

Abstract

Project Code : RSA 5980045

Project Title : Effects of coconut oil/or proteins isolated from mature coconut kernels on vascular functions of middle-aged male rats

Investigator : Prof. Chaweewan jansakul, Ph.D., Faculty of Traditional Thai medicine, Prince of Songkla University, Hat-yai

E-mail Address : chaweewan.j@psu.ac.th

Project period : 3 years with an extension for 6 months

We previously found that coconut milk consumption in middle-aged male rats caused beneficial effects on the cardiovascular system: increased blood vessel eNOS and CSE protein expression, and decreased fasting blood glucose and liver cell lipid accumulation. In the present study we aimed to identify which coconut milk components: coconut milk oil (CO) or coconut milk protein (CMP) is responsible for the effects. CO was isolated from dried coconut milk by centrifugation. The CO was isolated from the coconut milk precipitate with 50% ethanol. CO (1 or 3 ml/kg), CMP (1 g/kg) or distilled water was orally gavaged to the middle-aged male rats for 6 weeks, 6-8 rats per group. Animal body weight and food intake, internal organ weight, blood biochemistry, lipid profile, basal blood pressure and heart rate and vascular functions were investigated.

In comparison to a distilled water control group, no differences were observed in any of the parameters studied in the group fed 1 ml/kg of CO except for an increase in retroperitoneal fat accumulation. Feeding 3 ml/kg of CO caused decreased fasting blood glucose, plasma alkaline phosphatase, blood urea nitrogen and liver cell lipid accumulation, but increased retroperitoneal fat tissue. It also caused decreased maximal contractile response of endothelium-intact thoracic aortic rings to phenylephrine although the effect disappeared in the presence of N-nitro-L-arginine (L-NA) or after removal of the endothelium. DL-propargylglycine (PAG) together with L-NA caused a higher contraction to phenylephrine in the CO-treated groups than in the control group. It also caused an increase in vasodilatation to acetylcholine, but not to glyceryl trinitrate, of the phenylephrine pre-contracted aortic rings. CO treatment caused increased vascular wall eNOS and CSE protein expression.

CMP caused decreased body fat and lipid accumulation in liver cells and the internal wall of the aortic arch, with no changes in blood biochemistry or CBC except that the platelet count of the CMP group was lower than that of the DW control group. CMP caused no changes in basal blood pressure or heart rate in anesthetized rats and no changes in vascular

responsiveness to phenylephrine, acetylcholine or sodium nitroprusside, but caused increased vasorelaxation to glyceryl trinitrate (GTN). PAG caused increased vasoconstriction to phenylephrine, and decreased vasorelaxation to all vasorelaxant drugs to the same extent in both groups. The expression in blood vessels of the proteins, eNOS, CSE and sGC was not different between the CMP-treated group and the DW control group. A low concentration (0.1 μ M) of ODQ inhibited the vasorelaxation to GTN to the same extent in both groups, while a higher concentration (1 μ M) almost completely inhibited the relaxant activity of the GTN in both groups. The basal blood vessel cGMP of the CMP-treated group was not different from the DW-treated group. However, when GTN was also added, the cGMP as well as the NO concentration of the CMP-treated group was greater than that of the DW control group. Diadzin inhibited blood vessel NO generation to the same extent in both groups, thus the NO concentration of the CMP-treated group was still greater than that of the DW control group.

Shelf-life study of the CMP was done by packaging the CMP into an aluminium laminate and incubating in the control room at 25 °C, relative humidity 75% for three months. Moisture, water activity, color (L^* a^* b^*) and TBA were measured every month. Results showed that CMP could be kept in this condition for at least 3 months, as all of these parameters did not differ from the first month before packaging.

Taken together, CO at a dose of 3 ml/kg causes some decrease in cardiovascular risk factors in middle-aged male rats, although the amount of CO consumption should be limited as it caused an increase in retroperitoneal fat. CMP caused decreased fat accumulation, decreased platelet count, and appears to have increased the enzymatic pathway for GTN biotransformation, which resulted in an increase in NO and thus cGMP, resulting in an increase in vasorelaxation, which is beneficial in delaying or preventing GTN tolerance that normally occurs after long-term GTN treatment in humans (Jabs et al., 2015; Munzel et al., 2011& 2013). Thus, CMP is a novel protein that should be developed as a health food ingredient to prevent/slow down the development of cardiovascular disease in humans, especially from middle-age onwards.

Key words: Coconut oil; coconut protein; blood vessel; liver lipid; NO; H₂S

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA 5980045

ชื่อโครงการ : Effects of coconut oil/or proteins isolated from mature coconut kernels on vascular functions of middle-aged male rats

ชื่อนักวิจัย : ศาสตราจารย์ ดร. จวีวรรณ จันสกุล คณะการแพทย์แผนไทย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่

E-mail Address : chaweewan.j@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี และได้รับอนุมัติให้ขยายเวลาอีก 6 เดือน

กลุ่มเราได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้โดยให้หนูแรทวัยกลางชีวิตกินกะทิสดแห้งพบว่าเป็นผลดีต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลทำให้เพิ่มระดับเอ็นไทม์ eNOS และ CSE ที่ผนังหลอดเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด และการสะสมไขมันที่เซลล์ตับ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาว่าองค์ประกอบหลักส่วนใดของกะทิ : น้ำมันมะพร้าว หรือกะทิโปรตีน ที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว ทำการทดลองโดยนำจากกะทิสดแห้งมาปั่นด้วยความเร็วสูง ได้น้ำมันมะพร้าว (CO) อยู่ส่วนบน ส่วนล่างเป็นตะกอนซึ่งนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย 50% เอทานอล กำจัดเอทานอลของตะกอนโปรตีนออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dry ได้เป็นกะทิโปรตีนแห้ง (CMP) ป้อน CO ขนาด 1 หรือ 3 ml/kg หรือโปรตีนขนาด 1 g/kg ให้หนูแรทเพศผู้วัยกลางชีวิตวันละ 1 ครั้ง นาน 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น ผลการทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า CO ขนาด 1 ml/kg ไม่มีผลต่อปัจจัยใดใดที่ทำการศึกษา ยกเว้นมีผลทำให้เพิ่มการสะสมไขมันในช่องท้องบริเวณด้านหลัง (retro-peritoneal fat) แต่ CO ขนาด 3 ml/kg มีผลทำให้ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดระดับ alkaline phosphatase และ urea nitrogen ในเลือด แต่เพิ่มการสะสมไขมันในช่องท้องบริเวณด้านหลัง มีผลลดความแรงในการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine แต่ผลดังกล่าวจะหมดสิ้นไปถ้าถูกยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ด้วย N-nitro-L-arginine (L-NA) หรือโดยการทำลายเนื้อเยื่อ endothelium ของหลอดเลือด การยับยั้งการสร้าง H₂S ด้วย DL-propargylglycine (PAG) ในหลอดเลือดที่มี L-NA อยู่ด้วย มีผลทำให้เพิ่มความแรงในการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine โดยกลุ่มที่กิน CO หดตัวได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น ผลต่อการคลายตัวของหลอดเลือดพบว่ากลุ่มที่กิน CO มีผลทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดต่อ acetylcholine คลายตัวได้มากกว่าของกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ glyceryl trinitrate (GTN) นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ CSE ที่ผนังหลอดเลือดของกลุ่มที่กิน CO สูงกว่าของกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น

การกิน CMP มีผลทำให้ลดการสะสมไขมันในร่างกาย ที่เซลล์ตับ และที่ผนังด้านในของ aortic arch โดยที่ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงผลทางชีวเคมีในน้ำเลือด รวมทั้งความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด ยกเว้นจำนวนเกล็ดเลือดที่พบว่ามีจำนวนน้อยกว่าของกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น การกิน CMP ไม่มีผลต่อความดันโลหิตหรืออัตราการเต้นของหัวใจพื้นฐานในหนูแรทสลบ และไม่ทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ phenylephrine, acetylcholine หรือ sodium nitroprusside แต่มีผลเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ GTN การยับยั้งการสร้าง H_2S ด้วย PAG มีผลเพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดต่อ phenylephrine และลดการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ acetylcholine, sodium nitroprusside และ GTN ในขนาดที่เท่ากันทั้งกลุ่มที่กิน CMP และกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น การแสดงออกของโปรตีน eNOS, CSE และ sGC ที่หลอดเลือดไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่กิน CMP กับกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น การยับยั้งการทำงานของ soluble guanylate cyclase ด้วย ODQ ที่ความเข้มข้นต่ำ ($0.1 \mu M$) มีผลยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ GTN ในขนาดที่เท่ากันระหว่างกลุ่มที่กิน CMP กับกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น แต่เมื่อความเข้มข้นของ ODQ เป็น $1 \mu M$ มีผลยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ GTN ได้เกือบหมดทั้งของทั้งสองกลุ่ม ระดับ cGMP พื้นฐานของหลอดเลือดทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อหลอดเลือดถูกกระตุ้นด้วย GTN พบว่าระดับ cGMP และ NO ของหลอดเลือดของกลุ่มที่กิน CMP มีค่าสูงกว่าของกลุ่มควบคุมที่กินน้ำกลั่น การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ ALDH-2 ด้วย diadzin ในการเปลี่ยน GTN เป็น NO พบว่าสามารถยับยั้งได้ในขนาดที่เท่ากันทั้งสองกลุ่ม ส่งผลให้ระดับของ NO ของกลุ่มที่กิน CMP ยังคงสูงกว่าของกลุ่มที่กินน้ำกลั่น

การศึกษา shelf-life ของกะทิโปรตีน ทำโดยบรรจุกะทิโปรตีนในซอง Aluminium laminate เก็บไว้ที่อุณหภูมิ $25^{\circ}C$ มีความชื้นสัมพัทธ์ 75% นาน 3 เดือน ผลการทดสอบค่าความชื้น ค่า water activity (a_w) ค่าความหืนโดยค่า TBA และค่าสี (L^* , a^* , b^*) พบว่าค่าต่าง ๆ เหล่านี้ไม่มีความแตกต่างจากจุดเริ่มต้นก่อนทำการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สรุปได้ว่าการกิน CO ขนาด 3 ml/kg สามารถลดความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ แต่ควรจำกัดปริมาณที่บริโภค เนื่องจากการกิน CO ทั้งขนาดที่ 1 และ 3 ml/kg มีผลทำให้เพิ่มการสะสมไขมันในช่องท้องที่บริเวณด้านหลัง แต่การกิน CMP มีผลทำให้ลดการสะสมไขมันในร่างกาย รวมทั้งที่เซลล์ตับ และที่ผนังหลอดเลือดบริเวณหัวใจ มีผลเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือดต่อ GTN ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากทำให้เพิ่มการทำงานใน enzymatic pathway ในการเปลี่ยน GTN เป็น NO แล้วส่งผลทำให้เพิ่มระดับ NO ซึ่งทำให้เพิ่มระดับ cGMP ส่งผลให้มีหลอดเลือดคลายตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยเชิงบวกในการชะลอ หรือป้องกันการเกิดภาวะดื้อยา GTN (GTN tolerance) ซึ่งมักจะเกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีการใช้ GTN ในการรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจตีบเป็นระยะเวลานาน (Jabs et al., 2015; Munzel et al., 2011 & 2013) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า CMP เป็น novel protein ที่ควรที่จะได้รับการพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพเพื่อป้องกัน/ชะลอการพัฒนาเป็นโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดในคนโดยเฉพาะจากวัยกลางคนเป็นต้นไป

คำหลัก : น้ำมันมะพร้าว; กะทิโปรตีน; หลอดเลือด; ไขมันตับ; NO; H_2S