคัญที่พบในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งคาดว่าจะมีผลต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูกในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและอาจนำไปใช้เป็น biomarker ของการเกิดโรคและผลของการรักษาด้วยสมุนไพรว่านชักมดลูกต่อไป

ผลการวิจัยที่ได้รับนี้นับว่ามีความสำคัญต่อการนำว่านชักมดลูกไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้เสริมสุขภาพในผู้สูงอายุต่อไป และแนวทางที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปประเมินผลการวิจัยอื่นๆต่อไป

6. เอกสารอ้างอิง

- Armamento-Villareal, R., et al. (2005). "A new selective estrogen receptor modulator, CHF 4227.01, preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats." J Bone Miner Res 20(12): 2178-2188.
- Bhukhai K, Suksen K, Bhummaphan N, Janjorn K, Thongon N, Tantikanlayaporn D, Piyachaturawat P, Suksamrarn A, Chairoungdua A. (2012) A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3beta protein-dependent activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. J Biol Chem 287: 36168–36178.
- Black, L. J., et al. (1994). "Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats." Journal of Clinical Investigation 93(1): 63-69.
- Chaurasia, B. and S. A. Summers (2015). "Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders." Trends Endocrinol Metab 26(10): 538-550.
- Gowda H, Ivanisevic J, Johnson CH, Kurczyk ME, Benton HP, Rinehart D, et al. (2014) Interactive XCMS Online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. Analytical chemistry 86(14):6931-9.
- Hikiji, H., et al. (2004). "Absence of platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy." Journal of Clinical Investigation 114(1): 85-93.
- Hollywood K, Brison DR, Goodacre R (2006) Metabolomics: Current technologies and future trends. Proteomics 6: 4716–4723.
- I.F. Duarte, S.O. Diaz, A.M. Gil, NMR metabolomics of human blood and urine in disease research, J. Pharm. Biomed. Anal. 93 (2014) 17–26.
- J.K. Nicholson, J. Connelly, J.C. Lindon, E. Holmes, Metabolomics: a platform for studying drug toxicity and gene function, Nat. Rev. Drug Discov. 1 (2002)153–161.

- Lapmanee S, Charoenphandhu N, Aeimlapa R, Suntornsaratoon P, Wongdee K, Tiyaatkulkovit W, et al. (2014) High dietary cholesterol masks type 2 diabetes-induced osteopenia and changes in bone microstructure in rats. *Lipids*. 2014 Oct;49(10):975-86.
- Leis HJ, Windischhofer (2015) Molecular Characterization of Group IVA (Cytosolic) Phospholipase A2 in Murine Osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Protein J*. 34:29-34
- Ma B, Liu J, Zhang Q, Ying H, A J, Sun J, et al. (2013) Metabolomic profiles delineate signature metabolic shifts during estrogen deficiency-induced bone loss in rat by GC-TOF/MS. *PloS one*. 8(2).
- Ma, B., et al. (2011). "GC-TOF/MS-based metabolomic profiling of estrogen deficiency-induced obesity in ovariectomized rats." *Acta Pharmacol Sin* 32(2): 270-278.
- Manolagas, S. C., et al. (2013). "The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease." *Nature reviews. Endocrinology* 9(12): 699-712.
- Martins-Maciel, E. R., et al. (2013). "Raloxifene affects fatty acid oxidation in livers from ovariectomized rats by acting as a pro-oxidant agent." *Toxicol Lett* 217(1): 82-89.
- Moggs, J. G., et al. (2005). "Anti-proliferative effect of estrogen in breast cancer cells that re-express ERalpha is mediated by aberrant regulation of cell cycle genes." *J Mol Endocrinol* 34(2): 535-551.
- Obayashi M, Shimomura Y, Nakai N, Jeoung NH, Nagasaki M, Murakami T, et al. (2004) Estrogen controls branched-chain amino acid catabolism in female rats. *The Journal of nutrition*.134(10):2628-33.
- Ogata, H., et al. (1999). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." *Nucleic Acids Res* 27(1): 29-34.
- Park, S. J., et al. (2013). "Lysophosphatidylethanolamine utilizes LPA(1) and CD97 in MDA-MB-231 breast cancer cells." *Cellular Signalling* 25(11): 2147-2154.
- Saghatelian, A., et al. (2004). "Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling." *Biochemistry* 43(45): 14332-14339.
- Schultz AW, Wang J, Zhu Z.-J, Johnson CH, Patti GJ, Siuzdak G. (2013). Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Characterization of Metabolites Guided by the METLIN Database. *Nature Protocols*, 8(3), 451–460.
- Snyder, F., et al. (1997). Plasmalogens: Their metabolism and central role in the production of lipid mediators. *Advances in Lipobiology*. W. G. Richard, JAI. **Volume** 2: 261-286.
- Suksamrarn A, Ponglikitmongkol M, Wongkrajang K, Chindaduang A, Kittidanairak S, Jankam A, Yingyongnarongkul BE, Kittipanumat N, Chokchaisiri R, Khetkam P, et al. (2008) Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: Isolation,

- chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Bioorg Med Chem* 16: 6891–6902.
- Tantikanlayaporn D, Robinson LJ, Suksamrarn A, Piyachaturawat P, Blair HC. (2013a) A diarylheptanoid phytoestrogen from *Curcuma comosa*, 1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-ol, accelerates human osteoblast proliferation and differentiation. *Phymed*.15;20(8-9):676-82.
- Tantikanlayaporn D, Wichit P, Weerachayaphorn J, Chairoungdua A, Chuncharunee A, Suksamrarn A, Piyachaturawat P. (2013b) Bone Sparing Effect of a Novel Phytoestrogen Diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in Ovariectomized Rats. *PLoS ONE* 8(11).
- Vinayavekhin, N., et al. (2015). "Untargeted metabolomics analysis revealed changes in the composition of glycerolipids and phospholipids in *Bacillus subtilis* under 1-butanol stress." *Appl Microbiol Biotechnol* 99(14): 5971-5983.
- de Vrieze E, Moren M, Metz JR, Flik G, Lie KK (2014) Arachidonic Acid Enhances Turnover of the Dermal Skeleton: Studies on Zebrafish Scales. *PLoS ONE* 9(2).
- Wang X, Zhou G, Xu X, Geng R, Zhou J, Yang Y, et al. (2014) Transcriptome profile analysis of adipose tissues from fat and short-tailed sheep. *Gene*. 549(2):252-7.
- Winuthayanon W, Suksen K, Boonchird C, Chuncharunee A, Ponglikitmongkol M, Suksamrarn A, et al. (2009) Estrogenic activity of diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. Requires metabolic activation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57(3):840-5.
- Wishart DS (2007) Current Progress in computational metabolomics. *Briefings in Bioinformatics* 8: 279–293.
- Yoshida K, Shinohara H, Haneji T, Nagata T (2007) Arachidonic acid inhibits osteoblast differentiation through cytosolic phospholipase A2-dependent pathway. *Oral Dis*. 13(1):32-39.
- Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, et al. (2002) Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(7):4580-5.
- Yuyama, K., et al. (2014). "Pathological roles of ceramide and its metabolites in metabolic syndrome and Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* 1841(5): 793-798.

7. ผลผลิตที่ได้จากการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติที่ได้รับ และจะได้รับจากโครงการวิจัยนี้

- (1) Sueajai, J., Vinayavekhin, N., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., Untargeted metabolomics of urine from ovariectomized rats: Effects of a diarylheptanoid from *Curcuma comosa*. In: PACOON2016 Proceeding, p1083-1589.
- (2) Nawaporn Vinayavekhin, Jetjamnong Sueajai, Nichaboon Chaihad, Ratchanee Panrak, Polkit Sangvanich, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat. Serum lipidomics analysis of ovariectomized rats under *Curcuma comosa* treatment. J Ethno Pharmacology (In Press)
- (3) Tantikanlayaporn, D., Wichit, P., Weerachayaphorn, J., Chairoungdu, A., Chuncharune, A., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. PLoS One. 2013 Nov 11;8(11):e78739.
- (4) Jetjamnong Sueajai, Nawaporn Vinayavekhin, Nareerat Sutjarit, Nittaya Boonmuen, Arthit Chairoungdua, Saranya Aupparakkitanon, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat. Suppression of lysophosphatidylcholine in ovariectomized rats by *Curcuma comosa* treatment. In Preparation

2. หนังสือ

3. การจดทะเบียนสิทธิบัตร

-การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- (1) Sueajai, J., Vinayavekhin, N., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., Metabolomics study of metabolites in ovariectomized rats in response to phytoestrogen. Center of excellence on environmental health and toxicology conference. November 28-29, 2015; Bangkok, Thailand. Abstract No. P-13.

4. การนำผลการวิจัยไปใช้

-

5. การสร้างนักวิจัยใหม่

ก. ระดับปริญญาโท (ปีที่จบการศึกษา และหัวข้อวิทยานิพนธ์)

พ.ศ. 2559 นาย เจตจำนงค์ เสือใจ เรื่อง “An Evaluation on the effect of *Curcuma comosa* Roxb. in estrogen- deficient rats by using metabolomics approaches”

ข. นักวิจัย

-

Proceeding in the “PACCON 2016” (12 ธันวาคม 2558)

**Untargeted metabolomics of urine from ovariectomized rats: Effects of
a diarylheptanoid from *Curcuma comosa***

Jetjamnong Sueajai^{1,2}, Nawaporn Vinayavekhin,³ Apichart Suksamrarn,⁴
Pawinee Piyachaturawat^{*,2,5}

¹Toxicology Graduate Program, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand

⁵Chakri Naruebodindra Medical Institute, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol
University, Bangkok, Thailand

*pawinee.pia@mahidol.ac.th

Abstract:

Curcuma comosa is an indigenous medicinal plant in Zingiberaceae family, which contains phytoestrogens and has been widely used to relieve menopausal symptoms. To assess its therapeutic potential, urinary metabolomes in the ovariectomy-induced osteopenia rats (OVX) were analyzed three months after surgery using ESI-LC/MS. The results found a total of 3708 ion features of urinary metabolites with 12 and 11 features downregulated and upregulated in the OVX rats, respectively, when compared to those in sham controls. Using the S-plot of OPLS-DA model, the analysis indicated a marked decrease in the levels of arachidonoylamide in the OVX rats, which could be restored by treatments with estrogen (17 β -estradiol) or a diarylheptanoid from *C. comosa*. The levels of many other fatty amides, such as linoleamide, oleamide, oleoyl ethylamide, and palmitamide were found to be increased in the estrogen, and *C. comosa* treatments compared to those in sham controls and the OVX rats. Overall, the untargeted metabolomics approach suggested the use of urinary arachidonoylamide as a putative biomarker to investigate the roles of estrogen and phytoestrogen in preventing the functional impairments in menopause. The specificity of such biomarker might be worth validating further in the future.

1. Introduction

Metabolomics is an emerging omic science that aims to identify and quantify

low molecular weight (<1500 Da) biological molecules resulted from the cellular processes at any particular physiological

state.^{1,2} Varieties of metabolites in biological fluids and in tissue samples are reliably detected by using metabolomics.³ Urine is a non-invasive body fluid excreted by the kidney. It contains a number of water-soluble metabolites and biomolecules extracted from bloodstream, which may exhibit metabolic signatures of many biological pathways. As urine can be obtained in large volume with less interference from proteins or lipids,⁴ a number of metabolomics studies have been conducted using urine and revealed many disease biomarkers.⁵⁻⁸

Curcuma comosa Roxb. (*C. comosa*) is a medicinal plant in Zingiberaceae family that has been used widely to alleviate postmenopausal symptoms in Thailand. Diarylheptanoid, (3R)-1,7-diphenyl-(4E, 6E)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD), has been identified as the major active phytoestrogen of *C. comosa*.⁹ Many pharmacological activities of *C. comosa* and its active compound in both *in vitro* and *in vivo* systems have been reported, which include the positive osteogenic effect to preserve bone mass in the ovariectomized (OVX)-induced osteopenia in rats and lowering hyperlipidemia in animals.¹⁰⁻¹² The present study aims to investigate urinary untargeted metabolite profile in the OVX rats and assess therapeutic potential of *C. comosa* as compared to estrogen.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid was purchased from Fisher Scientific (Geel, Belgium). 17 β -estradiol (E2) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Phytoestrogen diarylheptanoid (1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol; DPHD) and *C. comosa* extract were prepared as previously described.¹⁰ All chemical reagents used were of HPLC grade.

2.2 Animals and treatments

Eight week old female Sprague-Dawley rats were supplied by the National Laboratory Animal Centre of Thailand (Salaya, Nakornpathom, Thailand). They were subjected to ovariectomy and treatments as previously described¹¹. Seven days following the operation, the animals were assigned to receive daily treatments of either estradiol (E2, 10 μ g/kg BW, sc), DPHD isolated from *C. comosa* (50 mg/kg BW, sc) or *C. comosa* ethanol extract (500 mg/kg BW, po) for 12 weeks. The obtained data from treatment groups were compared to those of sham and OVX controls. Body weights were recorded weekly throughout experimental period. At the end of the treatment, an overnight fasted urine sample was collected in the standard metabolic cage. The samples were stored at -80°C

until analysis. The animal protocol was approved by the Animal Care and Use Committees, Faculty of Science, Mahidol University.

2.3 Urine sample preparation

In preparation for metabolomic analysis, 100 μL rat urine samples were diluted with 400 μL of ice cold methanol and then centrifuged at 15,000 $\times g$ for 10 min. The supernatant was transferred into HPLC vial, and 10 μL of the sample was introduced into LC–MS system for untargeted metabolites analysis.

2.4 Liquid chromatography–mass spectrometry analysis

The urine samples were analyzed using LC–MS system. Metabolites were separated on C18 (100 mm length $\times$ 2.1 mm i.d., 3 μm) analytical column (phenomenex, CA, USA). Mobile phase A composed of 5 mM ammonium acetate in water with 0.1% formic acid (A), and mobile phase B was composed of acetonitrile with 0.1% formic acid (B). The mobile phase composition started at 5% of B and linearly increased to 80% within 15 min and 95% over 25 min. The mass spectrometer was operated using electrospray ionization (ESI) at the m/z range of 50–1500 in the positive mode.

2.5 Data processing

All LC–MS data were processed using XCMS online (xcmsonline.scripps.edu) platform¹³ for peak detection and retention time (R.T.) alignment. The data matrix was imported to SIMCA 14 (Umetrics, Umea, Sweden) platform for multivariate data analyses. Metabolite features consisted of mass-to-charge ratio (m/z) and retention time were used for primary identification. Subsequently, S-plot of orthogonal projections to the latent structure with discriminant analysis (OPLS-DA) was conducted to discover biomarkers.

2.6 Statistical analysis

All data were expressed as means $\pm$ SEM, and statistical analyses were performed using Student's t -test for independent two samples, $p < 0.05$ indicated statistical significance.

3. Results & Discussion

3.1 Metabolomics analysis of urine samples

During the course of the experiment, all rats were healthy and progressively gain body weights in a similar pattern to that previously reported.¹² For the analysis of metabolites in urine samples, total ion chromatograms produced by LC–MS analysis were subjected to peak pickup and retention time alignment by using XCMS software, which showed a total of 3,708 ion features of urinary metabolites. In the next

step, statistical analysis was performed by comparing the metabolite profile of OVX rats with those of sham control. The result revealed 23 statistically significant changing metabolite features, 12 downregulated and 11 upregulated, in the OVX rats, when compared to those in sham control.

To determine the effect of ovariectomy and those of estrogen, and *C. comosa* phytoestrogen treatments, we conducted multivariate data analysis using OPLS-DA model. As shown in Figure 1, OPLS-DA score plot discriminant analysis for the whole data is created to visualize the discrimination among categorized set of metabolic data. The results showed that the urine data of the control group (SHAM) and the experimental disease model group (OVX) were not different and could not be clearly separated from each other. The majority of endogenous metabolites in urine of the OVX-estrogen deficiency model may not be distinctly affected, even at the longer period of 12 weeks of hormone depletion. However, when comparing among the OVX animals receiving varieties of treatments, the separation of metabolites were detected. The effects of treatment by DPHD were more similar to those by E2 than those by *C. comosa* ethanol extract (EXT).

To elucidate potential biomarkers of interest, the metabolite features on the S-plot (Figure 2A-D), which contributed strongly to the vector of the predictive

component on the upper right or lower left quadrant, were considered as the increased or decreased markers.¹⁶ When comparing the OVX group to the sham control, the highest magnitude of decrease and high reliability in ion feature of metabolite with m/z 304.2613 at the retention time of 20.23 min was observed, and the metabolite was identified as arachidonoylamide.

Next, we examined the effect of estradiol treatment in OVX rats using similar analytical approach. In this case, protonated ions ($M+H^+$) at accurate m/z of 304.2613, 280.2637, 310.3104, 256.2641 and 282.2800 were found to be increased in E2-treated rats compared to that in OVX controls.

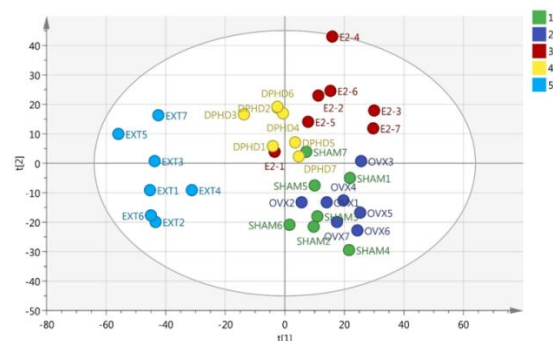


Figure 1. OPLS-DA score plot discriminant analysis of data from various treatment groups; sham control (SHAM), OVX control, estrogen (E2) and *C. comosa* (DPHD and EXT-treatments. SHAM and OVX data were intermixing. The separation could be observed among OVX rats receiving variety of treatments.

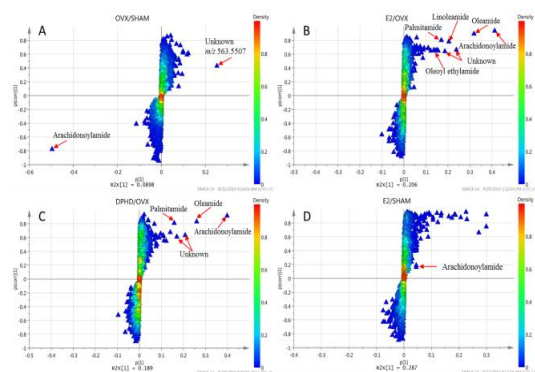


Figure 2. S-plots of the OPLS-DA model show different relative contribution between (A) OVX and SHAM control rats; (B) estradiol (E2) and OVX; (C) DPHD and OVX; and (D) E2 and SHAM, respectively. Each point represents a metabolite feature. The upper right and lower left features indicate increases and decreases, which contribute to group classification.

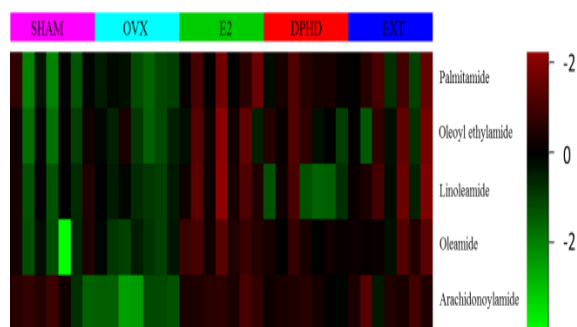
When searched against METLIN metabolite database and confirmed the structural assignment by tandem mass spectrometry (MS/MS),¹⁴ these ions appeared to be derived from arachidonoylamide, linoleamide, oleoyl ethylamide, palmitamide, and oleamide, respectively (Table 1). Notably, E2 treatment could prevent the lowering in arachidonoylamide in the OVX rats and restore its levels to that of the sham controls.

To determine whether these fatty acid amide urinary metabolites were relevant to other treatments in the OVX rats, the ratios of these metabolite levels in other treatment groups (DPHD, and EXT) to those in the OVX group were calculated (Table 1), and

heat map view of these 5 fatty amides metabolites in rats urine were plotted to visualize the changes of individual parameters (Figure 3). The results indicated that all fatty acid amides, except for linoleamide, were significantly increased in the DPHD-treated rats, whereas all but not oleoyl ethylamide were elevated in the *C. comosa* ethanol extract-treated rats. Interestingly, arachidonoylamide again showed the highest increase in its level under the treatment with DPHD (2.0-fold) and *C. comosa* ethanol extract (2.1-fold).

Together, these results suggested the potential roles of arachidonoylamide as a

promising putative biomarker for estrogen deficiency and the evaluation of therapeutic intervention. Arachidonoyl-amide is a fatty acid amide of arachidonic acid, which is a precursor for the synthesis of endogenous prostaglandins. This compound has been reported to be involved in the regulation of adipogenic and lipogenic genes.^{18,19} It is therefore possible that arachidonoylamide might be associated with the regulation of lipogenesis and bone turnover process. However, whether this is the case in the present study, which is a study in estrogen deficient model, requires further investigation.



metabolite feature and each column represents a sample. The Z-score scale expressions are plotted in red-green square color scale to indicated low to high levels of expression.

Figure 3. Heat map of urinary fatty acid amides of sham and OVX controls, and OVX-treated rats. Each row represents a

Table 1. Relative levels of the fatty acid amides in various treatment groups measured by LC–MS untargeted metabolomics platforms

Metabolite Name	Ion	R.T.(min)	Fold Change ^{1,2}			
			OVX/SHA M	E2/OV X	DPHD/OV X	EXT/OV X
Arachidonoylamide	304.261	20.23	0.5**	2.2**	2.0**	2.1**
	3					
Linoleamide	280.263	18.99	0.6	1.5**	0.9	1.4*
	7					
Oleoyl ethylamide	310.310	22.51	0.9	1.3*	1.2*	1.2
	4					
Palmitamide	256.264	19.59	0.9	1.2**	1.2**	1.2*
	1					
Oleamide	282.280	20.08	0.6	1.3**	1.2**	1.3**
	0					

¹ Fold change represents the relative ratios of levels of the fatty acid amides in ovariectomized (OVX) rats to those in sham-operated control (SHAM), estradiol (E2), isolated compound from *C. comosa* (DPHD), or *C. comosa* ethanol extract (EXT) groups.

² Statistical significance determined by Student's *t* test: **p* < 0.05; ***p* < 0.01 (*N* = 7).

4. Conclusion

Our metabolomics analysis suggests the roles of the urinary fatty acid amide arachidonoylamide as a promising putative novel biomarker to investigate the effects of estrogen and phytoestrogen in preventing the functional impairments in menopause. This is the first report on the effects of estrogen and phytoestrogens on urinary metabolites in the OVX rats by using metabolomics approach. Future study should involve validating the specificity of such biomarker.

Acknowledgements

This study was supported by the Strategic Basic Research Grant of Thailand Research Fund (to PP, and to AS), the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research and Universities Initiative (NRU).

References

1. Wishart, D. S., Current progress in computational metabolomics. *Briefings in bioinformatics* **2007**, 8 (5), 279-293.
2. Hollywood, K.; Brison, D. R.; Goodacre, R., Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* **2006**, 6 (17), 4716-4723.
3. Beger, R.; Colatsky, T., Metabolomics data and the biomarker qualification process. *Metabolomics* **2012**, 8 (1), 2-7.
4. Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A. C.; Wilson, M. R.; Knox, C.; Bjorn Dahl, T. C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; Dame, Z. T.; Poelzer, J.; Huynh, J.; Yallou, F. S.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bogumil, R.; Roehring, C.; Wishart, D. S., The human urine metabolome. *PloS one* **2013**, 8 (9), e73076.
5. Wang, W.; Wang, S.; Tan, S.; Wen, M.; Qian, Y.; Zeng, X.; Guo, Y.; Yu, C., Detection of urine metabolites in polycystic ovary syndrome by UPLC triple-TOF-MS. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2015**, 448, 39-47.
6. Vicente-Munoz, S.; Morcillo, I.; Puchades-Carrasco, L.; Paya, V.; Pellicer, A.; Pineda-Lucena, A., Nuclear magnetic resonance metabo-lomic profiling of urine provides a noninvasive alternative to the identification of biomarkers associated with endometriosis. *Fertility and sterility* **2015**.
7. Adamko, D. J.; Nair, P.; Mayers, I.; Tsuyuki, R. T.; Regush, S.; Rowe, B. H., Metabolomic profiling of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A pilot study differentiating diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* **2015**, 136 (3), 571-580 e3.
8. Xue, L.; Wang, Y.; Liu, L.; Zhao, L.; Han, T.; Zhang, Q.; Qin, L., A HNMR-based metabonomics study of

- postmenopausal osteoporosis and intervention effects of Er-Xian Decoction in ovariectomized rats. *International journal of molecular sciences* **2011**, *12* (11), 7635-7651.
9. Suksamrarn, A.; Ponglikitmongkol, M.; Wongkrajang, K.; Chindaduang, A.; Kittidanairak, S.; Jankam, A.; Yingyongnarongkul, B. E.; Kittipanumat, N.; Chokchaisiri, R.; Khetkam, P.; Piyachaturawat, P., Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16* (14), 6891-902.
 10. Bhukhai, K.; Suksen, K.; Bhummaphan, N.; Janjorn, K.; Thongon, N.; Tantikanlayaporn, D.; Piyachaturawat, P.; Suksamrarn, A.; Chairoungdua, A., A Phytoestrogen Diarylheptanoid Mediates Estrogen Receptor/Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 β Protein-dependent Activation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287* (43), 36168-36178.
 11. Tantikanlayaporn, D.; Robinson, L. J.; Suksamrarn, A.; Piyachaturawat, P.; Blair, H. C., A diarylheptanoid phytoestrogen from *Curcuma comosa*, 1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-ol, accelerates human osteoblast proliferation and differentiation. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2013**, *20* (0), 676-682.
 12. Tantikanlayaporn, D.; Wichit, P.; Weerachayaphorn, J.; Chairoungdua, A.; Chuncharunee, A.; Suksamrarn, A.; Piyachaturawat, P., Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. *PloS one* **2013**, *8* (11), e78739.
 13. Gowda, H.; Ivanisevic, J.; Johnson, C. H.; Kurczy, M. E.; Benton, H. P.; Rinehart, D.; Nguyen, T.; Ray, J.; Kuehl, J.; Arevalo, B.; Westenskow, P. D.; Wang, J.; Arkin, A. P.; Deutschbauer, A. M.; Patti, G. J.; Siuzdak, G., Interactive XCMS Online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Analytical chemistry* **2014**, *86* (14), 6931-9.
 14. Zhu, Z. J.; Schultz, A. W.; Wang, J.; Johnson, C. H.; Yannone, S. M.; Patti, G. J.; Siuzdak, G., Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature protocols* **2013**, *8* (3), 451-60.
 15. Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E. J.; Edlund, U.; Shockcor, J. P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J., Visualization of GC/TOF-MS-

Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Analytical chemistry* **2008**, 80 (1), 115-122.

16. Vaidya, H.; Cheema, S. K., Arachidonic acid has a dominant effect to regulate lipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes compared to omega-3 fatty acids. *Food & Nutrition Research* **2015**, 59, 10.3402/fnr.v59.25866.
17. Nikolopoulou, E.; Papacleovoulou, G.; Jean-Alphonse, F.; Grimaldi, G.; Parker, M. G.; Hanyaloglu, A. C.; Christian, M., Arachidonic acid-dependent gene regulation during preadipocyte differentiation controls adipocyte potential. *Journal of lipid research* **2014**, 55 (12), 247

Untargeted metabolomics of urine from ovariectomized rats: Effects of a diarylheptanoid from *Curcuma comosa*

Jetjamnong Sueajai,^{1,2} Nawaporn Vinayavekhin,³ Apichart Suksamrarn,⁴
Pawinee Piyachaturawat^{*2,5}

¹Toxicology Graduate Program, Faculty of Science, Mahidol University,
Bangkok 10400, Thailand

²Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University,
Bangkok 10400, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University,
Bangkok 10240, Thailand

⁵Chakri Naruebodindra Medical Institute, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital,
Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

*e-mail: pawinee.pia@mahidol.ac.th

Abstract:

Curcuma comosa is an indigenous medicinal plant in Zingiberaceae family, which contains phytoestrogens and has been widely used to relieve menopausal symptoms. To assess its therapeutic potential, urinary metabolomes in the ovariectomy-induced osteopenia rats (OVX) were analyzed three months after surgery using ESI-LC/MS. The study found the total of 3708 ion features of urinary metabolites with 12 and 11 features downregulated and upregulated in the OVX rats, respectively, when compared to those in sham controls. Using the S-plot of OPLS-DA model, the analysis indicated a marked decrease in the levels of arachidonoylamide in the OVX rats, which could be restored by treatments with estrogen (17 β -estradiol) or a diarylheptanoid from *C. comosa*. The levels of many other fatty amides, such as linoleamide, oleamide, oleoyl ethylamide, and palmitamide were found to be increased in the estrogen, and *C. comosa* treatments compared to those in sham controls and the OVX rats. Overall, the untargeted metabolomics approach suggested the use of urinary arachidonoylamide as a putative biomarker to investigate the roles of estrogen and phytoestrogen in preventing the functional impairments in menopause. The specificity of such biomarker might be worth validating further in the future.

References:

1. Bhukhai, K.; Suksen, K.; Bhummaphan, N.; Janjorn, K.; Thongon, N.; Tantikanlayaporn, D.; Piyachaturawat, P.; Suksamrarn, A.; Chairoungdua, A. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 36168–36178.
2. Tantikanlayaporn, D.; Robinson, L. J.; Suksamrarn, A.; Piyachaturawat, P.; Blair, H. *C. Phytomedicine* **2013**, 20, 676–682.
3. Tantikanlayaporn, D.; Wichit, P.; Weerachayaphorn, J.; Chairoungdua, A.; Chuncharune, A.; Suksamarn, A.; Piyachaturawat, P. *PLoS One* **2013**, 8, e78739.

Untargeted metabolomics of urine from ovariectomized rats: Effects of a diarylheptanoid from *Curcuma comosa*

Jetjamnong Sueajai^{1,2}, Nawaporn Vinayavekhin,³ Apichart Suksamran,⁴
Pawinee Piyachaturawat^{*,2,5}

¹Toxicology Graduate Program, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand

⁵Chakri Naruebodindra Medical Institute, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

*pawinee.pia@mahidol.ac.th

Abstract:

Curcuma comosa is an indigenous medicinal plant in Zingiberaceae family, which contains phytoestrogens and has been widely used to relieve menopausal symptoms. To assess its therapeutic potential, urinary metabolomes in the ovariectomy-induced osteopenia rats (OVX) were analyzed three months after surgery using ESI-LC/MS. The results found a total of 3708 ion features of urinary metabolites with 12 and 11 features downregulated and upregulated in the OVX rats, respectively, when compared to those in sham controls. Using the S-plot of OPLS-DA model, the analysis indicated a marked decrease in the levels of arachidonoylamide in the OVX rats, which could be restored by treatments with estrogen (17 β -estradiol) or a diarylheptanoid from *C. comosa*. The levels of many other fatty amides, such as linoleamide, oleamide, oleoyl ethylamide, and palmitamide were found to be increased in the estrogen, and *C. comosa* treatments compared to those in sham controls and the OVX rats. Overall, the untargeted metabolomics approach suggested the use of urinary arachidonoylamide as a putative biomarker to investigate the roles of estrogen and phytoestrogen in preventing the functional impairments in menopause. The specificity of such biomarker might be worth validating further in the future.

1. Introduction

Metabolomics is an emerging-omic science that aims to identify and quantify low molecular weight (<1500 Da) biological molecules resulted from the cellular processes at any particular physiological state.^{1,2} Varieties of metabolites in biological fluids and in tissue samples are reliably detected by using metabolomics.³ Urine is a non-invasive body fluid excreted by the kidney. It contains a number of water-soluble metabolites and biomolecules extracted from bloodstream, which may exhibit metabolic signatures of many biological pathways. As urine can be obtained in large volume with less interference from proteins or lipids,⁴ a number of metabolomics studies have been conducted

using urine and revealed many disease biomarkers.⁵⁻⁸

Curcuma comosa Roxb. (*C. comosa*) is a medicinal plant in Zingiberaceae family that has been used widely to alleviate postmenopausal symptoms in Thailand. Diarylheptanoid, (3R)-1,7-diphenyl-(4E, 6E)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD), has been identified as the major active phytoestrogen of *C. comosa*.⁹ Many pharmacological activities of *C. comosa* and its active compound in both *in vitro* and *in vivo* systems have been reported, which include the positive osteogenic effect to preserve bone mass in the ovariectomized (OVX)-induced osteopenia in rats and lowering hyperlipidemia in animals.¹⁰⁻¹² The present study aims to investigate urinary untargeted metabolite

profile in the OVX rats and assess therapeutic potential of *C. comosa* as compared to estrogen.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid was purchased from Fisher Scientific (Geel, Belgium). 17 β -estradiol (E2) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Phytoestrogen diarylheptanoid (1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol; DPHD) and *C. comosa* extract were prepared as previously described.¹⁰ All chemical reagents used were of HPLC grade.

2.2 Animals and treatments

Eight week old female Sprague-Dawley rats were supplied by the National Laboratory Animal Centre of Thailand (Salaya, Nakornpathom, Thailand). They were subjected to ovariectomy and treatments as previously described¹¹. Seven days following the operation, the animals were assigned to receive daily treatments of either estradiol (E2, 10 μ g/kg BW, sc), DPHD isolated from *C. comosa* (50 mg/kg BW, sc) or *C. comosa* ethanol extract (500 mg/kg BW, po) for 12 weeks. The obtained data from treatment groups were compared to those of sham and OVX controls. Body weights were recorded weekly throughout experimental period. At the end of the treatment, an overnight fasted urine sample was collected in the standard metabolic cage. The samples were stored at -80°C until analysis. The animal protocol was approved by the Animal Care and Use Committees, Faculty of Science, Mahidol University.

2.3 Urine sample preparation

In preparation for metabolomic analysis, 100 μ L rat urine samples were diluted with 400 μ L of ice cold methanol and then centrifuged at 15,000 $\times$ g for 10 min. The supernatant was transferred into HPLC vial, and 10 μ L of the sample was

introduced into LC–MS system for untargeted metabolites analysis.

2.4 Liquid chromatography–mass spectrometry analysis

The urine samples were analyzed using LC–MS system. Metabolites were separated on C18 (100 mm length $\times$ 2.1 mm i.d., 3 μ m) analytical column (phenomenex, CA, USA). Mobile phase A composed of 5 mM ammonium acetate in water with 0.1% formic acid (A), and mobile phase B was composed of acetonitrile with 0.1% formic acid (B). The mobile phase composition started at 5% of B and linearly increased to 80% within 15 min and 95% over 25 min. The mass spectrometer was operated using electrospray ionization (ESI) at the m/z range of 50–1500 in the positive mode.

2.5 Data processing

All LC–MS data were processed using XCMS online (xcmsonline.scripps.edu) platform¹³ for peak detection and retention time (R.T.) alignment. The data matrix was imported to SIMCA 14 (Umetrics, Umea, Sweden) platform for multivariate data analyses. Metabolite features consisted of mass-to-charge ratio (m/z) and retention time were used for primary identification. Subsequently, S-plot of orthogonal projections to the latent structure with discriminant analysis (OPLS-DA) was conducted to discover biomarkers.

2.6 Statistical analysis

All data were expressed as means $\pm$ SEM, and statistical analyses were performed using Student's *t*-test for independent two samples, $p < 0.05$ indicated statistical significance.

3. Results & Discussion

3.1 Metabolomics analysis of urine samples

During the course of the experiment, all rats were healthy and progressively

gain body weights in a similar pattern to that previously reported.¹² For the analysis of metabolites in urine samples, total ion chromatograms produced by LC–MS analysis were subjected to peak pickup and retention time alignment by using XCMS software, which showed a total of 3,708 ion features of urinary metabolites. In the next step, statistical analysis was performed by comparing the metabolite profile of OVX rats with those of sham control. The result revealed 23 statistically significant changing metabolite features, 12 downregulated and 11 upregulated, in the OVX rats, when compared to those in sham control.

To determine the effect of ovariectomy and those of estrogen, and *C. comosa* phytoestrogen treatments, we conducted multivariate data analysis using OPLS-DA model. As shown in Figure 1, OPLS-DA score plot discriminant analysis for the whole data is created to visualize the discrimination among categorized set of metabolic data. The results showed that the urine data of the control group (SHAM) and the experimental disease model group (OVX) were not different and could not be clearly separated from each other. The majority of endogenous metabolites in urine of the OVX-estrogen deficiency model may not be distinctly affected, even at the longer period of 12 weeks of hormone depletion. However, when comparing among the OVX animals receiving varieties of treatments, the separation of metabolites were detected. The effects of treatment by DPHD were more similar to those by E2 than those by *C. comosa* ethanol extract (EXT).

To elucidate potential biomarkers of interest, the metabolite features on the S-plot (Figure 2A-D), which contributed strongly to the vector of the predictive component on the upper right or lower left quadrant, were considered as the increased or decreased markers.¹⁶ When comparing the OVX group to the sham control, the highest magnitude of decrease and high reliability in ion feature of metabolite with

m/z 304.2613 at the retention time of 20.23 min was observed, and the metabolite was identified as arachidonoylamide.

Next, we examined the effect of estradiol treatment in OVX rats using similar analytical approach. In this case, protonated ions ($M+H^+$) at accurate m/z of 304.2613, 280.2637, 310.3104, 256.2641 and 282.2800 were found to be increased in E2-treated rats compared to that in OVX controls.

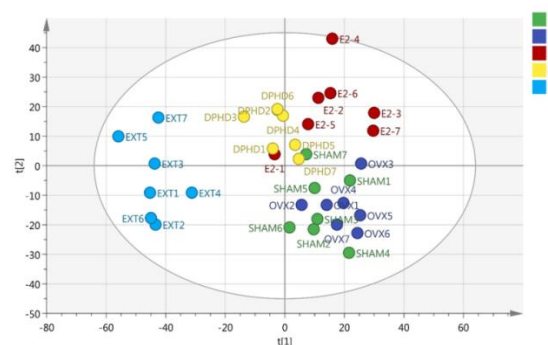


Figure 1. OPLS-DA score plot discriminant analysis of data from various treatment groups; sham control (SHAM), OVX control, estrogen (E2) and *C. comosa* (DPHD and EXT-treatments). SHAM and OVX data were intermixing. The separation could be observed among OVX rats receiving variety of treatments.

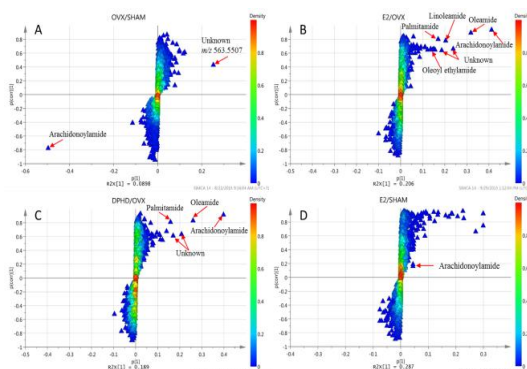


Figure 2. S-plots of the OPLS-DA model show different relative contribution between (A) OVX and SHAM control rats; (B) estradiol (E2) and OVX; (C) DPHD and OVX; and (D) E2 and SHAM, respectively. Each point represents a metabolite feature. The upper right and lower left features indicate increases and decreases, which contribute to group classification.

When searched against METLIN metabolite database and confirmed the structural assignment by tandem mass spectrometry (MS/MS),¹⁴ these ions appeared to be derived from arachidonoylamide, linoleamide, oleoyl ethylamide, palmitamide, and oleamide, respectively (Table 1). Notably, E2 treatment could prevent the lowering in arachidonoylamide in the OVX rats and restore its levels to that of the sham controls.

To determine whether these fatty acid amide urinary metabolites were relevant to other treatments in the OVX rats, the ratios of these metabolite levels in other treatment groups (DPHD, and EXT) to those in the OVX group were calculated (Table 1), and heat map view of these 5 fatty amides metabolites in rats urine were plotted to visualize the changes of individual parameters (Figure 3). The results indicated that all fatty acid amides, except for linoleamide, were significantly increased in the DPHD-treated rats, whereas all but not oleoyl ethylamide were elevated in the *C. comosa* ethanol extract-treated rats. Interestingly, arachidonoylamide again showed the highest increase in its level under the treatment with DPHD (2.0-fold) and *C. comosa* ethanol extract (2.1-fold).

Together, these results suggested the potential roles of arachidonoylamide as a

promising putative biomarker for estrogen deficiency and the evaluation of therapeutic intervention. Arachidonoylamide is a fatty acid amide of arachidonic acid, which is a precursor for the synthesis of endogenous prostaglandins. This compound has been reported to be involved in the regulation of adipogenic and lipogenic genes.^{18,19} It is therefore possible that arachidonoylamide might be associated with the regulation of lipogenesis and bone turnover process. However, whether this is the case in the present study, which is a study in estrogen deficient model, requires further investigation.

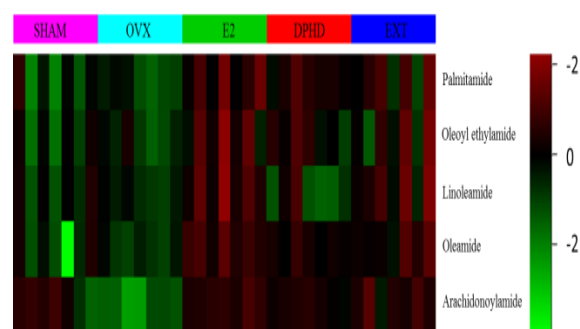


Figure 3. Heat map of urinary fatty acid amides of sham and OVX controls, and OVX-treated rats. Each row represents a metabolite feature and each column represents a sample. The Z-score scale expressions are plotted in red-green square color scale to indicated low to high levels of expression.

Table 1. Relative levels of the fatty acid amides in various treatment groups measured by LC–MS untargeted metabolomics platforms

Metabolite Name	Ion	R.T.(min)	Fold Change ^{1,2}			
			OVX/SHAM	E2/OVX	DPHD/OVX	EXT/OVX
Arachidonoylamide	304.2613	20.23	0.5**	2.2**	2.0**	2.1**
Linoleamide	280.2637	18.99	0.6	1.5**	0.9	1.4*
Oleoyl ethylamide	310.3104	22.51	0.9	1.3*	1.2*	1.2
Palmitamide	256.2641	19.59	0.9	1.2**	1.2**	1.2*
Oleamide	282.2800	20.08	0.6	1.3**	1.2**	1.3**

¹Fold change represents the relative ratios of levels of the fatty acid amides in ovariectomized (OVX) rats to those in sham-operated control (SHAM), estradiol (E2), isolated compound from *C. comosa* (DPHD), or *C. comosa* ethanol extract (EXT) groups.

²Statistical significance determined by Student's *t* test: **p* < 0.05; ***p* < 0.01 (*N* = 7).

4. Conclusion

Our metabolomics analysis suggests the roles of the urinary fatty acid amide arachidonoylamide as a promising putative novel biomarker to investigate the effects of estrogen and phytoestrogen in preventing the functional impairments in menopause. This is the first report on the effects of estrogen and phytoestrogens on urinary metabolites in the OVX rats by using metabolomics approach. Future study should involve validating the specificity of such biomarker.

Acknowledgements

This study was supported by the Strategic Basic Research Grant of Thailand Research Fund (to PP, and to AS), the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research and Universities Initiative (NRU).

References

1. Wishart, D. S., Current progress in computational metabolomics. *Briefings in bioinformatics* **2007**, *8* (5), 279-293.
2. Hollywood, K.; Brison, D. R.; Goodacre, R., Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* **2006**, *6* (17), 4716-4723.
3. Beger, R.; Colatsky, T., Metabolomics data and the biomarker qualification process. *Metabolomics* **2012**, *8* (1), 2-7.
4. Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A. C.; Wilson, M. R.; Knox, C.; Bjorn Dahl, T. C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; Dame, Z. T.; Poelzer, J.; Huynh, J.; Yallou, F. S.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bogumil, R.; Roehring, C.; Wishart, D. S., The human urine metabolome. *PloS one* **2013**, *8* (9), e73076.
5. Wang, W.; Wang, S.; Tan, S.; Wen, M.; Qian, Y.; Zeng, X.; Guo, Y.; Yu, C., Detection of urine metabolites in polycystic ovary syndrome by UPLC triple-TOF-MS. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2015**, *448*, 39-47.
6. Vicente-Munoz, S.; Morcillo, I.; Puchades-Carrasco, L.; Paya, V.; Pellicer, A.; Pineda-Lucena, A., Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of urine provides a noninvasive alternative to the identification of biomarkers associated with endometriosis. *Fertility and sterility* **2015**.
7. Adamko, D. J.; Nair, P.; Mayers, I.; Tsuyuki, R. T.; Regush, S.; Rowe, B. H., Metabolomic profiling of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A pilot study differentiating diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* **2015**, *136* (3), 571-580 e3.
8. Xue, L.; Wang, Y.; Liu, L.; Zhao, L.; Han, T.; Zhang, Q.; Qin, L., A HNMR-based metabonomics study of postmenopausal osteoporosis and intervention effects of Er-Xian Decoction in ovariectomized rats. *International journal of molecular sciences* **2011**, *12* (11), 7635-7651.
9. Suksamrarn, A.; Ponglikitmongkol, M.; Wongkrajang, K.; Chindaduang, A.; Kittidanairak, S.; Jankam, A.; Yingyongnarongkul, B. E.; Kittipanumat, N.; Chokchaisiri, R.; Khetkam, P.; Piyachaturawat, P., Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16* (14), 6891-902.
10. Bhukhai, K.; Suksen, K.; Bhummaphan, N.; Janjorn, K.; Thongon, N.; Tantikanlayaporn, D.; Piyachaturawat, P.; Suksamrarn, A.; Chairoungdua, A., A Phytoestrogen Diarylheptanoid Mediates Estrogen Receptor/Akt/Glycogen Synthase Kinase β Protein-dependent Activation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *The Journal of*

- biological chemistry* **2012**, 287 (43), 36168-36178.
11. Tantikanlayaporn, D.; Robinson, L. J.; Suksamrarn, A.; Piyachaturawat, P.; Blair, H. C., A diarylheptanoid phytoestrogen from *Curcuma comosa*, 1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-ol, accelerates human osteoblast proliferation and differentiation. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2013**, 20 (0), 676-682.
 12. Tantikanlayaporn, D.; Wichit, P.; Weerachayaphorn, J.; Chairoungdua, A.; Chuncharunee, A.; Suksamrarn, A.; Piyachaturawat, P., Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. *PloS one* **2013**, 8 (11), e78739.
 13. Gowda, H.; Ivanisevic, J.; Johnson, C. H.; Kurczy, M. E.; Benton, H. P.; Rinehart, D.; Nguyen, T.; Ray, J.; Kuehl, J.; Arevalo, B.; Westenskow, P. D.; Wang, J.; Arkin, A. P.; Deutschbauer, A. M.; Patti, G. J.; Siuzdak, G., Interactive XCMS Online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Analytical chemistry* **2014**, 86 (14), 6931-9.
 14. Zhu, Z. J.; Schultz, A. W.; Wang, J.; Johnson, C. H.; Yannone, S. M.; Patti, G. J.; Siuzdak, G., Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature protocols* **2013**, 8 (3), 451-60.
 15. Wiklund, S.; Johansson, E.; Sjöström, L.; Mellerowicz, E. J.; Edlund, U.; Shockcor, J. P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J., Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Analytical chemistry* **2008**, 80 (1), 115-122.
 16. Vaidya, H.; Cheema, S. K., Arachidonic acid has a dominant effect to regulate lipogenic genes in 3T3-L1 adipocytes compared to omega-3 fatty acids. *Food & Nutrition Research* **2015**, 59, 10.3402/fnr.v59.25866.
 17. Nikolopoulou, E.; Papacleovoulou, G.; Jean-Alphonse, F.; Grimaldi, G.; Parker, M. G.; Hanyaloglu, A. C.; Christian, M., Arachidonic acid-dependent gene regulation during preadipocyte differentiation controls adipocyte potential. *Journal of lipid research* **2014**, 55 (12), 2479-2490.

Serum lipidomics analysis of ovariectomized rats
under *Curcuma comosa* treatment

Nawaporn Vinayavekhin, Jetjamnong Sueajai,
Nichaboon Chaihad, Ratchanee Panrak,
Ratchanaporn Chokchaisiri, Polkit Sangvanich,
Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat



PII: S0378-8741(16)30478-0
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.054>
Reference: JEP10319

To appear in: *Journal of Ethnopharmacology*

Received date: 4 March 2016
Revised date: 26 June 2016
Accepted date: 19 July 2016

Cite this article as: Nawaporn Vinayavekhin, Jetjamnong Sueajai, Nichaboon Chaihad, Ratchanee Panrak, Ratchanaporn Chokchaisiri, Polkit Sangvanich, Apichart Suksamrarn and Pawinee Piyachaturawat, Serum lipidomics analysis of ovariectomized rats under *Curcuma comosa* treatment, *Journal of Ethnopharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.054>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting galley proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Serum lipidomics analysis of ovariectomized rats under *Curcuma comosa* treatment

Nawaporn Vinayavekhin^{a,b}, Jetjamnong Sueajai^c, Nichaboon Chailhad^a, Ratchanee Panrak^a, Ratchanaporn Chokchaisiri^d, Polkit Sangvanich^a, Apichart Suksamrarn^d, Pawinee Piyachaturawat^{e,f,*}

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^bOmics Sciences and Bioinformatics Center, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^cToxicology Graduate Program, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^dDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

^eDepartment of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^fChakri Naruebodindra Medical Institute, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

nawaporn.v@chula.ac.th

jetjamnong.sue@mahidol.ac.th

kewyo_z@hotmail.com

yu_iinano@hotmail.com

pam_2022@hotmail.com

polkit@gmail.com

s_apichart@ru.ac.th

pawinee.pia@mahidol.ac.th

*Corresponding author. Tel: +66-22015620, Fax: +66-23547154.

Abstract*Ethnopharmacological relevance*

Curcuma comosa Roxb. (*C. comosa*) or Wan Chak Motluk, Zingiberaceae family, has been used in Thai traditional medicine for the treatment of gynecological problems and inflammation.

Aim of the study

This study aimed to investigate the therapeutic potential of *C. comosa* by determining the changes in the lipid profiles in the ovariectomized rats, as a model of estrogen-deficiency-

induced hyperlipidemia, after treatment with different components of *C. comosa* using an untargeted lipidomics approach.

Materials and methods

Lipids were extracted from the serum of adult female rats subjected to a sham operation (SHAM; control), ovariectomy (OVX), or OVX with 12-week daily doses of estrogen (17 β -estradiol; E₂), (3*R*)-1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD; a phytoestrogen from *C. comosa*), powdered *C. comosa* rhizomes or its crude ethanol extract. They were then analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry, characterized, and subjected to the orthogonal projections to latent structures discriminant analysis statistical model to identify tentative biomarkers.

Results

Levels of five classes of lipids (ceramide, ceramide-1-phosphate, sphingomyelin, 1-*O*-alkenyl-lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylethanolamine) were elevated in the OVX rats compared to those in the SHAM rats, while the monoacylglycerols and triacylglycerols were decreased. The E₂ treatment only reversed the levels of ceramides, whereas treatments with DPHD, *C. comosa* extract or powder returned the levels of all upregulated lipids back to those in the SHAM control rats.

Conclusions

The findings suggest the potential beneficial effects of *C. comosa* on preventing the increased ceramide levels in OVX rats, a possible cause of metabolic disturbance under estrogen deficiency. Overall, the results demonstrated the power of untargeted lipidomics in discovering disease-relevant biomarkers, as well as evaluating the effectiveness of treatment by *C. comosa* components (DPHD, extract or powder) as utilized in Thai traditional medicine, and also providing scientific support for its folklore use.

Keywords: ceramide, *Curcuma comosa*, estrogen deficiency, lipidomics, phytoestrogen

1. Introduction

Lipidomics is a subset of metabolomics, which is used for quantitatively measuring and comparing levels of lipidomes—the complete collection of lipids in a living system—in response to stimuli of interest, such as diseases (Wenk, 2005). Defined by their solubility in organic solvents, the different classes of lipids can be structurally distinct, and many have been reported to relate to the cause of diseases (Gross and Han, 2006; Hu et al., 2009). For example, monoalkylglycerol ether (MAGE) was found to promote both invasiveness in

cancer cells (Chiang et al., 2006) and adipocyte differentiation, which is etiologically linked to obesity and diabetes (Homan et al., 2011). Because lipidomics provides a comprehensive view of the overall state of living systems, it is potentially a powerful tool for evaluation of the therapeutic effectiveness of treatment by medicines.

Estrogen plays many important regulatory functions in physiological processes in females, such as the development and regulation of reproductive tissue functions, management of energy, maintenance of body weight and functioning of bones. The natural decline in the estrogen level during menopause contributes to the increased risk of several diseases, including obesity, cardiovascular diseases and osteoporosis (Nilsson and Gustafsson, 2002). While the administration of estrogen to women can lower the risk as well as prevent or alleviate these symptoms, the possible carcinogenic effects of estrogen administration have limited its long-term usage (Beral et al., 2002; Lethaby et al., 2004). Many studies are, therefore, focused on searching for safer alternatives for post-menopausal treatment, and in particular for phytoestrogens.

Curcuma comosa Roxb. (Zingiberaceae family) has been used in Thai traditional medicine for the treatment of postpartum uterine bleeding, gynecological problems and inflammation (Anonymous, 1967; Pongboonrod, 1976; Weerachayaphorn et al., 2010, 2011). The major active compound in *C. comosa* rhizomes is the diarylheptanoid (3*R*)-1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD) (Suksamrarn et al., 2008), which was reported to exhibit estrogenic-like activities at the transcriptional level similar to those of estrogen (17 β -estradiol; E₂) (Winuthayanon et al., 2009a, 2009b). In addition, the crude *C. comosa* rhizome extract from hexane and DPHD were reported to lower plasma lipids (Piyachaturawat et al., 1999; Prasannarong et al., 2012), to enhance the differentiation and function of both mouse (Bhukhai et al., 2012) and human (Tantikanlayaporn et al., 2013a) osteoblastic cells via an estrogen receptor pathway *in vitro*, and to prevent bone loss in estrogen-deficient ovariectomized (OVX) rats after 12 weeks of treatment *in vivo* (Tantikanlayaporn et al., 2013b). However, while these pharmacological properties rendered DPHD a promising candidate for the treatment of estrogen-deficient postmenopausal osteoporosis in women (Tantikanlayaporn et al., 2013b), its effects at the metabolic level and on the metabolic pathways, which may suggest the overall state of the organism, have not been examined.

To understand the metabolic changes that result from estrogen deficiency, previous works have applied metabolomics analysis to study the serum (Ma et al., 2011) and plasma (Ma et al., 2013) of OVX rats compared to that of sham-operated controls. Using gas chromatography coupled to mass spectrometry (MS), elevated levels of some unsaturated

fatty acids (octadecadienoic and arachidonic acids), amino acids (glutamic acid, leucine, isoleucine and valine), cholesterol, homocysteine, 3-hydroxybutanoic acid, glucose and glycerol were reported (Ma et al., 2011, 2013). On the other hand, the levels of some other glycolytic intermediates (alanine and glyceraldehyde 3-phosphate), tricarboxylic acid cycle-associated metabolites (citric acid and succinic acid), sugars (galactopyranose and arabinofuranose) and an unsaturated fatty acid (docosahexaenoic acid) were decreased in the OVX rats. While these studies comprehensively linked these metabolites to many important metabolic pathways, knowledge about the involvement of lipids in OVX rats is still limited. Because lipids are involved in energy storage, cellular structures, signal transduction and the regulation of physiological processes, as well as in the formation of many chronic diseases (Vinayavekhin et al., 2010), and because *C. comosa* has been demonstrated to lower lipid levels in OVX animals (Prasannarong et al., 2012), characterization of the lipid profile may provide a better understanding of the responses.

The present study applied a liquid chromatography (LC)–MS-based untargeted lipidomics approach to study the lipid changes in OVX rat serum with and without treatment with *C. comosa*. First, the changes in serum lipids associated with OVX rats were characterized to identify potentially novel biomarkers and link them to metabolic pathways. Subsequently, the levels of these specific modulated lipids were used to evaluate the effectiveness of the treatment of OVX rats with E₂, DPHD and *C. comosa* as either a crude ethanol extract or powder.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and plant materials

The preparation of standard *C. comosa* extract and isolation of DPHD were conducted as previously described (Suksamrarn et al., 2008; Tantikanlayaporn et al., 2013a). Briefly, *C. comosa* rhizomes were purchased from Kampaengsaen district, Nakornpathom, Thailand. A voucher herbarium specimen has been deposited at the Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok (SCMU No. 300). They were sliced into small pieces, dried and ground. The *C. comosa* extract was obtained by extracting *C. comosa* three times with 3 volumes of boiled ethanol (95%) at boiling point and removing the pooled solvent *in vacuo* to leave the dark brown viscous liquid. To obtain *C. comosa* fine powder, the dried ground *C. comosa* rhizomes were simply passed through a sieve no. 80. The composition of the *C. comosa* extract and *C. comosa* powder were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC)–ultraviolet (UV; 302 nm) fingerprints of the

major diarylheptanoids in the samples and compared with those in our records (Supplementary Information (SI), Fig. S1). The *C. comosa* extract and *C. comosa* powder contained 87.5 and 21.0 mg DPHD per gram, respectively. The E₂ was purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA) and was employed as a positive control.

2.2. Animal treatment and sample collection

All animal protocols were approved by the committee on Animal Care and Use, Faculty of Science, Mahidol University (protocol no. MUSC 56-031-293). Sprague-Dawley female rats (8 weeks old; body weight 200–220 g) were supplied by the National Laboratory Animal Center of Thailand (Salaya, Nakornpathom, Thailand). They were housed in standard stainless steel cages in rooms at a controlled temperature (approximately 25 ± 2 °C) and relative humidity (50–60%) under 12-h light/dark cycle with free access to food (rat pellets, C.P. rat feed, Pokphand Animal Fed Co. Ltd., Bangkok, Thailand) and water *ad libitum*. The rats were subjected to similar surgical procedures as described previously (Tantikanlayaporn et al., 2013b). They were randomly assigned to either (i) a sham operation (SHAM, n = 6) or bilateral ovariectomy (OVX, n = 36). The OVX rats were then randomly divided into one of the following six groups (n = 6 each) that received: (ii) no further treatment (OVX-control); (iii) 10 µg E₂/kg body weight (Bw), administered by subcutaneous (s.c.) injection (OVX+E₂); (iv) 50 mg DPHD/kg Bw, s.c. (OVX+DPHD); (v) 500 mg *C. comosa* extract/kg Bw, intragastric (i.g.) (OVX+E500); (vi) 1000 mg *C. comosa* powder/kg Bw, i.g. (OVX+P1000) and (vii) 2000 mg *C. comosa* powder/kg Bw, i.g. (OVX+P2000). The E₂ and DPHD were initially dissolved in absolute ethanol and then diluted in olive oil to give a final injection volume of approximately 100–200 µl. The extract and powder were directly suspended in 1% carboxymethyl cellulose to the specified concentration for oral ingestion of not more than 1 ml. All treatments were given daily for 12 weeks as indicated. The treatment doses used in this study were based on earlier observations that these doses can protect against the adverse effects observed in OVX animals, including hyperlipidemia, impairment of vascular relaxation and bone loss (Intapad et al., 2012; Prasannarong et al., 2012; Tantikanlayaporn et al., 2013b). In addition, the *C. comosa* extract at 500 mg/kg Bw and *C. comosa* powder at 2000 mg/kg Bw contained an approximately equal amount of DPHD as in the DPHD dosage (50 mg/kg Bw) used in this study. At the end of the treatment period, animals were fasted overnight (12 h) and put under anesthesia for collecting blood samples by injecting Zoletil 100[®] (tiletamine HCl/ zolazepam HCl, Virbac Laboratories, Carros, France) intraperitoneally

(i.p.) at a dose of 20 mg/kg Bw following pretreatment with Xylavet[®] (xylazine, Thai Meiji Pharmaceutical, Bangkok, Thailand) at 5 mg/kg Bw, i.p. Blood was collected from the posterior vena cava and the serum, retrieved by centrifugation at 2000×*g* at 4 °C for 10 min, was stored at −80 °C until analysis.

2.3. Lipid extraction and analysis

Lipid extraction was performed as previously reported (Saghatelian et al., 2004) with modification. Briefly, a serum sample (100 μ l) in a glass vial was extracted with a mixture of chloroform (2 ml), methanol (1 ml) and 1% NaCl solution (900 μ l), followed by centrifugation at 2500×*g*, 4 °C for 5 min. The organic layer (bottom) was carefully transferred to a new glass vial, dried under a stream of nitrogen, and placed at −20 °C for storage.

For analysis, samples (50 μ l in 160 μ l chloroform) were quantified by LC–MS in both the positive and negative ion modes as previously described (Vinayavekhin et al., 2015).

2.4. LC–MS untargeted data analysis

The total ion chromatograms obtained from the seven groups of samples with five to six replicates each were analyzed in two steps. The first step involved automated data analysis by the XCMS program (Smith et al., 2006), which identifies, matches, and quantifies ions across all samples in the seven sample groups. As described previously (Vinayavekhin and Saghatelian, 2009; Vinayavekhin et al., 2015), XCMS provided average mass-to-charge ratio (*m/z*), retention time and integrated mass ion intensity (peak area; MSII) of each ion in each of the LC–MS chromatograms.

In the second step, a pairwise comparison was performed between the SHAM and OVX samples to identify ions associated with the estrogen-deficient conditions induced by ovariectomy. Each ion in the XCMS output files was subjected to the following filters: (i) statistical significance (*t*-test with $p < 0.05$), (ii) fold changes of ≥ 2 , and (iii) a minimum MSII of 5,000 in the elevated samples (which was approximately at the limit of detection of the instruments). Ions that passed these criteria were then inspected manually in the chromatograms to remove isotopic ions or any false positives on the final list.

2.5. Tandem MS experiments

Tandem MS analyses were performed on every ion on the final list as described previously (Vinayavekhin et al., 2015). However, some parameters were modified slightly in

this study to obtain the optimal spectral data. Active exclusion was set to be released after 0.30 min. Collision energies were set at 30 V for m/z 500.00, 45 V for m/z 1000.00 and 60 V for m/z 2000.00 with automatic interpolation from those of the two closest m/z values when the isolated ions did not have the exact value. Data were collected using a mass range of 50–1500 Da from lipid extracts (50 μ l) or chemical standards (500–625 pmol).

2.6. Evaluation of the effects of E_2 , DPHD, *C. comosa* extract and powder treatment

The MSII's of all ions on the final list were used for calculation of the fold changes between the treatment groups and the non-treated OVX rats. Statistical significance of the differences in the same ions between the groups were tested using the Student's *t*-test, accepting significance at the $p < 0.05$ level.

2.7. Multivariate data analysis

Multivariate data analysis was implemented using the default parameters on the SIMCA 14 software (Umetrics, Umeå, Sweden). The score plots of orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) model was generated on the positive- and negative-mode MS data obtained from the XCMS program (section 2.4), which had been centered and scaled to Pareto variance.

3. Results

In the present study, 12-week OVX rats were employed as the disease model to evaluate the therapeutic as well as prophylactic effect of *C. comosa* treatment. At 12 weeks after surgery, the average uterine weight of the OVX rats was markedly decreased compared to that of the SHAM control rats. Treatment of the OVX rats with any of the *C. comosa* components (DPHD, extract and powder) or E_2 caused the average uterine weights of the OVX rats to revert to that of the SHAM control group. The changes in the OVX rats including the body weight gain, hyperlipidemia and bone loss (data not shown), and the improvement of these conditions after treatment were all consistent with those described earlier (Prasannarong et al., 2012; Tantikanlayaporn et al., 2013b).

3.1. Untargeted lipidomics of ovariectomized rats

Untargeted lipidomics analysis was performed on the serum extracts of the OVX rats compared to those of the SHAM control. Lipids in the serum were extracted with a 2:1 (v/v) ratio of chloroform: methanol and analyzed by LC–MS using untargeted lipidomics platforms

(Vinayavekhin and Saghatelian, 2009). This allowed the detection of a broad species of lipids from fatty acids to phospholipids, sphingolipids and glycerolipids.

To identify lipids associated with the OVX-induced estrogen-deficient conditions, the lipid profiles of the OVX group were compared to those of the SHAM control using the XCMS program (Smith et al., 2006). Lipid ions were marked as likely involved in the condition only if they were upregulated or downregulated by two-fold or more with statistical significance ($p < 0.05$), and if these differences could be distinctly visualized in the extracted ion chromatograms (Fig. 1). Using these criteria, we observed obvious grouping at week-12 post-surgery in the positive and negative ion modes, leading to unbiased identification of 4 and 75 ions with increased levels, and 50 and 5 ions with decreased levels in the OVX samples in the positive and negative ion modes, respectively (Fig. 2).

Subsequently, structural characterization of the changed ions following OVX was attempted manually using the combination of data from the accurate mass, tandem mass spectra and retention times (SI, Fig. S2). Structures could be assigned to 41 of the 75 OVX-induced upregulated ions in the negative ion mode, which appeared to be in the families of 1-O-alkenyl-lysophosphatidylethanolamine (lysoplasmalogen; alkenyl-LPE), lysophosphatidylethanolamine (LPE), ceramide-1-phosphate (CerP), ceramide (Cer) and sphingomyelin (Cer-PC). In addition, structures were assigned to 25 of the 50 downregulated positive-mode ions, and were in the monoacylglycerol (MAG) and triacylglycerol (TAG) families (Fig. 1 and Table 1, with the side chains listed in random order without distinguishing between the *sn*-1 and *sn*-2 substituents). The characterization of Cer was also validated by reference standards (SI, Fig. S2). Ten other ions in total from either mode were also fully or partially characterized. However, because these ten ions were the sole lipids in each respective family with differential levels, they were not examined further here. Including these 10 other ions, 57% of the OVX-associated ions were potentially identified in this study.

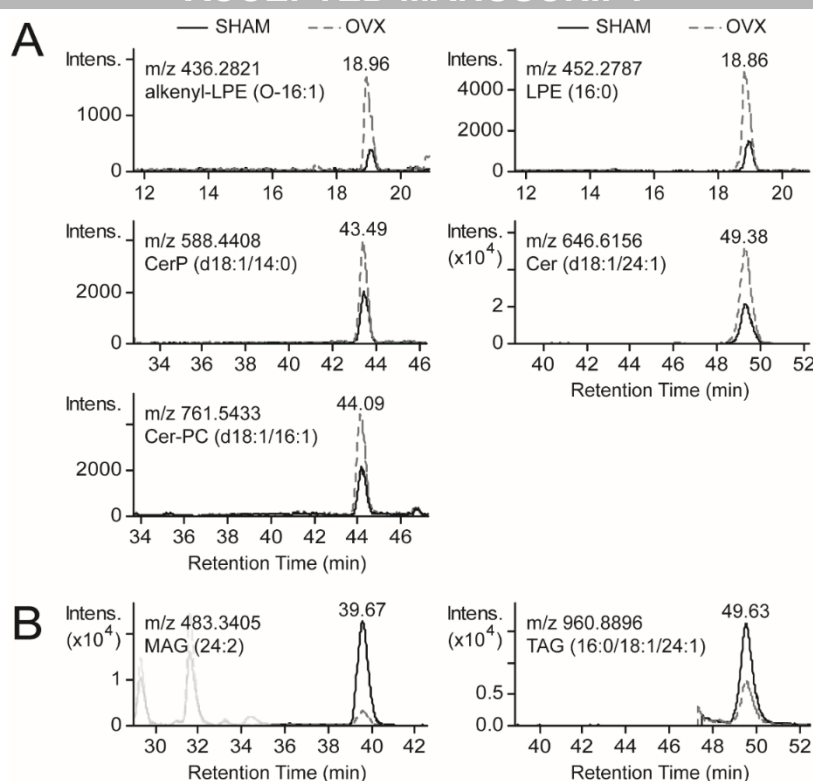


Fig. 1. Extracted ion chromatograms of representative ions from each lipid class with (A) elevated or (B) decreased levels in the OVX samples (dashed line) compared to the SHAM controls (solid line). Abbreviations: 1-O-alkenyl-lysophosphatidylethanolamine (alkenyl-LPE), lysophosphatidylethanolamine (LPE), ceramide-1-phosphate (CerP), ceramide (Cer), sphingomyelin (Cer-PC), monoacylglycerol (MAG) and triacylglycerol (TAG). Chromatographs shown are representative of those seen in 5–6 independent trials.

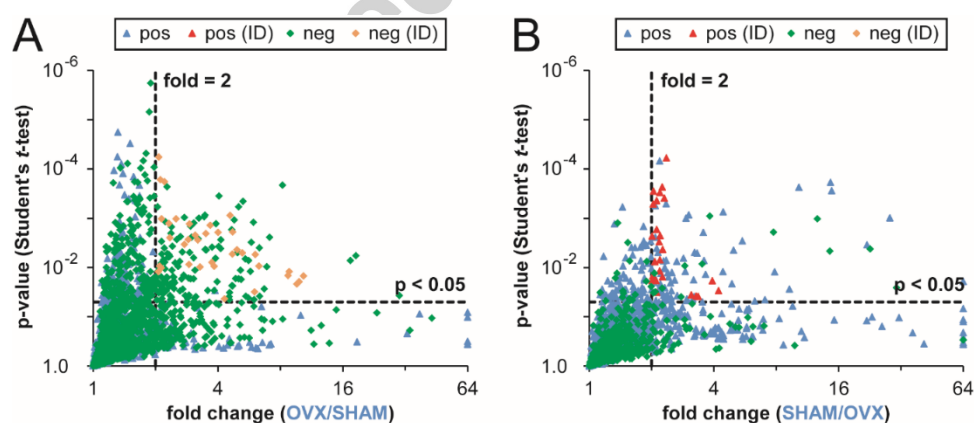


Fig. 2. Untargeted lipidomics analyses of serum from OVX and SHAM rats. Each data point represents a lipid ion with an average mass ion intensity above 5000 counts in the (A) OVX or (B) SHAM rats, plotted as a function of its statistical significance (Student's *t*-test) and the fold change of the (A) OVX/SHAM or (B) *vice versa*. Positive (pos)- and negative (neg)-mode mass spectrometric ions are denoted by blue triangles and green diamonds, respectively, with the statistically-significant differential ions identified (ID) with red and orange symbols, respectively.

Table 1. Relative level of identified lipids

Lipid class acyl chain	Ion	m/z	RT (min)	Fold ^{a,b} (OVX/)					
				SHAM	OVX+ E ₂	OVX+ DPHD	OVX+ E500	OVX+ P1000	OVX+ P2000
Lipids elevated in the OVX rats									
Alkenyl-LPE									
O-16:1	[M - H] ⁻	436.3	19.2	10.3*	2.0	4.6*	11.6*	18.3*	12.0*
O-18:2	[M - H] ⁻	462.3	19.4	9.9*	2.1	5.3*	10.2*	17.0*	12.9*
LPE									
16:0	[M - H] ⁻	452.3	19.1	5.0 [‡]	1.0	2.7*	3.6*	8.6 [‡]	5.8 [‡]
18:0	[M - H] ⁻	480.3	19.7	9.6*	1.6	6.3*	7.0*	15.8*	9.5*
18:2	[M - H] ⁻	476.3	19.1	3.8 [‡]	0.9	2.2*	3.0*	6.1 [‡]	4.6 [‡]
18:1	[M - H] ⁻	478.3	19.3	8.8*	1.3	3.6*	5.1*	10.5*	7.1*
20:4	[M - H] ⁻	500.3	19.2	6.1 [‡]	1.0	2.4*	3.0*	7.2 [‡]	4.6 [‡]
CerP									
d18:1/14:0	[M - H] ⁻	588.4	43.6	2.1 [§]	1.4 [‡]	2.1 [‡]	5.3 [§]	3.0 [§]	3.2 [§]
Cer									
d18:1/16:0	[M - H] ⁻	536.5	46.3	2.3 [‡]	2.1 [‡]	2.1 [‡]	2.0 [‡]	2.1 [‡]	2.1 [‡]
d18:1/18:0	[M - H] ⁻	564.5	47.3	2.9 [‡]	2.0 [‡]	2.3 [‡]	3.8 [‡]	2.8 [‡]	2.8 [‡]
d18:1/20:0	[M - H] ⁻	592.6	48.3	3.7 [‡]	2.8*	2.2*	3.9 [‡]	3.6 [‡]	2.6*
d18:1/22:0	[M - H] ⁻	620.6	49.3	3.1 [‡]	2.2 [‡]	2.2*	2.8 [‡]	2.5 [‡]	2.1 [‡]
d18:1/23:0	[M - H] ⁻	634.6	49.9	2.8 [‡]	1.9*	2.6 [‡]	2.7 [‡]	2.6 [‡]	2.2 [‡]
d18:1/22:1	[M - H] ⁻	618.6	48.5	4.7 [‡]	2.8*	3.3 [‡]	5.4 [‡]	4.8 [‡]	3.7 [‡]
d18:1/23:1	[M - H] ⁻	632.6	49.1	4.0 [‡]	2.3 [‡]	3.4 [‡]	5.0 [‡]	4.8 [‡]	3.8 [‡]
d18:1/24:1	[M - H] ⁻	646.6	49.4	3.2 [‡]	2.0*	2.1*	2.6 [‡]	2.5 [‡]	1.9*
d18:1/25:1	[M - H] ⁻	660.6	50.0	3.3 [‡]	2.1*	3.3 [‡]	3.4 [‡]	3.0*	2.8*
Cer-PC									
d18:1/16:1	[M - H + 62] ⁻	761.5	44.1	2.1 [§]	1.5 [‡]	2.3 [‡]	5.4 [§]	2.9 [§]	3.3 [§]
d18:1/18:1	[M - H + 62] ⁻	789.6	45.5	2.1 [‡]	1.7 [‡]	2.1 [‡]	4.7 [§]	2.4 [‡]	2.5 [§]
d18:1/22:0	[M - H + 62] ⁻	861.7	48.2	2.9 [‡]	1.5	2.0 [§]	4.0 [§]	2.2 [§]	2.7 [§]
Lipids decreased in the OVX rats									
MAG									
22:0	[M + 2Na - H] ⁺	459.3	40.1	3.1*	6.9	3.3	2.1	0.5*	1.0
24:0	[M + 2Na - H] ⁺	487.4	41.8	4.2*	5.5	3.4	2.1	0.8	1.0
24:2	[M + 2Na - H] ⁺	483.3	39.6	3.3*	6.0	3.2*	1.8	0.6	1.0
24:1	[M + 2Na - H] ⁺	485.4	40.6	3.4*	4.8	3.1	2.0	0.7	1.2
26:4	[M + 2Na - H] ⁺	507.3	39.6	3.9*	14.4	3.7	2.3	0.5	1.2
TAG									
18:0/18:1/20:0	[M + NH ₄] ⁺	934.9	49.4	2.1 [§]	1.9	0.9	3.6*	1.3	2.2
18:2/20:1/20:1	[M + NH ₄] ⁺	956.8	49.1	2.0 [§]	1.8	1.1	3.2*	1.2	2.2
18:2/20:0/20:1	[M + NH ₄] ⁺	958.9	49.3	2.4 [§]	2.4	0.9	4.0*	1.3	2.4
16:0/18:1/24:1	[M + NH ₄] ⁺	960.9	49.6	2.3 [§]	2.2	0.8	3.9*	1.2	2.1
16:0/18:1/24:0	[M + NH ₄] ⁺	962.9	49.9	2.1 [‡]	1.9	0.8	3.4*	1.2	2.1
18:2/18:2/24:0	[M + NH ₄] ⁺	984.9	49.5	2.2 [§]	2.0	0.8	3.7*	1.3	2.3
18:1/18:2/24:0	[M + NH ₄] ⁺	986.9	49.8	2.3 [§]	2.1	0.7	3.6*	1.2	2.0
18:1/18:1/24:0	[M + NH ₄] ⁺	988.9	50.1	2.2 [‡]	2.1	0.6	3.3*	1.1	1.8
18:0/18:1/24:0	[M + NH ₄] ⁺	990.9	50.4	2.1 [‡]	1.8	0.6	2.8	1.1	1.7
18:3/20:4/24:0	[M + NH ₄] ⁺	1006.9	49.2	2.0 [§]	1.7	0.9	2.8*	1.4	2.3*
18:2/20:4/24:0	[M + NH ₄] ⁺	1008.9	49.5	2.0 [‡]	1.6	0.8	2.9*	1.3	2.1*
18:3/20:2/24:0	[M + NH ₄] ⁺	1010.9	49.7	2.2 [‡]	1.6	0.8	3.2*	1.4	2.2
18:2/20:2/24:0	[M + NH ₄] ⁺	1012.9	49.9	2.3 [‡]	1.9	0.6	3.2*	1.2	2.0
18:2/20:1/24:0	[M + NH ₄] ⁺	1014.9	50.2	2.2 [‡]	2.0	0.5*	2.9	1.0	1.7
18:1/20:1/24:0	[M + NH ₄] ⁺	1016.9	50.6	2.2*	2.0	0.5*	2.6	0.9	1.5
18:2/20:1/26:2	[M + NH ₄] ⁺	1038.9	50.2	2.0*	1.4	0.6	2.5	1.2	1.6
18:2/20:1/26:1	[M + NH ₄] ⁺	1040.9	50.4	2.3*	1.8	0.5*	2.5	1.0	1.6
18:1/22:1/24:0	[M + NH ₄] ⁺	1045.0	51.1	2.0*	1.9	0.4*	2.2	0.8	1.3
18:2/24:1/24:1	[M + NH ₄] ⁺	1069.0	51.0	2.1*	1.8	0.5*	2.5	0.9	1.5

Other Lipids in the Pathway

Lipid class acyl chain	Ion	m/z	RT (min)	Fold ^{a,b} (OVX/)					
				SHAM	OVX+ E ₂	OVX+ DPHD	OVX+ E500	OVX+ P1000	OVX+ P2000
DAG									
34:2	[M + NH ₄] ⁺	610.5	43.6	1.2	1.0	0.8	0.4 [‡]	1.0	0.5
36:4	[M + NH ₄] ⁺	634.5	43.3	1.1	1.1	0.9	0.6 [†]	1.2	0.7
36:3	[M + NH ₄] ⁺	636.6	44.0	1.1	1.0	0.8	0.5 [‡]	1.2	0.6
36:2	[M + NH ₄] ⁺	638.6	44.3	1.0	0.9	0.7	0.5 [§]	0.9	0.6
38:5	[M + NH ₄] ⁺	660.6	44.0	1.3	1.4	0.9	0.6 [‡]	1.3	0.6
Sphingosine	[M + H] ⁺	300.1	27.7	1.0	1.0	0.9	0.9	1.1	0.9

Abbreviations: mass-to-charge ratio (m/z), retention time (RT), 1-O-alkenyl-lysophosphatidylethanolamine (alkenyl-LPE), lysophosphatidylethanolamine (LPE), ceramide-1-phosphate (CerP), ceramide (Cer), sphingomyelin (Cer-PC), monoacylglycerol (MAG), diacylglycerol (DAG) and triacylglycerol (TAG).

^aFold value represents the ratio of the average mass ion intensity of OVX and that of the indicated sample group and *vice versa* (in italics).

^bStudent's *t*-test: *, *p* < 0.05; †, *p* < 0.01; ‡, *p* < 0.005; §, *p* < 0.001; *N* = 5–6.

3.2. Effects of E₂, DPHD, *C. comosa* extract and powder on OVX rats

Given that a potential therapeutic agent for the OVX-induced estrogen-deficient conditions should be capable of causing the levels of lipids in the OVX group to revert to those in the SHAM control rats, the levels of OVX-associated lipids were measured in the serum of OVX rats after treatment with E₂, DPHD, *C. comosa* extract and powder. The only lipid class affected by treatment with 10 µg E₂/kg Bw (OVX+E₂) was Cer, where E₂ treatment returned the levels of most Cer species close to those found in the SHAM control (Fig. 3 and Table 1). Treatment with 50 mg DPHD/kg Bw (OVX+DPHD) significantly lowered the levels of all OVX-upregulated lipid classes (alkenyl-LPE, LPE, CerP, Cer and Cer-PC), although it did not equalize the levels of some lipids to those of the SHAM group. Interestingly, when the OVX rats were treated with *C. comosa* extract at 500 mg/kg Bw (OVX+E500) or *C. comosa* powder at 2000 mg/kg Bw (OVX+P2000), which contained almost the same amount of DPHD as that in the DPHD treatment, the levels of most lipids were reverted to a greater extent than with DPHD alone, reaching levels that were either very close to or slightly lower than those of the SHAM control rats. The treatment with *C. comosa* powder at half of the dose (1000 mg/kg Bw; OVX+P1000) also yielded similar results. Lastly, the only treatment that could effectively increase the amount of some species of the OVX-downregulated lipids (MAG and TAG) was *C. comosa* extract, whereas the levels of these glycerolipids were mostly unaffected by the other treatments. Together, the data suggest the effectiveness of using DPHD, *C. comosa* powder or, especially, *C. comosa* extract for recovering the changes in serum lipid levels that resulted from estrogen deficiency in the OVX rats.

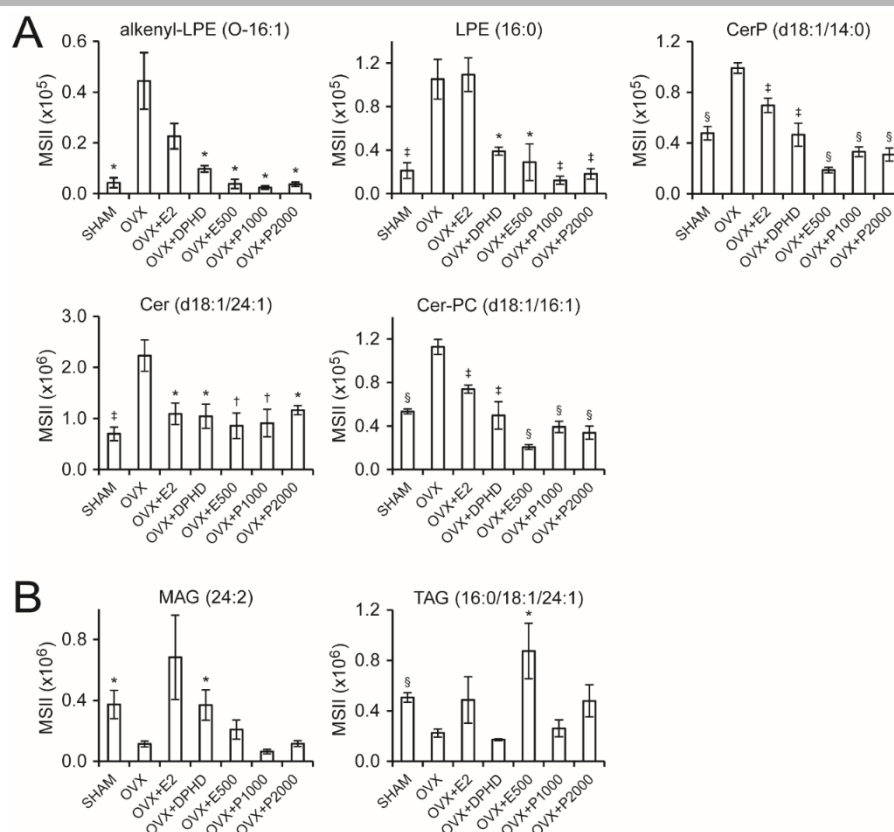


Fig. 3. Serum levels of representative (A) upregulated and (B) downregulated ions from each lipid class in the OVX rats after a 12-week daily treatment with E_2 (OVX+ E_2), DPHD (OVX+DPHD), *C. comosa* extract (OVX+E500) or powder (OVX+P1000 and OVX+P2000), compared to those receiving no treatment (OVX) or controls (SHAM). The graphs indicate the average mass ion intensities (MSII) $\pm$ standard errors of the mean. Student's *t*-test (vs. OVX): *, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$; ‡, $p < 0.005$; §, $p < 0.001$; $N = 5-6$. Abbreviations: 1-*O*-alkenyl-lysophosphatidylethanolamine (alkenyl-LPE), lysophosphatidylethanolamine (LPE), ceramide-1-phosphate (CerP), ceramide (Cer), sphingomyelin (Cer-PC), monoacylglycerol (MAG) and triacylglycerol (TAG).

3.3. Multivariate data analysis of the lipid profiles of all sample groups

Even though the treatments with E_2 , DPHD, *C. comosa* extract and powder were shown to alter the levels of some lipids, only the OVX-dependent lipid classes were investigated in the previous section, thereby providing a limited picture of these sample groups. To obtain a broader picture, we reanalyzed the acquired lipidomics data using an OPLS-DA statistical model to determine the similarities or differences between the sample groups as a whole. The scores were plotted for both the positive- and negative-mode MS data as a function of the first (PC1) and second (PC2) principal components, respectively (Fig. 4). For the positive-mode data, the model established a goodness of fit (R^2) of 0.484 and predictability (Q^2) of 0.231, explaining 53.0% of the predictive variation in the samples with

four components and 12.1% of the orthogonal (uncorrelated) variation with one component. Visually, the plot did not show differences between the OVX and SHAM groups. Treatments with either E₂ or DPHD also did not produce any significant effects. However, when the OVX rats were treated with *C. comosa* extract or powder, a metabolic shift from the SHAM and OVX groups was evidenced, suggesting a possible influence of other compounds in *C. comosa* on the overall lipid profiles of the rat serum.

For the negative-mode data, the OPLS-DA analysis gave an R² of 0.763 and Q² of 0.264, explaining 36.8% of the predictive variation in the samples with six components and 43.4% of the orthogonal variation with three components (Fig. 4). Despite the poor predictive ability, which might result from the multi-group classification, the model demonstrated a clear distinction between the OVX and SHAM groups on the score plot in contrast to the results from the positive-mode MS data. Treatment with E₂ also indicated some metabolic alterations from the OVX group. Interestingly, in the treatments with pure DPHD, *C. comosa* extract and powder at both concentrations, the serum lipid data were all clustered towards the right side of the plot with the SHAM samples and away from the OVX samples. These data corroborate well with the findings that DPHD, as well as the *C. comosa* extract and powder, could partially revert the metabolic levels of the estrogen-deficient OVX rats to those of the normal state.

Next, to provide additional statistical evidence that the treatment with E₂, DPHD, *C. comosa* extract and powder truly shifted the negative-mode lipid profiles of the treatment groups closer to that of the SHAM than the OVX rats, pairwise OPLS-DA analyses of the negative-mode MS data were modeled between either OVX or SHAM as a control and the rest of the data sets (Fig. 4). The model between OVX and the rest of the groups yielded a strong fit and predictability (*i.e.*, the values greater than 0.5) with R² of 0.983 and Q² of 0.657, explaining 11.1% of the predictive variation with one component and 63.1% of the uncorrelated variation with six components. On the other hand, when the SHAM control group was modeled against the rest of the groups, the groupings became visually more disperse and less predictive with an R² of 0.682 and Q² of 0.231, explaining 4.62% and 45.4% of the predictive (one component) and orthogonal (two components) variations in the samples, respectively. The statistical models, therefore, indicated the lipid movements of all treatment groups towards the SHAM control levels. Together, all the data suggested the possibility for applying the untargeted lipidomics approach to evaluate the effectiveness of treatment by *C. comosa* components, and that it may be extended to other traditional medicines in the future.

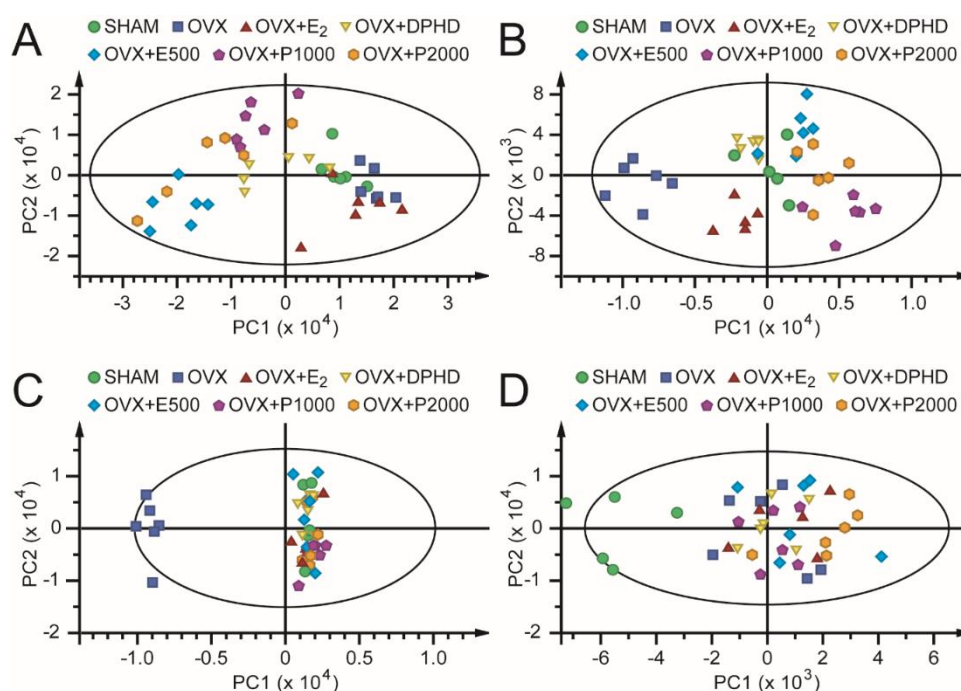


Fig. 4. Score plots of the OPLS-DA models of serum (A) positive-mode or (B–D) negative-mode mass spectrometric data as a function of the first (PC1) and second (PC2) principal components. The analyses were implemented either (A, B) by considering each of the seven sample groups as its own group (multi-group classification), or by modeling (C) OVX or (D) SHAM against the six other sample groups. Each spot denotes an independent subject: green circle, SHAM; dark blue square, OVX; red up-pointing triangle, OVX+E₂; yellow down-pointing triangle, OVX+DPHD; blue diamond, OVX+E500; purple pentagon, OVX+P1000; orange hexagon, OVX+P2000.

4. Discussion

Herbal materials in traditional medicine contain many potentially bioactive components, including phytochemicals. To dissect the mechanisms behind the treatments, one appropriate approach is to focus on evaluating the system as a whole, rather than on individual components. We, therefore, applied untargeted lipidomics strategies to evaluate the metabolic consequences of the treatment of estrogen-deficient OVX rats with *C. comosa* components (DPHD, *C. comosa* extract and powder).

Unlike targeted lipidomics, where only certain species of lipids are selected for measurement, untargeted lipidomics allows an unbiased quantitation of broad classes of known and unknown lipids alike, making it suitable for discovery of novel biological insights (Saghatelian et al., 2004). In this study, the untargeted lipidomics analysis identified ether lipids (alkenyl-LPE), glycerophospholipids (LPE), and sphingolipids (CerP, Cer and Cer-PC) to be upregulated in the OVX group, whereas glycerolipids (MAG and TAG) were

downregulated. These lipids are all connected according to the KEGG pathway database (Ogata et al., 1999) and can be interconverted to one another via certain intermediates as shown in Fig. 5. It is noteworthy that despite their role as key connecting metabolites, our lipidomics data suggest that the sphingosine levels remained unaltered upon OVX (Table 1), whereas sphingosine-1-phosphate likely existed in such a low quantity that it eluded our detection. Being a non-lipid metabolite, phosphoethanolamine has also never been reported to be changed in any other previous metabolomics studies (Ma et al., 2011, 2013; Zhu et al., 2010).

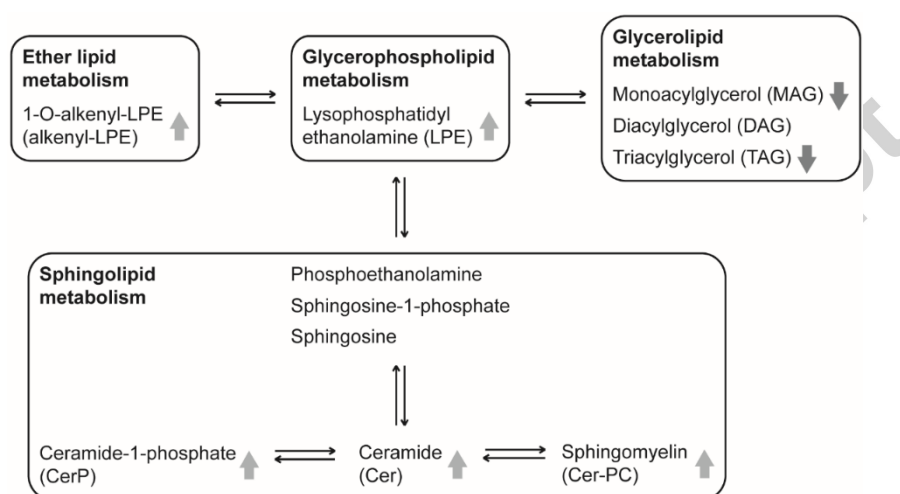


Fig. 5. Regulation of sphingolipid, ether lipid, glycerophospholipid and glycerolipid metabolism by estrogen deprivation. The block arrows denote lipids with statistically-significant increased (upward arrows) or decreased (downward arrows) levels under estrogen-deficient conditions.

Even though this study utilized a novel approach, it was not surprising that Cer and other sphingolipids were upregulated in response to estrogen deficiency, since Cer is a known modulator of cellular metabolism and nutrient homeostasis (Bikman and Summers, 2011). In particular, Cer was found to antagonize the cellular uptake of the three major dietary metabolites (glucose, fatty acids and amino acids) by downregulating their syntheses or their corresponding protein transporters, such as the glucose transporter 4 (GLUT4), fatty acid translocase (CD36) and amino acid transporter 2 (SNAT2), respectively (Bikman and Summers, 2011). Such inhibitions should then lead to elevation in the levels of these key nutrients in serum, which is consistent with the previous metabolomics data in the OVX and SHAM rats mentioned above (Ma et al., 2011, 2013). In addition, such nutrient starvation

was also shown to kill cells, linking its impact on cellular metabolism to its other function as an inducer of apoptosis and the implications in numerous diseases, such as obesity, diabetes, cardiovascular diseases, Alzheimer's and cancer (Chaurasia and Summers, 2015; Yuyama et al., 2014), which have been reported to be associated with increased serum Cer levels.

Likewise, the upregulation of alkenyl-LPE can also be linked to estrogen depletion but, in this case, via platelet-activating factor (PAF; 1-*O*-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine). As an initiator for the biosynthesis of PAF, alkenyl-LPE (or lysoplasmalogen) assists in generating the PAF precursor, 1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso PAF), by accepting an arachidonoyl moiety from 1-alkyl-2-arachidonoyl-glycerophosphocholine via a transacylation reaction. The lyso PAF is then converted by acyltransferase to produce PAF (Snyder et al., 1997), which acts via a G-protein-coupled PAF receptor to mediate various biological processes, such as platelet activation and hypertension. The linkage between PAF, estrogen deficiency and osteoporosis was established when bone resorption was shown to be significantly attenuated following OVX in the PAF receptor-deficient mice (Hikiji et al., 2004). Our observation that alkenyl-LPE was elevated in the OVX rats, therefore, supports this connection.

Because of their roles as signaling molecules, lysophosphatidic acid (LPA) and lysophosphatidylcholine (LPC) are among the best characterized lysophospholipids, and are known to exert their actions through G protein-coupled receptors (GPCR) (Schmitz and Ruebsaamen, 2010). On the other hand, LPE has rarely been mentioned, so it was possible that the observed elevation in the LPE levels in the OVX group might not have any significant effect on its own but rather acts through other structurally-similar metabolites in the glycerophospholipid pathway. Nevertheless, it was recently demonstrated that LPE stimulates an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in MDA-MB-231 breast cancer cells via the LPA_1 and CD97 GPCRs (Park et al., 2013), which are associated with cell migration and proliferation.

One of the discrepancies between our data and previous reports is in the comparative levels of TAG. Using commercial kits, a 1.3-fold *increase* in serum TAG concentrations was previously reported in OVX rats compared to the SHAM controls (Ma et al., 2011). In contrast, in this LC-MS-based assay, the opposite trend of a 2.0- to 2.4-fold *decrease* in serum TAG levels under estrogen-deficient conditions was noted (Table 1). This disparity might originate from the two differences in the setup as (i) the period after ovariectomy when serum was collected from animals (at week 6 in the previous report vs. at week 12 in this study) and (ii) the measured TAG levels (total TAG in the previous report vs. individual

species in this study). The relative contribution of each of these factors to the discrepancy requires further investigation. Apart from the above literature, other works with the OVX rats at different time points after OVX reported no significant changes in the serum total TAG levels compared to the SHAM controls (Armamento-Villareal et al., 2005; Black et al., 1994; Martins-Maciel et al., 2013), suggesting possible effects of experimental procedures and treatment on the observed TAG response to ovariectomy.

Given that E₂ is the major estrogen secreted from the ovary, the treatment of the OVX group with E₂ was expected to reverse the levels of lipids back to the “normal” state found in the SHAM group. However, only the Cer levels were affected by the E₂ treatment in this study, which likely contributed to the observed grouping in the score plot of the negative-mode data obtained from the OPLS-DA analysis, where the OVX+E₂ data was clustered in-between those of the OVX and the SHAM. While these results were unexpected, they are consistent with a previous report that the total TAG levels remained unaltered upon treatment of OVX rats with E₂ (Black et al., 1994). In addition, the amount of E₂ used for treatment in this study was a pharmacological dose, based on its ability to protect bone loss (Tantikanlayaporn et al., 2013b), and might play a role in modulating OVX-associated lipids.

The lipid profiles revealed a better response of the OVX rats treated with *C. comosa* extract or powder than those treated with the pure DPHD compound. It is possible that the observed response might arise from the fact that the *C. comosa* extract or powder also contained other less-studied diarylheptanoids (Suksamrarn et al., 2008), which then asserted an additive or synergistic effect.

5. Conclusions

In summary, using untargeted lipidomics analysis as a discovery tool, this study identified lipids in the sphingolipid, ether lipid, glycerophospholipid and glycerolipid metabolism pathways as novel biomarkers for estrogen-deficient conditions induced by ovariectomy. Subsequent evaluation of the therapeutic potential of *C. comosa* in the OVX rats revealed that *C. comosa* extract and powder gave a superior performance over E₂ and DPHD in terms of both the comparative table of individual lipid species and the OPLS-DA score plot of negative-mode data. Moreover, because Cer were the only lipids affected by the E₂ treatment, it could also suggest the increased Cer levels as a potential cause of metabolic disturbance under estrogen deprivation, an effect which was reversed by *C. comosa* treatment. Future work will aim to dissect the mechanisms underlying alterations in the levels of these lipids, especially Cer, and to determine the potential additive or synergistic effects

from other compounds in *C. comosa*. We believe that the LC–MS-based lipidomics platforms and biomarkers presented in this work can be utilized as tools for evaluating other modern and traditional medicines in this model organism and in general in the future.

Author contribution

Nawaporn Vinayavekhin conducted and coordinated the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. Jetjamnong Sueajai conducted the animal experiments and multivariate data analysis. Nichaboon Chaihad and Ratchanee Panrak conducted the experiments and analyzed the data. Apichart Suksamrarn and Ratchanaporn Chokchaisiri prepared and provided all *C. comosa* compounds. Polkit Sangvanich discussed the experiments and the manuscript. Pawinee Piyachaturawat coordinated and discussed the experiments and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank Chulalongkorn Academic Advancement into Its 2nd Century Project for the financial support to acquire instruments. This study was supported by the Thailand Research Fund (DBG5680005 and IRN-58W0004). We are grateful to Asst. Prof. Dr. Kanet Wongravee for valuable discussion on the OPLS-DA statistical model; Prof. Dr. Chumpol Pholpramool (Mahidol University) and Dr. Robert Douglas John Butcher (Office of Research Affairs, Chulalongkorn University) for editorial help; and Sitthiporn Associates Co., Ltd. for providing us with the Waters Alliance e2695 high performance LC. The funding agencies did not have any role in the collection, analysis or interpretation of data, writing of the report or the decision to submit the paper for publication.

References

- Anonymous, 1967. Pramuan Sapakun Ya Thai, Part 3, Wat Prachetupon (Wat Poh), Bangkok, Thailand.
- Armamento-Villareal, R., Sheikh, S., Nawaz, A., Napoli, N., Mueller, C., Halstead, L.R., Brodt, M.D., Silva, M.J., Galbiati, E., Caruso, P.L., Civelli, M., Civitelli, R., 2005. A new selective estrogen receptor modulator, CHF 4227.01, preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res.* 20, 2178–2188.

- Beral, V., Banks, E., Reeves, G., 2002. Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet* 360, 942–944.
- Bhukhai, K., Suksen, K., Bhummaphan, N., Janjorn, K., Thongon, N., Tantikanlayaporn, D., Piyachaturawat, P., Suksamrarn, A., Chairoungdua, A., 2012. A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3 β protein-dependent activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 36168–36178.
- Bikman, B.T., Summers, S.A., 2011. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest.* 121, 4222–4230.
- Black, L.J., Sato, M., Rowley, E.R., Magee, D.E., Bekele, A., Williams, D.C., Cullinan, G.J., Bendele, R., Kauffman, R.F., Bensch, W.R., et al., 1994. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* 93, 63–69.
- Chaurasia, B., Summers, S.A., 2015. Ceramides - lipotoxic inducers of metabolic disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 538–550.
- Chiang, K.P., Niessen, S., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., 2006. An enzyme that regulates ether lipid signaling pathways in cancer annotated by multidimensional profiling. *Chem. Biol.* 13, 1041–1050.
- Gross, R.W., Han, X.L., 2006. Unlocking the complexity of lipids: using lipidomics to identify disease mechanisms, biomarkers and treatment efficacy. *Future Lipidol.* 1, 539–547.
- Hikiji, H., Ishii, S., Shindou, H., Takato, T., Shimizu, T., 2004. Absence of platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy. *J. Clin. Invest.* 114, 85–93.
- Homan, E.A., Kim, Y.G., Cardia, J.P., Saghatelian, A., 2011. Monoalkylglycerol ether lipids promote adipogenesis. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 5178–5181.
- Hu, C.X., van der Heijden, R., Wang, M., van der Greef, J., Hankemeier, T., Xua, G.W., 2009. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 2836–2846.
- Intapad, S., Saengsirisuwan, V., Prasannarong, M., Chuncharunee, A., Suvitayawat, W., Chokchaisiri, R., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 2012. Long-term effect of phytoestrogens from *Curcuma comosa* Roxb. on vascular relaxation in ovariectomized rats. *J. Agric. Food Chem.* 60, 758–764.

- Lethaby, A., Suckling, J., Barlow, D., Farquhar, C.M., Jepson, R.G., Roberts, H., 2004. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: Endometrial hyperplasia and irregular bleeding. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD000402.
- Ma, B., Liu, J., Zhang, Q., Ying, H., A, J., Sun, J., Wu, D., Wang, Y., Li, J., Liu, Y., 2013. Metabolomic profiles delineate signature metabolic shifts during estrogen deficiency-induced bone loss in rat by GC-TOF/MS. *PLoS One* 8, e54965.
- Ma, B., Zhang, Q., Wang, G.J., A, J.Y., Wu, D., Liu, Y., Cao, B., Liu, L.S., Hu, Y.Y., Wang, Y.L., Zheng, Y.Y., 2011. GC-TOF/MS-based metabolomic profiling of estrogen deficiency-induced obesity in ovariectomized rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 270–278.
- Martins-Maciel, E.R., Campos, L.B., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., 2013. Raloxifene affects fatty acid oxidation in livers from ovariectomized rats by acting as a pro-oxidant agent. *Toxicol. Lett.* 217, 82–89.
- Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 2002. Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 1–28.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., Kanehisa, M., 1999. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 27, 29–34.
- Park, S.J., Lee, K.P., Kang, S., Chung, H.Y., Bae, Y.S., Okajima, F., Im, D.S., 2013. Lysophosphatidylethanolamine utilizes LPA(1) and CD97 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell. Signal.* 25, 2147–2154.
- Piyachaturawat, P., Charoenpiboonsin, J., Toskulkao, C., Suksamrarn, A., 1999. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. *J. Ethnopharmacol.* 66, 199–204.
- Pongboonrod, S., 1976. Mai Thed, Muang Thai. Kasembanakit Press, Bangkok, Thailand.
- Prasannarong, M., Saengsirisuwan, V., Piyachaturawat, P., Suksamrarn, A., 2012. Improvements of insulin resistance in ovariectomized rats by a novel phytoestrogen from *Curcuma comosa* Roxb. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 28.
- Saghatelian, A., Trauger, S.A., Want, E.J., Hawkins, E.G., Siuzdak, G., Cravatt, B.F., 2004. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry* 43, 14332–14339.
- Schmitz, G., Ruebsaamen, K., 2010. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 208, 10–18.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787.

- Snyder, F., Lee, T.-c., Blank, M.L., 1997. Plasmalogens: Their metabolism and central role in the production of lipid mediators, in: Richard, W.G. (Ed.), *Adv. Lipobiol.* JAI, pp. 261–286.
- Suksamrarn, A., Ponglikitmongkol, M., Wongkrajang, K., Chindaduang, A., Kittidanairak, S., Jankam, A., Yingyongnarongkul, B.E., Kittipanumat, N., Chokchaisiri, R., Khetkam, P., Piyachaturawat, P., 2008. Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Biorg. Med. Chem.* 16, 6891–6902.
- Tantikanlayaporn, D., Robinson, L.J., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., Blair, H.C., 2013a. A diarylheptanoid phytoestrogen from *Curcuma comosa*, 1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-ol, accelerates human osteoblast proliferation and differentiation. *Phytomedicine* 20, 676–682.
- Tantikanlayaporn, D., Wichit, P., Weerachayaphorn, J., Chairoungdua, A., Chuncharunee, A., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 2013b. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. *PLoS One* 8, e78739.
- Vinayavekhin, N., Homan, E.A., Saghatelian, A., 2010. Exploring disease through metabolomics. *ACS Chem. Biol.* 5, 91–103.
- Vinayavekhin, N., Mahipant, G., Vangnai, A.S., Sangvanich, P., 2015. Untargeted metabolomics analysis revealed changes in the composition of glycerolipids and phospholipids in *Bacillus subtilis* under 1-butanol stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5971–5983.
- Vinayavekhin, N., Saghatelian, A., 2009. Regulation of alkyl-dihydrothiazole-carboxylates (ATCs) by iron and the pyochelin gene cluster in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* 4, 617–623.
- Weerachayaphorn, J., Chuncharunee, A., Jariyawat, S., Lewchalermwong, B., Amonpatumrat, S., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 2010. Protection of centrilobular necrosis by *Curcuma comosa* Roxb. in carbon tetrachloride-induced mice liver injury. *J. Ethnopharmacol.* 129, 254–260.
- Weerachayaphorn, J., Chuncharunee, A., Mahagita, C., Lewchalermwongse, B., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 2011. A protective effect of *Curcuma comosa* Roxb. on bone loss in estrogen deficient mice. *J. Ethnopharmacol.* 137, 956–962.
- Wenk, M.R., 2005. The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 594–610.

- Winuthayanon, W., Piyachaturawat, P., Suksamrarn, A., Ponglikitmongkol, M., Arao, Y., Hewitt, S.C., Korach, K.S., 2009a. Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant *Curcuma comosa*: Biologic actions in vitro and in vivo indicate estrogen receptor-dependent mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 117, 1155–1161.
- Winuthayanon, W., Suksen, K., Boonchird, C., Chuncharunee, A., Ponglikitmongkol, M., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 2009b. Estrogenic activity of diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. requires metabolic activation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 840–845.
- Yuyama, K., Mitsutake, S., Igarashi, Y., 2014. Pathological roles of ceramide and its metabolites in metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 793–798.
- Zhu, X., Liu, X., He, P., Cao, B., Lv, Y., Zhang, W., Ni, X., 2010. Metabolomics in serum of ovariectomised rats and those exposed to 17 β -oestradiol and genistein. *Gynecol. Endocrinol.* 26, 760–767.

Figure 1

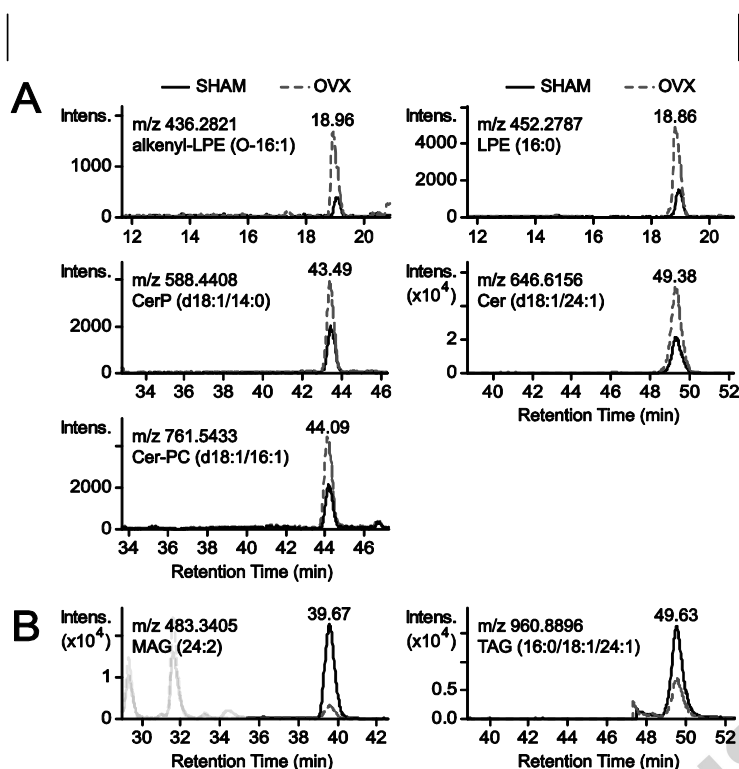


Figure 2

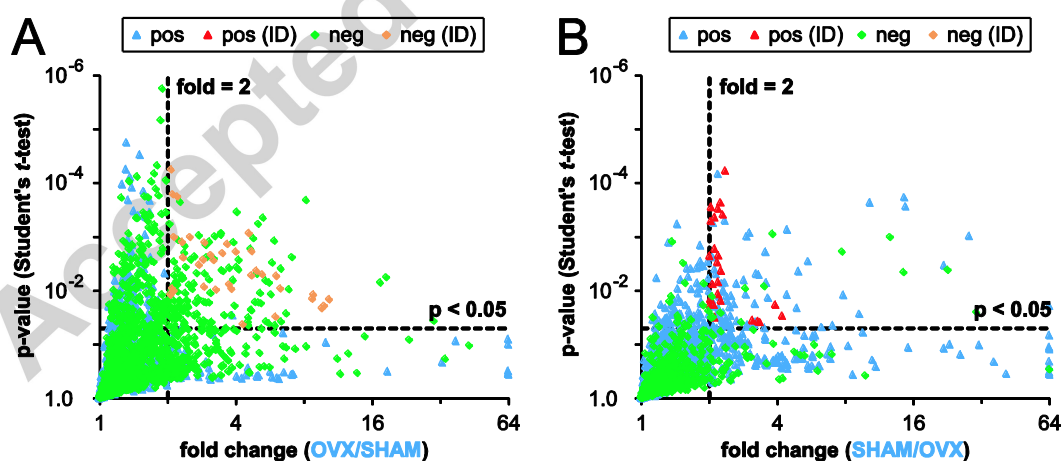


Figure 3

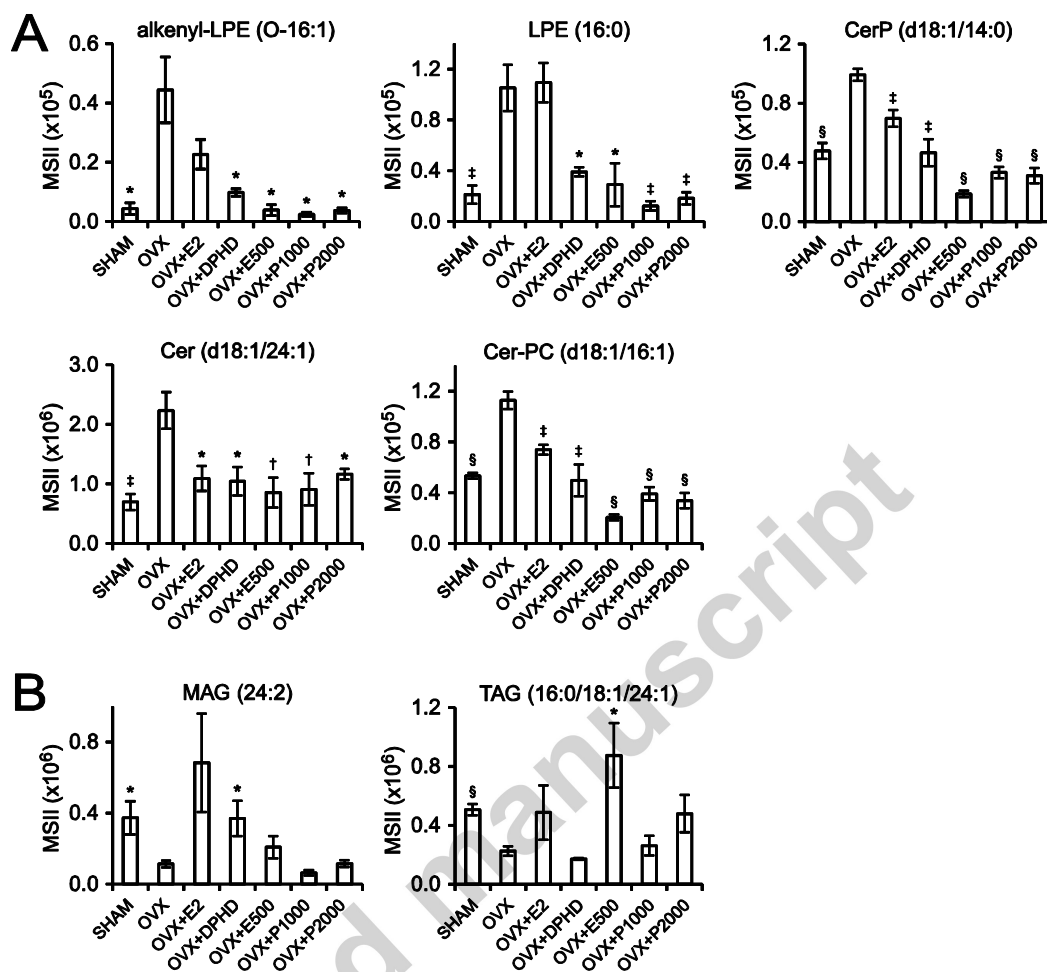


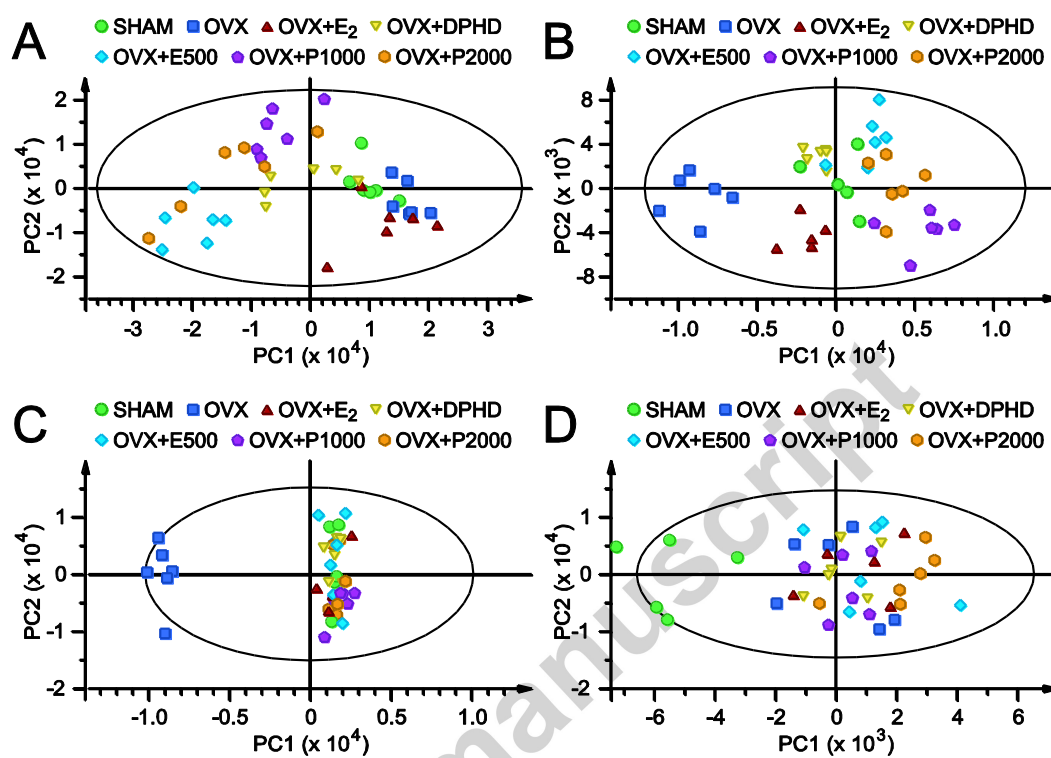
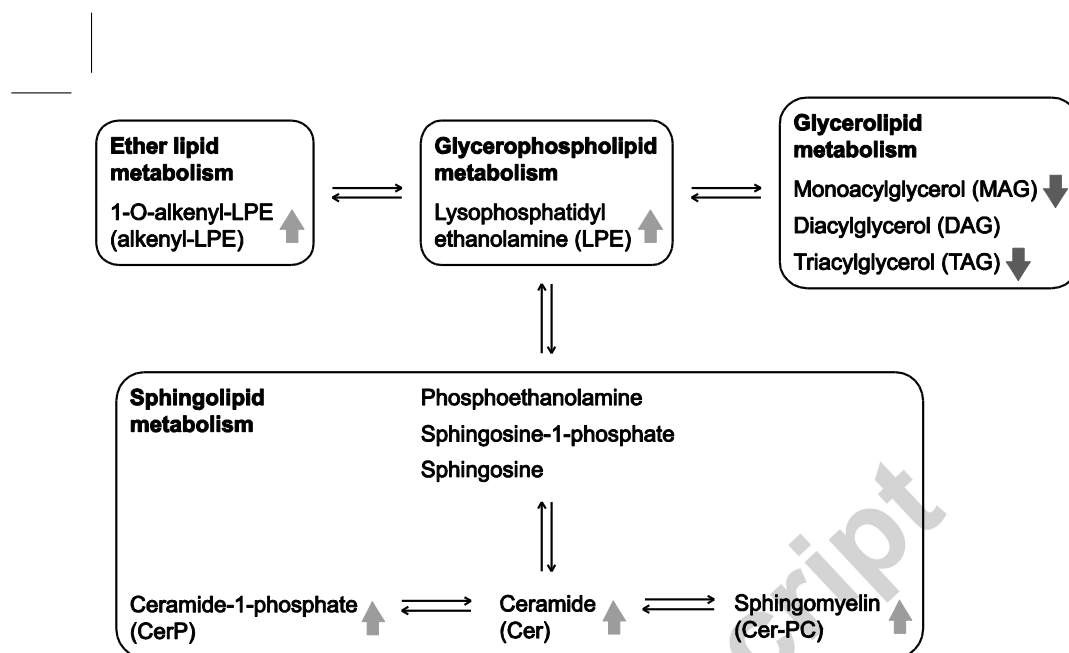
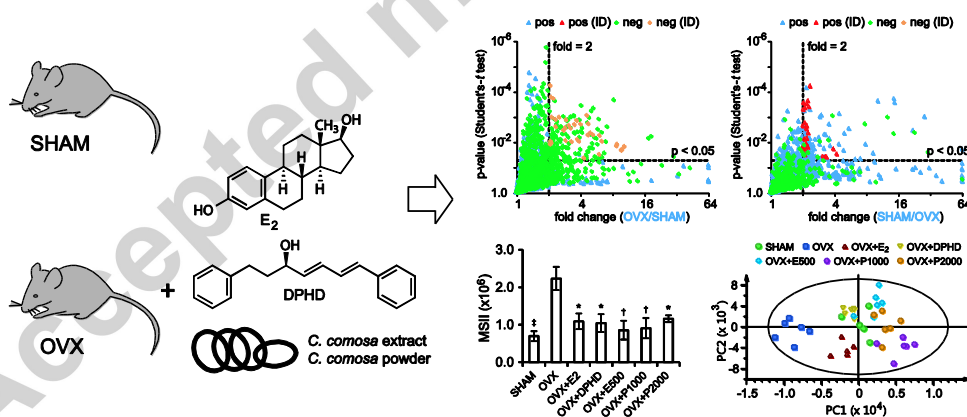
Figure 4

Figure 5



Graphical Abstract



Bone Sparing Effect of a Novel Phytoestrogen Diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in Ovariectomized Rats

Duangrat Tantikanlayaporn¹, Patsorn Wichit¹, Jittima Weerachayaphorn¹, Arthit Chairoungdua¹, Aporn Chuncharunee², Apichart Suksamrarn³, Pawinee Piyachaturawat^{1*}

1 Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, **2** Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand, **3** Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand

Abstract

Phytoestrogens have been implicated in the prevention of bone loss in postmenopausal osteoporosis. Recently, an active phytoestrogen from *Curcuma comosa* Roxb, diarylheptanoid (DPHD), (3*R*)-1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol, was found to strongly promote human osteoblast function *in vitro*. In the present study, we demonstrated the protective effect of DPHD on ovariectomy-induced bone loss (OVX) in adult female Sprague-Dawley rats with 17 β -estradiol (E₂, 10 μ g/kg Bw) as a positive control. Treatment of OVX animals with DPHD at 25, 50, and 100 mg/kg Bw for 12 weeks markedly increased bone mineral density (BMD) of tibial metaphysis as measured by peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT). Histomorphometric analysis of bone structure indicated that DPHD treatment retarded the ovariectomy-induced deterioration of bone microstructure. Ovariectomy resulted in a marked decrease in trabecular bone volume, number and thickness and these changes were inhibited by DPHD treatment, similar to that seen with E₂. Moreover, DPHD decreased markers of bone turnover, including osteocalcin and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity. These results suggest that DPHD has a bone sparing effect in ovariectomy-induced trabecular bone loss and prevents deterioration of bone microarchitecture by suppressing the rate of bone turnover. Therefore, DPHD appears to be a promising candidate for preserving bone mass and structure in the estrogen deficient women with a potential role in reducing postmenopausal osteoporosis.

Citation: Tantikanlayaporn D, Wichit P, Weerachayaphorn J, Chairoungdua A, Chuncharunee A, et al. (2013) Bone Sparing Effect of a Novel Phytoestrogen Diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in Ovariectomized Rats. PLoS ONE 8(11): e78739. doi:10.1371/journal.pone.0078739

Editor: Brenda Smith, Oklahoma State University, United States of America

Received: April 18, 2013; **Accepted:** September 16, 2013; **Published:** November 11, 2013

Copyright: © 2013 Tantikanlayaporn et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Thailand Research Fund (TRF) through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (grant PHD/0103/2549 to DT and PP), the Strategic Basic Research Grant of TRF (to PP and to AS), the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research and Universities Initiative, and The National Research Council of Thailand. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pawinee.pia@mahidol.ac.th

Introduction

Osteoporosis is a serious worldwide health problem that primarily effect middle-aged and elderly women [1,2]. It is characterized by reduced bone mass and the deterioration of bone microarchitecture leading to increase the risk of bone fragility and fracture [3]. An accelerated rate of bone resorption in menopausal and post-menopausal women is associated with reduced levels of the hormone estrogen [4]. Recently, efforts to reduce bone loss in menopausal osteoporosis have been focused on compounds with the potential to preserve bone mass through inhibition of osteoclastic bone resorption or stimulation bone formation [5]. Among therapeutic agents, estrogen is the most effective compound and is capable of limiting bone loss and reducing the rate of bone fractures in postmenopausal women [6,7]. However, long-term treatment with estrogen is limited due to its carcinogenic risk and feminizing effects.

Phytoestrogens, non-steroidal plant-derived compounds with estrogenic activity, have received increased interest as estrogen alternatives to alleviate bone loss. Studies have suggested that a diet rich in phytoestrogen may relieve menopausal symptoms and

protect against estrogen-associated diseases, including breast cancers, cardiovascular diseases, and osteoporosis [8,9]. Isoflavones, such as genistein and daidzein the major phytoestrogens in soybeans, are the most extensively studies phytoestrogens. These compounds inhibit osteoclast bone resorption and suppress osteoclast activity and survival *in vitro* [10,11]. In addition, isoflavones have been identified as naturally occurring selective estrogen receptor modulators (SERMs) and as bone-sparing agents [12,13]. The known properties of phytoestrogens suggest that these compounds may be alternatives to estrogen for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women.

Curcuma comosa Roxb. (*C. comosa*), a plant in Zingiberaceae family, has been widely used as a dietary supplement for relieving postmenopausal symptoms in Thailand [14]. Consistent with the presence of a phytoestrogen, hexane extract of *C. comosa* rhizomes prevent bone loss in estrogen deficient mice [15]. Diarylheptanoid, (3*R*)-1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol (hereafter DPHD), a novel phytoestrogen isolated from *C. comosa* [16] has several pharmacological properties including estrogenic-like activity [17,18] and anti-inflammatory effects [19]. Recently, DPHD was found to activate Wnt/ β -catenin signaling and promote mouse

preosteoblastic (MC3T3-E1) cell proliferation through the estrogen receptor pathway [20]. Similarly, human osteoblast cell differentiation and function were also enhanced upon DPHD treatment [21] suggesting that DPHD may have a beneficial effect in preventing bone loss in patients experiencing estrogen deficiency.

The biological activities of DPHD appear to be selective with anabolic effects predominantly on osteoblasts. We hypothesized that DPHD may have a beneficial effect in preventing bone loss due to estrogen deficiency. In the present study, we investigated the bone sparing effect of DPHD in ovariectomized-rats that exhibit estrogen deficiency. The effect of DPHD on bone mineral density (BMD), changes to bone microarchitecture, and biochemical markers of bone turnover were determined after a 12-week course of treatment. Our analysis provides mechanistic insight into the beneficial effects of the phytoestrogen DPHD in reducing bone loss in estrogen deficient rats and suggests a potential clinical use for DPHD in menopausal women.

Materials and Methods

The animal experimental protocol was approved by the committee on Animal Care and Use, Faculty of Science, Mahidol University (approval protocol number: MUSC-171). All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of National Laboratory Animal Center, Mahidol University.

Chemicals and Plant Materials

Preparation of phytoestrogen diarylheptanoid (3*R*)-1,7-diphenyl-(4*E*,6*E*)-4,6-heptadien-3-ol (DPHD) from *C. comosa* was performed as previously described [16,21]. Rhizomes of *C. comosa* were purchased from the Kampaengsaen district, Nakhon Pathom province, Thailand. No specific permission is required for these activities and the field study did not involve endangered or protected species. Briefly, rhizomes were cut into small pieces, dried and ground to powder then extracted with *n*-hexane in a Soxhlet extractor. After removal of the solvent *in vacuo*, a pale brown viscous oil was obtained. The DPHD was isolated from the hexane extract as a major component (23.9%) by repeated silica gel column chromatography. DPHD was eluted with hexane-dichloromethane and each step utilized an increasing quantity of the more polar solvent. The structure of DPHD was confirmed and the absolute stereochemistry at the 3-position was determined to be *R* by nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy, the same as that of DPHD previously isolated [16]. The purity of the isolated material was assessed by TLC and NMR spectroscopy and estimated to be 99% pure. The chemical structure is shown in Figure 1A.

17 β -estradiol (E_2) and *p*-nitrophenyl phosphate were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (MO, USA). Methyl methacrylate, 2-ethoxyethyl acetate and orange G were obtained from Merck Company (Darmstadt, Germany). Haematoxylin, fushin acid, and DePex mounting medium were purchased from VWR International Ltd. (Poole, England). All compounds were initially dissolved in 5% DMSO and diluted in olive oil to the final doses.

Animals and Treatments

Eight-week-old female Sprague-Dawley rats, weighing 200–220 g, were supplied by the National Laboratory Animal Centre of Thailand (Salaya, Nakornpathom, Thailand). Animals were housed in standard stainless steel cages under controlled conditions: temperature at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of 50–60%, a 12-h light/dark cycle, and allowed free access to food (rat pellets, C.P.

rat feed, Pokphand Animal Fed Co. Ltd., Bangkok, Thailand) and water. Rats were randomly assigned to sham-operated control and ovariectomized (OVX) groups. In OVX animals, both sites of ovaries, which are the primary source of endogenous estrogen, were removed under general anesthesia using pentobarbital sodium (50 mg/kg Bw, *i.p.*). Animals were allowed to recover from surgery for one week prior to use in experiments. Rats were divided into six groups of six to eight animals each as follows: sham operated control receiving vehicle (olive oil); OVX rats receiving vehicle (olive oil, *i.p.*); OVX rats receiving DPHD at doses of 25, 50 and 100 mg/kg Bw (*i.p.*); OVX rats receiving 17 β -estradiol (E_2) at a dose of 10 $\mu\text{g/kg}$ Bw (*s.c.*) as a positive control. DPHD and E_2 were daily administered for 12 weeks and body weights were recorded weekly. All rats were given subcutaneous injections of 10 mg/kg calcein, a fluorochrome bone marker, on Day 7 and Day 1 before animals were sacrificed. At the end of treatments, animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital. Serum was collected and stored at -70°C until use and the uterus was removed and weighed. Tibial bones were excised, kept in saline-soaked gauze, covered with plastic and stored at -20°C prior to analysis.

Measurement of Bone Mineral Density (BMD)

The bone mineral density of left tibia was measured *ex vivo* by peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT; XCT Research SA⁺, Stratec Medizintechnik GmbH., Germany) according to a previously protocol [22]. In brief, both the trabecular and cortical bone density were scanned in cross-sectional plane at metaphyseal sites of tibias. Proximal tibial metaphysis was measured 2 mm below the growth plate. All bones were scanned at 0.5 mm intervals using a voxel size of 0.09 mm $\times$ 0.09 mm $\times$ 0.09 mm. The trabecular bone was determined using contour mode 2 and peel mode 2 with a threshold value of 720 mg/cm³. The cortical bone was determined using separation mode 2 with a threshold value of 900 mg/cm³. All parameters were analyzed using XCT-5.50E software (Stratec Medizintechnik GmbH., Germany).

Bone Histomorphometric Analysis

All bone histomorphometries were conducted at the proximal metaphyseal region of the right tibia. The adhering tissues and bone marrow were removed from tibias followed by fixation for 3 days in 70% (vol/vol) ethanol, as previously described [23]. Bones were then dehydrated in 95, and 100% (vol/vol) ethanol for 3 and 2 days, respectively, followed by embedding and undecalcification in methyl methacrylate resin at 42°C for 48 h. To obtain 7 μm and 12 μm thick sections, the embedded tibia was cut in longitudinal section using a microtome (model RM2255; Leica, Nussloch, Germany). The region of tibial studied was the secondary spongiosa, the trabecular part of proximal tibia, at 1–2 mm distal to the epiphyseal plate and extending to 6 mm. The 7 μm sections were deplasticified in 2-ethoxyethyl acetate and stained with Goldner's trichrome then analyzed under bright field microscopy. The structural variables were examined using the histology section and parameters measured include trabecular bone volume, normalized by tissue volume (BV/TV, %), trabecular number (Tb.N, mm⁻¹), trabecular thickness (Tb.Th, μm) and trabecular separation (Tb.Sp, μm). The 12 μm sections of proximal tibia were left unstained to determine the mineral apposition rate (MAR), an index of osteoblastic activity, calculated by dividing the mean distance between double labels of the calcein with time interval between the administration of the two labels. Bone formation rate (BFR/TV) is another dynamic parameter that is an index of bone turnover in general and bone formation in

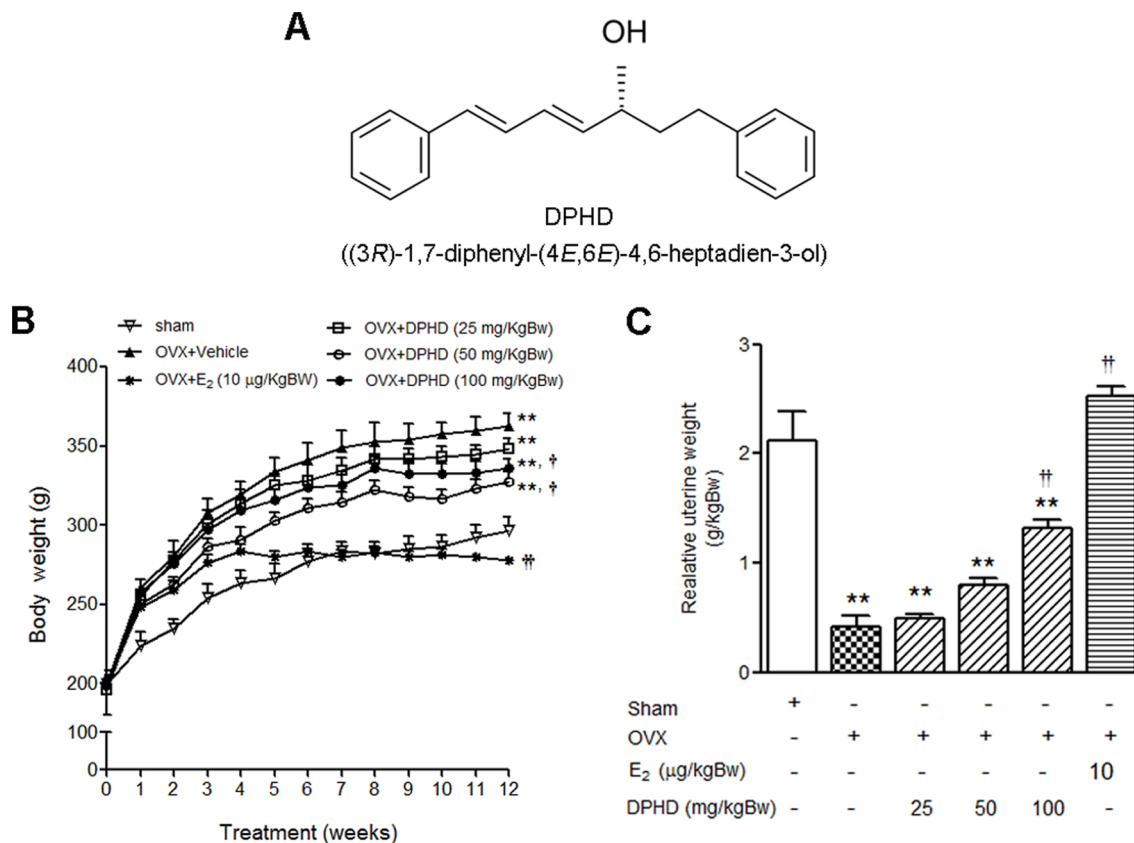


Figure 1. Estrogenic activity of DPHD compared to E₂. Structure of the phytoestrogen diarylheptanoid DPHD, (3R)-1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol, isolated from the rhizome of *C. comosa* (A). Effects of DPHD on body weight (B) and uterine weight (C) of sham-operated and ovariectomized (OVX) rats receiving vehicle and various doses of DPHD (25, 50 and 100 mg/kg Bw) or 17 β -estradiol (E₂, 10 µg/kg Bw) for 12 weeks. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM, n = 6–8. **p<0.01, significantly different from sham rats. †p<0.05 and ††p<0.01, significantly different from OVX rats.

doi:10.1371/journal.pone.0078739.g001

particular and allows for the determination of the age of bone [24]. All slides were analyzed under a light/fluorescent microscope using a computer assisted Osteomeasure system (Osteometric, Atlanta, GA), software version 4.1. Bone histomorphometric parameters were reported according to the American Society for Bone and Mineral Research Nomenclature Committee [25].

Serum Bone Biomarkers Assay

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity, a bone resorption marker, was determined by using microplate assay method. 4-nitrophenyl phosphate (4-NPP) was used as the substrate according to the procedure of Lau *et al.* with modification [26]. Serum was incubated for 30 min at 37°C with a substrate solution consisting of 7.6 µmol/L 4-NPP in 100 µmol/L sodium acetate buffer containing 50 µmol/L sodium tartrate (pH 5.5). 1 µmol/L NaOH was added to stop the reaction and the absorbance at 405 nm was monitored to detect product formation. Serum osteocalcin concentration, a bone turnover marker, was measured using an enzyme immunoassay (EIA) kit specific for rat osteocalcin (Biomedical Technology, Staughton, IN, USA).

Statistical Analysis

All data are expressed as means $\pm$ SEM and were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Newman-Keuls post-hoc test using SPSS for Windows, Version 17.0 (Chicago, IL, USA). A non parametric Wilcoxon-type test for trend (Cuzick's

Test for Trend) was employed for evaluation of the trend across the groups. Differences were considered statistical significant at p<0.05.

Results

Effects of Ovariectomy and DPHD Treatment on Body Weight and Uterine Weight

All rats exhibited an increase in body weight during the 12 weeks of treatment, particularly in OVX rats. As shown in Figure 1B, at the end of experiment, the body weight gain was consistently highest in OVX control. However, the increases in body weights of OVX rats was suppressed by treatment with E₂ (10 µg/kg Bw) to levels similar to the sham controls. Treatments of OVX rats with DPHD at doses of 50 and 100 mg/kg BW also significantly decreased body weight compared to OVX controls. However, the effect of DPHD on body weight was not as pronounced as that seen with E₂ (Figure 1B). These results indicate that DPHD partially suppressed body weight gain in OVX rats. The uterine weights of OVX rats was also changed but in this case a significant decrease was observed when compared to sham controls (p<0.01). Uterine weight was increased in OVX rats following treatment with estrogen and DPHD, though a significant increase was only observed at 100 mg/kg Bw of DPHD (p<0.01) (Figure 1C).

Effects of DPHD on *ex vivo* Bone Mineral Density (BMD)

Both total and trabecular bone mineral density (BMD) of tibial metaphysis were markedly decreased in OVX rats (at 12 weeks) compared to those of sham controls (Figure 2A and 2B, respectively). E_2 treatment (10 $\mu\text{g/kg}$ Bw) effectively prevented the decreases in total and trabecular BMD. Treatments with DPHD at doses of 25, 50, and 100 mg/kg Bw also prevented the decrease in total and trabecular BMD compared to the OVX group given the vehicle control. Similar to the effect observed for body weight, treatment with DPHD did not restore BMD to the level seen in the sham-operated group. Interestingly, DPHD had no effect on the cortical BMD of tibial metaphysis though a protective effect was observed with E_2 (Figure 2C). These findings suggest that DPHD predominantly only protects against trabecular bone loss, while E_2 effectively prevents the loss of both trabecular and cortical bones.

Effects of DPHD on Bone cross Sectional Area and Thickness

In Table 1, the total, trabecular and cortical bone cross sectional areas (CSA) of tibia are shown. In OVX rats, total and trabecular CSA of tibia were increased by 12% and 20%, respectively, compared to sham controls. Treatment with E_2 , and DPHD at doses of 50 and 100 mg/kg Bw prevented the increases in cross sectional area. However, there was no significant change in cortical area and thickness.

Effects of DPHD on Trabecular Bone Microarchitectural Changes

Both static and dynamic changes in histomorphometry of the proximal tibial metaphysis were evaluated. The growth plate and spongiosa region of the proximal tibia of sham, OVX, OVX+DPHD (100 mg/kg Bw), and OVX+ E_2 (10 $\mu\text{g/kg}$ Bw) rats are shown in Figure 3A. Compared to the sham rats, a decrease in trabecular bone and connectivity was observed in OVX rats indicating that ovariectomy resulted in the deterioration of trabecular bone microstructure. However, treatment with E_2 completely protected against this deterioration with partial protection observed with DPHD treatment. Ovariectomy also induced a marked decrease in the trabecular bone volume (BV/TV) compared to that of the sham rats (73% reduction) (Figure 3C) and again treatment with E_2 completely restored trabecular bone volume to levels seen in the sham controls. All doses of DPHD significantly increased BV/TV (Figure 3C) and trabecular number (Tb.N) ($p < 0.05$) (Figure 3D) in OVX rats but these values were reduced compared to the sham and E_2 treated animals. DPHD treatment also increased trabecular thickness (Tb.Th) in OVX rats but significant difference was not observed at low dose of DPHD (25 mg/Kg Bw)-treated group (Figure 3E). Trabecular separation (Tb.Sp), another important structural index for static microstructural changes of bone, was markedly increased in OVX rats compared to sham controls. E_2 treatment was capable of significantly decreasing the separation of bone to the level seen in the sham controls. The Tb.Sp in animals treated with DPHD was also significantly reduced but were significantly higher than that for the sham control group (Figure 3F). These results suggest that DPHD treatment improved the connectivity of trabecular bone in the ovariectomized rats though to a lesser degree than treatment with E_2 .

The dynamic bone histomorphometry was assessed using fluorescence microscopy to monitor the uptake of calcein, a fluorochrome bone marker (Figure 3B). Bone formation and mineralization, expressed as mineral apposition rate (MAR), were

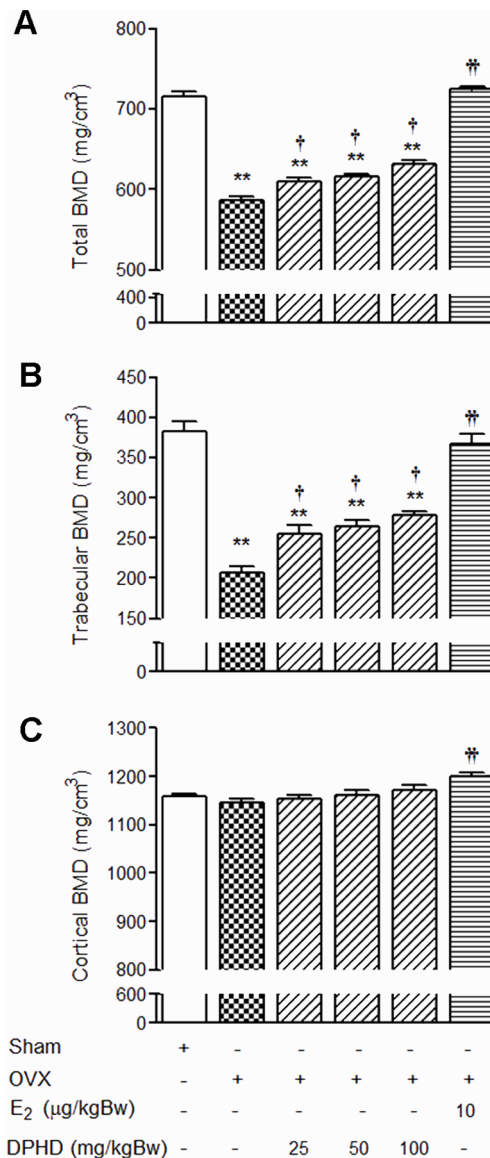


Figure 2. DPHD increases *ex vivo* bone mineral density (BMD), as measured by pQCT. Total (A), trabecular (B), and cortical (C) BMD of tibial metaphysis from sham-operated and ovariectomized (OVX) rats receiving vehicle, DPHD (25, 50 and 100 mg/kg Bw) or 17 β -estradiol (E_2 , 10 $\mu\text{g/kg}$ Bw) for 12 weeks. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 6-8$. ** $p < 0.01$, significantly different from sham rats. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$, significantly different from OVX rats. doi:10.1371/journal.pone.0078739.g002

determined by the distance between two fluorochrome markers given at different days and divided by the number of days between administrations. This index reflects the activity of osteoblasts. Compared to sham animals, MAR in OVX rats was significantly increased from 2.89 ± 0.2 to 3.98 ± 0.1 , indicating that ovariectomy caused an increase in new bone formation leading to increase bone turnover (Figure 3G).

Treatments with E_2 or DPHD at doses of 50, and 100 mg/kg BW significantly decreased MAR to levels seen in the sham controls. Bone formation rate (BFR), an index of bone turnover provides the best correlation with the serum bone turnover markers [24], and the bone formation rate per total volume (BFR/TV) was significantly increased after ovariectomy (Figure 3H).

Table 1. Effect of DPHD on bone area and thickness of OVX rats.

Groups/Parameters	Total CSA (mm ²)	Trebecular CSA (mm ²)	Cortical CSA (mm ²)	Cortical thickness (mm)
Sham	14.61±0.38	7.89±0.30	6.21±0.14	0.68±0.011
OVX + Vehicle	16.50±0.50*	9.51±0.49*	6.41±0.11	0.70±0.010
OVX + DPHD (25 mg/kg)	16.15±0.42*	9.03±0.40*	6.45±0.12	0.70±0.005
OVX + DPHD (50 mg/kg)	14.99±0.39 [†]	8.36±0.15 [†]	6.02±0.12	0.69±0.006
OVX + DPHD (100 mg/kg)	14.72±0.44 [†]	8.12±0.39 [†]	5.91±0.13	0.69±0.005
OVX + E ₂ (10 µg/kg)	14.73±0.48 [†]	7.82±0.51 [†]	5.97±0.10	0.68±0.007

Total, trabecular, and cortical cross sectional area (CSA) and cortical thickness were measured from sham-operated and ovariectomized (OVX) rats receiving vehicle, DPHD (25, 50 and 100 mg/kg Bw) or 17β-estradiol (E₂, 10 µg/kg Bw) for 12 weeks. Data are expressed as mean ± SEM, n=6–8.

*p<0.05, significantly different from sham rats.

[†]p<0.05, significantly different from OVX rats.

doi:10.1371/journal.pone.0078739.t001

Similar to MAR, the increase in BFR/TV in OVX animals was effectively prevented by treatment with either E₂ or DPHD. The reduction of MAR and BFR in DPHD treated rats indicated that DPHD was capable of decreasing bone turnover rate in a similar manner as E₂.

Effects of DPHD Treatment on Biochemical Bone Turnover Markers

To evaluate the effect of E₂ and DPHD treatments on bone turnover in OVX rats, we measured the serum osteocalcin concentration and tartrate-resistant acid phosphatase activity. As shown in Figure 4A, the serum osteocalcin concentration in OVX rats was significantly higher than that in sham animals and DPHD treatment of OVX rats significantly reduced the serum osteocalcin concentration. These results indicate that DPHD prevents the ovariectomy-induced increase of bone turnover in rats. The TRAP activity of osteoclast, an index of bone resorption, was 25% higher in OVX rats compared to the sham group and DPHD treatment restored TRAP activity to level similar to those of Sham and E₂-treated groups (Figure 4B). Since the decreases in bone turnover and resorption markers are related to the suppression of bone formation rate, these results suggest that DPHD decreased the bone turnover rate by suppressing osteoclast activity in OVX rats.

Discussion

The present study has demonstrated for the first time of the bone sparing effect of a novel diarylheptanoid phytoestrogen (DPHD) isolated from *C. comosa*. In ovariectomy-induced osteopenia (OVX), a deterioration in trabecular bone microarchitecture (12 weeks after ovariectomy) clearly led to the loss of bone mass in rats. Treatments with DPHD effectively prevented the trabecular bone loss and improved bone microstructure. Moreover, markers of bone turnover, including osteocalcin and TRAP activity, were decreased in DPHD treated animals. These results suggest that DPHD provides a protective effect against OVX-induced bone loss that is associated with decreased bone turnover through suppressing bone resorption.

The integrity of skeletal is maintained through a bone remodeling process that balances bone formation and bone resorption [4] and estrogen plays an important role in the maintenance of bone mass [27]. The rapid decline of estrogens in postmenopausal women results in an imbalance in the bone remodeling process leading to osteoporosis [28]. Monitoring of BMD is important for diagnosis and the treatment of osteoporosis as decreased bone mass is a major characteristic of this disease. In

this study, decreased BMD in OVX rats, determined using pQCT was observed only in the metaphysis of the tibia, which has a greater proportion of trabecular bone in the proximal end. Trabecular bone, a sponge-like bone found at the ends of long bones and vertebrae, contains osteoblasts and osteoclast on its surface and is more active in bone turnover and bone remodeling compared to cortical bone [29,30]. Indeed, our analysis of OVX rats showed only loss of trabecular BMD. This finding is consistent with previous studies that report the loss of bone in adult OVX rats was more prominent in trabecular than cortical bone [31]. However the loss of trabecular BMD in OVX rats was attenuated by DPHD treatment. Consistent with reports that estrogen decreases periosteal bone formation and radial growth [32], OVX rats displayed an increase in cross sectional bone area indicating that radial growth was increased. Similar to estrogen, treatment with DPHD prevent the increase in bone area in OVX animals. The improvement in bone measurements following DPHD treatment may be partly attributed to its estrogenic like activity, as evidenced by increased uterine weight in DPHD exposed animals (Figure 1C) and our earlier study on uterotrophic activity of DPHD [17,18].

A rapid reduction in trabecular bone volume is known to occur following ovariectomy and is associated with an increase in bone turnover rate resulting from an excessive osteoclast activity [33]. Our analysis of the destruction of bone microarchitecture, another important characteristic of osteoporosis, evaluated using bone histomorphometry is consistent with an increased rate of bone turnover in OVX rats. Ovariectomy also markedly decreased static indices, including trabecular bone volume, thickness, and number with an increase in trabecular separation. In addition to direct effects on bone morphology, monitoring changes in circulating bone biochemical markers can also reveal the status of bone remodeling process [34]. These markers include osteocalcin, an osteoblast-specific bone formation marker, and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity, an osteoclast-specific bone resorption marker [34,35]. A dramatic increase in serum osteocalcin and TRAP activity was observed 12 weeks following ovariectomy, confirming that bone loss was due to an increase in bone turnover rate. DPHD reduced these markers of bone turnover in OVX rats suggesting that DPHD prevented trabecular bone loss and micro-architecture deterioration by suppressing the rate of bone turnover either by decreasing bone resorption or increasing bone formation.

DPHD at doses of 25 and 50 mg/kg BW preserved bone mass in OVX rats without showing an uterotrophic effect. These results indicate that the beneficial effect of DPHD on bone is not limited

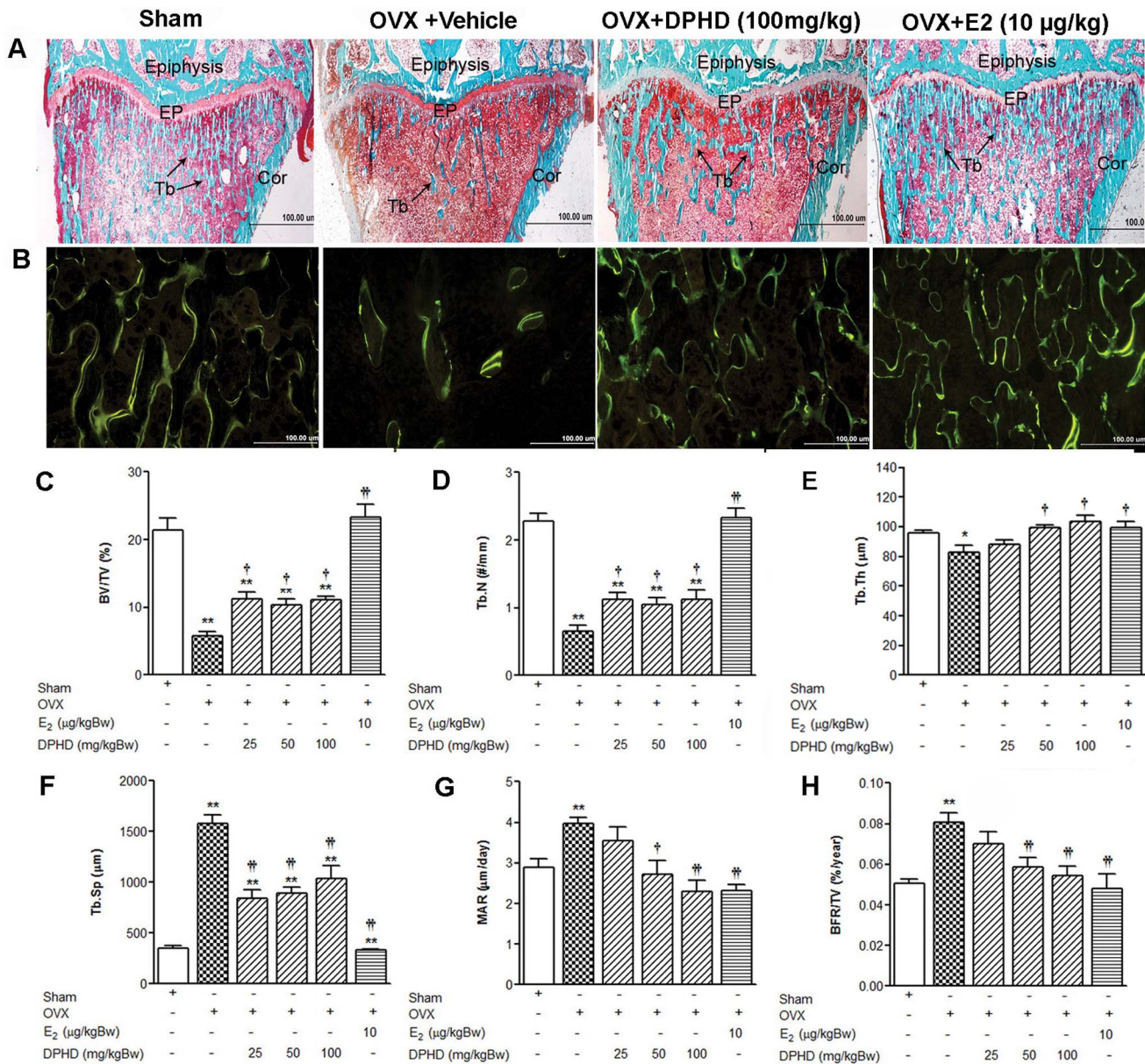


Figure 3. Reversal of OVX induced bone microarchitectural changes by DPHD treatment. Representative 2D images of the proximal tibial metaphysis (trabecular structure) of sham operated and OVX rats receiving vehicle, DPHD (DPHD 100 mg/kg Bw and 17β-estradiol (E₂, 10 μg/kg Bw) for 12 weeks. Samples were stained with Goldner's trichrome for bright-field microscopy at a magnification of 2X showing the following: epiphysis, epiphyseal plate (EP), trabecular bone (Tb), and cortical bone (Cor) (A). Fluorescence micrographs (calcein labeling) (B). Static parameters: trabecular bone volume normalized by tissue volume (BV/TV, %) (C), trabecular number (Tb.N, mm⁻¹) (D), trabecular thickness (Tb.Th, μm) (E), and trabecular separation (Tb.Sp, μm) (F). Dynamic parameters: mineral apposition rate (MAR) (G) and bone formation rate (BFR) (H). Data are expressed as the mean ± SEM, n = 6–8. **p < 0.01 significantly different from sham rats and †p < 0.05 and ††p < 0.01, significantly different from OVX rats. doi:10.1371/journal.pone.0078739.g003

to its estrogenic property but also mediate through other biological effects of DPHD, such as an anti-inflammatory activity [19]. Inflammation is one of the causal factors of osteoporosis and several cytokines, such as IL-1, M-CSF and RANKL, are involved in the pathogenesis of osteoporosis. The role of these cytokines is to activate osteoclast differentiation and bone resorption [36]. RANKL, a TNF family member, is synthesized by the osteoblast and is an essential cytokines for activation of osteoclast formation, function, and survival [37]. The interaction of RANKL and RANK stimulates the osteoclastogenesis, the coupling process between the osteoblast and osteoclast to control bone remodeling

[38]. Inhibiting the interaction of RANKL and RANK may have benefits in the treatment of osteoporosis and DPHD treatment reduces mRNA level of RANKL produced by osteoblast cells during differentiation [21]. The inhibitory effect of DPHD on RANKL may in turn attenuate the interaction of RANKL and RANK and subsequently reduce the downstream inflammatory cytokine induced osteoclastogenesis and bone resorption. Estrogen deficiency in OVX rats is associated with the local disturbance of cytokines in bone marrow, leading to an increase in osteoclast numbers that ultimately penetrate trabecular bone and cause deep resorption cavities [39]. Consequentially, trabecular bones are lost

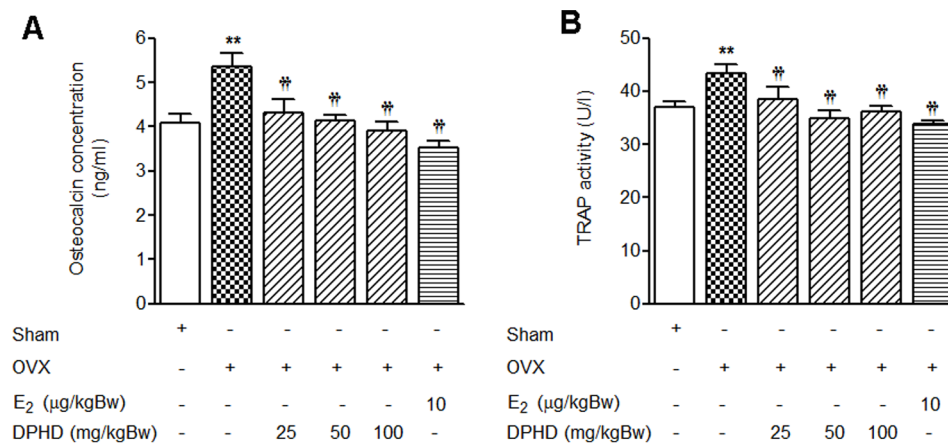


Figure 4. Effects of DPHD on biochemical bone turnover markers. Serum osteocalcin levels (A) and TRAP activity (B) of sham-operated and ovariectomized (OVX) rats receiving the indicated doses of DPHD (25, 50 and 100 mg/kg Bw) or 17 β -estradiol (E₂, 10 μ g/kg Bw) for 12 weeks. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM, n=6–8. **p<0.01 significantly different from sham rats and *p<0.05 and †p<0.01, significantly different from OVX rats.

doi:10.1371/journal.pone.0078739.g004

and the remaining bones are less dense, thinner, and widely separated [40]. Changes in cytokine levels in OVX rats may be attenuated by DPHD treatment. If this is the case, then it suggests that DPHD may suppress osteoclast activity. The inhibitory effect of DPHD on both RANKL mRNA expression and interaction of RANKL and RANK in osteoblast cells may in part account for attenuation of bone turnover and preserving bone mass after ovariectomy [21]. Pharmacokinetic analysis indicates that the amount of DPHD used in treatment of OVX rats in the present study would provide an effective concentration in the range similar to that reported in the *in vitro* study [21,40]. However, the response of cytokines to DPHD treatment in OVX rats has not been investigated and any effect of DPHD on osteoclast cells and the inflammatory system remains to be elucidated.

In conclusion, this is the first report on the effect of DPHD on bone turnover and protection of trabecular bone loss in OVX rats. Our results indicate that the novel phytoestrogen, DPHD, exhibits low uterotrophic activity and has potential in clinical applications

for preserving bone mass and structure in postmenopausal osteoporosis.

Acknowledgments

We thank Prof. Chumpol Pholpramool and Assoc. Prof. Dr. L. T. Jensen for their critical reading of the manuscript. We also thank Prof. Suchinda Malaivijitnond, Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University and Prof. Yuzuru Hamada, Primate Research Institute, Kyoto University, for allowing the use of peripheral quantitative computed tomography (pQCT). We are also grateful to COCAB for allowing the use of facilities for bone microstructure study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DT PP. Performed the experiments: DT PW A. Chuncharunee. Analyzed the data: DT JW A. Chairoungdua. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS PP A. Chuncharunee. Wrote the paper: DT PP JW.

References

- Cummings SR, Melton LJ (2002) Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 359: 1761–1767.
- Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D (2000) Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int* 11: 556–561.
- Raisz LG (2005) Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 115: 3318–3325.
- Lerner UH (2006) Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *Journal of Dental Research* 85: 584–595.
- Downey PA, Siegel MI (2006) Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Physical Therapy* 86: 77–91.
- Stevenson M, Jones ML, Nigris ED, Brewer N, Davis S, et al. (2005) A systematic review and economic evaluation of alendronate, etidronate, risedronate, raloxifene and teriparatide for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Health Technology Assessment* 9: 1–160.
- Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kiel DP, Wilson P, et al. (1993) The Effect of Postmenopausal Estrogen Therapy on Bone Density in Elderly Women. *New England Journal of Medicine* 329: 1141–1146.
- Tham DM, Gardner CD, Haskell WL (1998) Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83: 2223–2235.
- Messina MJ, Wood CE (2008) Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutr J* 7: 17.
- Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S (1996) Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 61: 629–637.
- Sugimoto E, Yamaguchi M (2000) Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol* 59: 471–475.
- Dang ZC, Lowik C (2005) Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol Metab* 16: 207–213.
- Ren P, Ji H, Shao Q, Chen X, Han J, et al. (2007) Protective effects of sodium daidzein sulfonate on trabecular bone in ovariectomized rats. *Pharmacology* 79: 129–136.
- Piyachaturawat P, Ercharuporn S, Suksamrarn A (1995) Uterotrophic Effect of *Curcuma comosa* in Rats. *Pharmaceutical Biology* 33: 334–338.
- Weerachayaphorn J, Chuncharunee A, Mahagita C, Lewchalermwongse B, Suksamrarn A, et al. (2011) A protective effect of *Curcuma comosa* Roxb. on bone loss in estrogen deficient mice. *J Ethnopharmacol* 137: 956–962.
- Suksamrarn A, Ponglikitmongkol M, Wongkrajang K, Chindaduang A, Kittidanairak S, et al. (2008) Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Bioorg Med Chem* 16: 6891–6902.
- Winuthayanon W, Suksen K, Boonchird C, Chuncharunee A, Ponglikitmongkol M, et al. (2009) Estrogenic activity of diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. Requires metabolic activation. *J Agric Food Chem* 57: 840–845.
- Winuthayanon W, Piyachaturawat P, Suksamrarn A, Ponglikitmongkol M, Arao Y, et al. (2009) Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant *Curcuma comosa*: biologic actions in vitro and in vivo indicate estrogen receptor-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* 117: 1155–1161.
- Thamphithak A, Jaisin Y, Meesarapee B, Chongthammakun S, Piyachaturawat P, et al. (2009) Transcriptional regulation of iNOS and COX-2 by a novel compound from *Curcuma comosa* in lipopolysaccharide-induced microglial activation. *Neurosci Lett* 462: 171–175.

20. Bhukhai K, Suksen K, Bhummaphan N, Janjorn K, Thongon N, et al. (2012) A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3 β protein-dependent activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Biol Chem* 287: 36168–36178.
21. Tantikanlayaporn D, Robinson LJ, Suksamrarn A, Piyachaturawat P, Blair HC (2013) A diarylheptanoid phytoestrogen from *Curcuma comosa*, 1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-ol, accelerates human osteoblast proliferation and differentiation. *Phytomedicine* 20: 676–682.
22. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S (2007) *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas* 56: 322–331.
23. Suntornsaratoon P, Wongdee K, Goswami S, Krishnamra N, Charoenphandhu N (2010) Bone modeling in bromocriptine-treated pregnant and lactating rats: possible osteoregulatory role of prolactin in lactation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E426–E436.
24. Ott SM (2008) Histomorphometric measurements of bone turnover, mineralization, and volume. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S151–S156.
25. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, et al. (1983) Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 72: 1396–1409.
26. Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FR, Baylink DJ (1987) Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clinical Chemistry* 33: 458–462.
27. Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115–137.
28. Sample SJ, Racette MA, Hao Z, Thomas CF, Behan M, et al. (2012) Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PLoS ONE* 7: e43215.
29. Gasser JA (1995) Assessing bone quantity by pQCT. *Bone* 17: S145–S154.
30. Khosla S, Westendorf J, Oursler M (2008) Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* 118(2): 421–8 118: 421–428.
31. Breen SA, Millett AJ, Loveday BE, Johnstone D, Waterton JC (1996) Regional analysis of bone mineral density in the distal femur and proximal tibia using peripheral quantitative computed tomography in the rat *In vivo*. *Calcified Tissue International* 58: 449–453.
32. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, et al. (2004) Androgens and Bone. *Endocrine Reviews* 25: 389–425.
33. Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM (1988) Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 123: 681–686.
34. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58: 424–430.
35. Habermann B, Eberhardt C, Feld M, Zichner L, Kurth AA (2007) Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop* 78: 221–225.
36. Redlich K, Smolen JS (2012) Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 11: 234–250.
37. Peng X, Guo W, Ren T, Lou Z, Lu X, et al. (2013) Differential Expression of the RANKL/RANK/OPG System Is Associated with Bone Metastasis in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 8: e58361.
38. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337–342.
39. Wronski TJ, Cintron M, Dann LM (1988) Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43: 179–183.
40. Weinstein RS, Majumdar S (1994) Fractal geometry and vertebral compression fractures. *J Bone Miner Res* 9: 1797–1802.