

Abstract

The hallmark of pathophysiology of cardiovascular disease is endothelial dysfunction and endothelial damage. Targeting against vascular endothelial cell dysfunction and promoting endothelial cell repair represent a new challenge in cardiovascular interventions. Here we investigate the antioxidant property of pomelo (*Citrus maxima* (Burm. f.) Merr., CM) fruit juice and effects on endothelial nitric oxide production and endothelial wound repair *in vitro*. Two varieties of pomelo were used in this study, including var. “Kao Tang Kwa” (CM1) and CM var. “Tub Tim Siam” (CM2). The fruit juice was lyophilized and kept at 4 °C until use. The antioxidant capacity was evaluated by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay and the total phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu method. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from umbilical cord of newborns. Nitric oxide (NO) production was measured by Griess reaction while RT-PCR detected the change in eNOS mRNA expression. Effect of CM on H₂O₂-induced oxidative stress was detected by changes in fluorescent intensity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Endothelial cell proliferation (MTT assay) and scratch wound closure assay were evaluated for the potential activity of CM in enhancing wound healing. The antioxidant capacities of CM1 and CM2 were 53.43±4.265 and 64.44±4.549 µmol FeSO₄/g lyophilize powder, respectively. The total phenolic contents were equivalent to 6.26 and 6.91 mg gallic acid/g powder for CM1 and CM2, respectively. No changes in NO production or eNOS expression were detected in HUVECs treated with both CMs at highest concentration used (1000 µg/mL). CMs significantly reduced cellular ROS levels in HUVECs treated with H₂O₂ but no alteration in cell survival was observed. Despite no significant increase in cell proliferation was detected CMs at 1000 µg/mL promoted endothelial wound healing at 48 h (p<0.05). In summary, CM may enhance endothelial cell repair by mechanisms not related to nitric oxide production or cell proliferation.

บทคัดย่อ

ลักษณะที่เด่นชัดของพยาธิสรีรวิทยาของโรคหัวใจและหลอดเลือดคือการเสื่อมหน้าที่และการถูกทำลายของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด เป้าหมายของการรักษาใหม่ๆจึงมุ่งเน้นเกี่ยวกับการส่งเสริมการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด งานวิจัยนี้ศึกษาคุณสมบัติการเป็น antioxidant ของน้ำคั้นส้มโอสองสายพันธุ์คือ พันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) และศึกษาฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างไนตริกออกไซด์ และการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในหลอดทดลอง โดยเตรียมน้ำคั้นส้มโอในรูปแบบของผงแห้งและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการทดลอง วัดความสามารถในการเป็น antioxidant ด้วยวิธี Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay และวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ส่วนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสกัดได้จากหลอดเลือดดำของสายสะดือทารกแรกคลอด ตรวจวัดผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี Griess reaction และวัดการแสดงออกของยีน eNOS ด้วยวิธี RT-PCR การวัดฤทธิ์ต้าน oxidative stress ภายในเซลล์จากการเหนี่ยวนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำได้โดยวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate กับสารในกลุ่ม ROS การศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอในการเร่งการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำได้โดยวัดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย MTT assay และวัดการสมานแผลของเซลล์ด้วย scratch wound closure assay ผลการทดลองแสดงว่าน้ำคั้นส้มโอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวัดเป็นหน่วย $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g lyophilize powder}$ มีค่าเท่ากับ 53.43 ± 4.265 และ 64.44 ± 4.549 สำหรับ CM1 และ CM2 ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 6.26 และ 6.91 mg gallic acid/g powder สำหรับ CM1 และ CM2 ตามลำดับ จากการตรวจวัดการสร้างไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของยีน eNOS ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับน้ำคั้นส้มโอที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 1000 $\mu\text{g/mL}$ น้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์สามารถลดระดับ ROS ในเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ น้ำคั้นส้มโอทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์เร่งการสมานแผลเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดได้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่มีผลกระทบต่อ การแบ่งตัวเพิ่มปริมาณเซลล์ กล่าวโดยสรุป น้ำคั้นส้มโออาจมีฤทธิ์ส่งเสริมการสมานแผลของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดด้วยกลไกอื่นที่ไม่ผ่านการทำงานของไนตริกออกไซด์ หรือการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์