

รหัสโครงการ SUT1-104-53-24-10



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำมันขิงต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมที่แยก

จากกายของหนูขาว

(Pharmacological effects of ginger oil on isolated tracheal smooth muscle of rat)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-53-24-10



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำมันขิงต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมที่แยก จากกายของหนูขาว

(Pharmacological effects of ginger oil on isolated tracheal smooth muscle of rat)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ภาณุ. ดร. นवलน้อย จุฑะพงษ์

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

ผู้ร่วมวิจัย

รศ. สพญ. ดร. ศจิริรา คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาสรีรวิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส. ลลิตยา มั่งประยูร นักศึกษาปริญญาโทในฐานะผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณ ผศ. ดร. สุรพล แสนสุข คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องในการระบุชนิดของพืช สุดท้ายผู้วิจัย ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีสำหรับการให้ ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้



บทคัดย่อภาษาไทย

ขิงหรือเหง้าของ *Zingiber officinale* Roscoe (วงศ์ Zingiberaceae) ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารทั่วโลกมีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ขิงถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรตั้งแต่ครั้งโบราณเพื่อบำบัดอาการเจ็บป่วยของมนุษย์หลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้เพื่อช่วยย่อยอาหาร บรรเทาอาการปวดท้อง ท้องเสีย และคลื่นไส้อาเจียน พบว่าสารที่มีกลิ่นฉุนซึ่งเป็นส่วนประกอบในขิงมีคุณสมบัติต้านการตอบสนองที่มากเกินไปต่อสิ่งกระตุ้นและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบของทางเดินหายใจ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดลมของน้ำมันขิง รวมทั้งระบุสารออกฤทธิ์ น้ำมันขิงที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ทำการสกัดด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำ จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี พบว่าสารประกอบส่วนใหญ่คือ citral (62.4%) eucalyptol (6.9%) และ camphene (4.6%) การทดสอบทางเภสัชวิทยาแบบ *in vitro* ทำในหลอดลมที่แยกจากกายของหนูขาว นำไปแขวนในอ่างทดสอบเพื่อวัดแรงดึงของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมด้วยเครื่อง Power Lab electronic recorder พบว่าน้ำมันขิงและ citral ยกเว้น camphene สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดลมที่กระตุ้นโดย carbachol (CCh) ความเข้มข้น 1 μM ส่วนสาร eucalyptol นั้นพบว่าไม่มีฤทธิ์ในการคลายตัวกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมสอดคล้องกับการทดลองที่เคยมีรายงานมาแล้ว อย่างไรก็ตามเนื่องจากในน้ำมันขิงมีปริมาณสาร eucalyptol ค่อนข้างต่ำ ดังนั้น eucalyptol จึงน่าจะมีส่วนร่วมต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมเพียงเล็กน้อย สำหรับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่รับผิดชอบต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของน้ำมันขิงและ citral ทำโดยใช้ verapamil (สารปิดกั้นแคลเซียม) propranolol (สารต้านบีต้ารีเซพเตอร์) L-NAME (สารต้าน nitric oxide) และ indomethacin (สารต้านเอนไซม์ cyclooxygenase) จากผลการทดลองพบว่าทั้งน้ำมันขิงและ citral มีฤทธิ์ทำให้เส้นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมและการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมเลื่อนไปทางขวาเช่นเดียวกับ verapamil ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า propranolol สามารถยับยั้งฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral ได้ แต่ฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าวนี้ไม่เกิดขึ้นเมื่อใช้ L-NAME และ indomethacin จากผลการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมดชี้แนะว่าฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของน้ำมันขิงและ citral มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน Ca^{2+} channel และ β_2 -adrenergic receptor

สรุป การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ขยายหลอดลมของน้ำมันขิงและสารออกฤทธิ์ citral โดยพบว่าน่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์คือไปปิดกั้น Ca^{2+} channel และกระตุ้น β_2 -adrenergic

ค

receptor งานวิจัยชิ้นนี้ทำให้เกิดหลักฐานด้านเภสัชวิทยาเพื่อใช้สนับสนุนการใช้ขิงเป็นยาช่วยขยายหลอดลมเพื่อประโยชน์ในการรักษาโรค

คำสำคัญ: *Zingiber officinale*, น้ำมันขิง, ซิงทรีล, ขยายหลอดลม, สารกระตุ้นบีต้ารีเซพเตอร์, สารต้านแคลเซียม



Abstract

Ginger, the rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae) which is a common constituent of diets around the world, exhibits several pharmacological activities. Ginger has been traditionally used from time immemorial for various human ailments worldwide, especially to relieve stomach upset, diarrhea, and nausea. Some pungent constituents present in ginger have been shown to produce potent anti-hyperactivity and anti-inflammatory activities on airway. The present study was aimed to evaluate bronchodilatory activity of ginger oil and identify its active compounds. Ginger oil was extracted by hydro-distillation. The compositions of ginger oil were analyzed by gas chromatography and mass spectrometer (GC-MS). Citral (62.4%), eucalyptol (6.9%), and camphene (4.6%) were found to be the major components. The *in vitro* pharmacological study was conducted in isolated tracheal preparation of Wistar rat. The tissue was suspended in organ bath to measure the isometric response, using Power Lab electronic recorder. Ginger oil and citral, but not camphene, suppressed rat tracheal contraction induced by 1 μ M carbachol (CCh). Consistent with previous report, eucalyptol also showed a relaxing effect on rat airway. However, the content of eucalyptol in ginger oil was relatively low, therefore the contribution of eucalyptol to the bronchodilatory effect of ginger oil was small. To elucidate the mechanisms responsible for the myorelaxing effect, verapamil (a Ca^{2+} channel blocker), propranolol (a β -adrenergic receptor antagonist), L-NAME (a NOS inhibitor) and indomethacin (a COX inhibitor) were used to test the inhibitory effects of ginger oil and citral. The results showed that both ginger oil and citral shifted concentration-response curve of Ca^{2+} in CCh-induced tracheal smooth muscle contraction towards right similar to verapamil (positive control). Moreover, propranolol, but not L-NAME and indomethacin, inhibited bronchodilatory effects of both ginger oil and citral. Taken together, the results suggested that ginger oil and citral relax airway smooth muscle through Ca^{2+} channel and β_2 -adrenergic receptor.

In conclusion, herein the bronchodilatory effects of ginger oil and citral, its major active ingredient have been demonstrated. The possible mechanisms underlying this relaxing effect appeared to involve β_2 -adrenergic receptor stimulation and Ca^{2+} channel blockade. This study

provides the pharmacological basis supporting therapeutic potential of *Z. officinale* rhizomes as a bronchodilator.

Keywords: *Zingiber officinale*, Ginger oil, Citral, Bronchodilation, β -adrenoceptor agonist, Calcium antagonist



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 วรรณกรรมทบทวน	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	18
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	27
เอกสารอ้างอิง.....	34
ภาคผนวก	44
งานวิจัยจากโครงการนี้ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ	

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1	สารออกฤทธิ์สำคัญของขิง	6
รูปที่ 3.1	เหง้าขิงตัวอย่าง	9
รูปที่ 3.2	เครื่องมือวัดแรงดึงของกล้ามเนื้อหลอดลมที่แยกจากกายของหนูขาว	11
รูปที่ 3.3	รูปแบบการทดลองเพื่อศึกษาการตอบสนองของหลอดลมต่อน้ำมันขิง	12
รูปที่ 3.4	รูปแบบการทดลองเพื่อวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันขิง	13
รูปที่ 3.5	รูปแบบการทดลองเพื่อวิเคราะห์หา dose response curve ของ citral	13
รูปที่ 3.6	รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ calcium ภายนอกเซลล์ต่อฤทธิ์ของ น้ำมันขิงและ citral.....	14
รูปที่ 3.7	รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ propranolol ต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral	15
รูปที่ 3.8	รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ L-NAME ต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral	16
รูปที่ 3.9	รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ indomethacin ต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral ..	16
รูปที่ 4.1	สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันขิงจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS	18
รูปที่ 4.2	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหลักซึ่งพบในน้ำมันขิง	19
รูปที่ 4.3	ฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของน้ำมันขิง.....	20
รูปที่ 4.4	ผลของสารประกอบในน้ำมันขิงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม.....	21
รูปที่ 4.5	การตอบสนองของกล้ามเนื้อหลอดลมต่อ citral	22
รูปที่ 4.6	กราฟ concentration-response ของแคลเซียมภายนอกเซลล์ต่อการหดตัวของ กล้ามเนื้อหลอดลม	23
รูปที่ 4.7	ผลของยาต้าน β -adrenergic receptor ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิง และ citral	24
รูปที่ 4.8	ผลของสารยับยั้ง NOS ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral	25
รูปที่ 4.9	ผลของสารยับยั้ง COX ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral	26

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เป็นที่ยอมรับกันดีว่าพืชไม้ได้มีความสำคัญเพียงแค่ว่าใช้เป็นอาหารของมนุษย์เท่านั้น แต่ยังเป็นแหล่งกำเนิดของยารักษาโรคด้วย สมุนไพรที่นำมาใช้รักษาโรคตั้งแต่ครั้งโบราณได้จุดประกายให้เกิดการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตยาแผนปัจจุบัน ยารักษาโรคหลายชนิดที่ใช้รักษาผู้ป่วยในปัจจุบันมีโครงสร้างทางเคมีเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบในพืช ปัญหาใหม่ที่มีราคาแพงและค่าใช้จ่ายในการส่งยาไปยังสถานที่ที่ห่างไกลค่อนข้างสูงทำให้ผู้ป่วยบางรายเข้าไม่ถึงยาแผนปัจจุบัน การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคจึงยังมีความจำเป็นอยู่มากในประชากรบางกลุ่มโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่มีรายได้น้อย ดังนั้นการใช้วิธีทางวิทยาศาสตร์เพื่อพิสูจน์หาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรจึงยังคงเป็นงานที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอย่างมาก

โรคหอบหืดซึ่งเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของทางเดินหายใจยังคงเป็นปัญหาด้านสุขภาพของประชากรทั่วโลก อาการของโรคหอบหืดซึ่งประกอบด้วยอาการหายใจขัดมีเสียงหวีด ไอ แน่นหน้าอก โดยอาการเกิดขึ้นหลังจากผู้ป่วยได้รับสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ สาเหตุจากผู้ป่วยมีการตอบสนองที่ไวกว่าคนปกติ สารกระตุ้นดังกล่าวทำให้โครงสร้างที่เป็นส่วนประกอบของทางเดินหายใจเปลี่ยนแปลงไป ปฏิกริยาดังกล่าวเกิดจากการอักเสบแบบเรื้อรัง ผนังทางเดินหายใจจะมีการบวมและหนาตัวขึ้น พบผู้ป่วยประมาณ 300 ล้านคนจากประชากรทั่วโลกมีปัญหาเกี่ยวกับโรคทางเดินหายใจนี้ ในบางรายอาการอาจมีความรุนแรงจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (Peters, Ferguson, Deniz, and Reisner, 2006) ที่สำคัญคือ ปัจจุบันอุบัติการณ์ของโรคหอบหืดกำลังเพิ่มขึ้นทุกแห่งทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรเด็ก เมื่อไม่นานมานี้ นักวิจัยพบว่าผู้ป่วยโรคหอบหืดที่อาศัยอยู่ในชนบทที่ห่างไกลความเจริญมีแนวโน้มที่จะต้องเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลมากขึ้นเนื่องจากเกิดอาการรุนแรงบ่อย (Ayres-Sampaio et al., 2014) ทำให้เกิดความสูญเสียทั้งในแง่ของค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาโดยรวมและโอกาสในการทำงานของผู้ป่วย อีกทั้งยังไปลดเวลาที่สมาชิกในครอบครัวจะได้ใช้ชีวิตและทำกิจกรรมร่วมกัน

ยารักษาโรคหอบหืดประกอบด้วยยาหลัก 2 กลุ่ม คือ ยาขยายหลอดลม (Bronchodilator) และยาควบคุมโรค (Controller) โดยยากกลุ่มแรกมีจุดประสงค์หลักเพื่อช่วยรักษาอาการหลอดลมหด

ตัวเฉียบพลันหลังได้รับสารกระตุ้น ยามีกลไกการออกฤทธิ์ไปทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมคลายตัว ส่วนยากลุ่มที่ 2 มีวัตถุประสงค์หลักคือ ป้องกันการดำเนินไปของโรคให้ก้าวหน้าช้าลง โดยออกฤทธิ์ไปยับยั้งการอักเสบของหลอดลมที่ถูกชักนำโดยสารกระตุ้นชนิดต่างๆ (Boushey, 2009)

ยาขยายหลอดลมที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ (1) ยากระตุ้น β_2 -adrenergic receptor (2) ยาต้าน cholinergic receptor และ (3) ยากลุ่ม methylxanthine ซึ่งมียาหลักคือ theophylline สำหรับยาที่ใช้ควบคุมความก้าวหน้าของโรคนั้นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ ยากลุ่มสเตียรอยด์ ซึ่งออกฤทธิ์ไปลดจำนวนและหน้าที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในทางเดินหายใจ ถึงแม้ว่ายามาตรฐานทั้งสองกลุ่มที่กล่าวมาจะเป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพดี แต่เพื่อลดผลข้างเคียงต่อร่างกาย รูปแบบของยา (dosage form) ที่แนะนำให้ใช้คือ ยาแบบสูดพ่น (metered dose inhaler) ซึ่งมีราคาแพง ดังนั้นการค้นหายาใหม่ที่ออกฤทธิ์รักษาโรคหอบหืดจากสมุนไพรมีแนวโน้มยังคงเป็นหัวข้องานวิจัยที่ยังได้รับความสนใจจากนักวิจัยด้านเภสัชวิทยาอยู่

ขิงหรือเหง้าของ *Zingiber officinale* Roscoe (วงศ์ Zingiberaceae) ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรตั้งแต่ครั้งโบราณโดยชาวเอเชียรวมทั้งชาวไทยด้วย เช่น ใช้ช่วยย่อยอาหาร บรรเทาอาการปวดท้อง ท้องเสีย และคลื่นไส้อาเจียน แก้เมารถเมาเรือ และแก้แพ้ท้องในหญิงมีครรภ์ (Apariman, Ratchanon, and Wiriyasirivej, 2006; Willetts, Ekangaki, and Eden, 2003; Ernst and Pittler, 2000; Yamahara, Rong, Naitoh, Kitani, and Fujimura, 1989) ปัจจุบันมีการนำน้ำมันขิงมาใช้เป็นส่วนผสมของน้ำมันสมุนไพรในแพทย์ทางเลือกเพื่อบรรเทาอาการปวดข้อปวดเข่า (Yip and Tam, 2008) และพบว่าในผู้ป่วยที่มีอาการปวดจากโรคข้ออักเสบเมื่อได้รับสารสกัดจากขิงวันละ 2 ครั้ง อาการปวดจะบรรเทาลงเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอก (Altmann, Gilman, Hayoz, Willis, and Himpfel, 2001) เชื่อว่าขิงสามารถลดอาการปวดประจำเดือนได้เนื่องจากมีฤทธิ์ขยายกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก นพรัตน์ พุทธกาลและคณะผู้วิจัยชาวไทย (Buddhakala, Talubmook, Sriyotha, Wray, and Kupittayanant, 2008) พบว่าน้ำมันขิงยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของหนูขาว ในงานวิจัยเดียวกันนี้ผู้วิจัยพบว่า citral เป็นสารออกฤทธิ์ในขิงที่ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อมดลูก ยิ่งไปกว่านั้นนักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งยังพบว่าขิงสามารถลดอาการหายใจลำบากและอาการไอในผู้ป่วยโรคหอบหืดได้ด้วย (Rouhi, Ganji, and Nasri, 2006) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของขิงที่ทำให้เกิดฤทธิ์รักษาโรคหอบหืดยังไม่ได้ถูกอธิบายไว้ในงานวิจัยดังกล่าว

งานวิจัยที่พยายามอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากขิงในการช่วยให้หลอดลมคลายตัว ได้แก่ งานของ Ghayur และคณะ (Ghayur, Gilani, and Janssen, 2008) โดยใช้เนื้อเยื่อตัดของปอดหนูถีบจักรตัดให้เป็นแผ่นบาง (mouse lung slice) คณะวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากเหง้าขิงทำให้

เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของทางเดินหายใจเมื่อถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย acetylcholine โดยคาดว่าน่าจะเกิดจากการปิดกั้น Ca^{2+} channel นอกเหนือจากการกระตุ้นระบบประสาทพาราซิมพาเทติกซึ่งจะส่งผลกระตุ้น Ca^{2+} channel อันก่อให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลมแล้ว ยังมีกลไกที่สำคัญอีกกลไกหนึ่งที่ร่างกายใช้ควบคุมการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อที่เป็นส่วนประกอบของทางเดินหายใจ คือ การกระตุ้น β_2 -adrenoceptor

เป็นที่แน่ชัดว่าในผู้ป่วยโรคหอบหืดนั้น mast cell ถูกจับกับ immunoglobulin E (IgE) ซึ่งเฉพาะเจาะจง เมื่อผู้ป่วยได้รับสารกระตุ้นที่เฉพาะเจาะจง (specific antigen) mast cell ก็จะปล่อยสารต่างๆ หลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบออกมา เช่น histamine, chemotactic factor, prostaglandin D_2 , bradykinin และ leukotriene เป็นต้น (Pelaia et al., 2008) ความรู้ที่เกี่ยวกับกลไกการอักเสบเหล่านี้ก็นำนักวิทยาศาสตร์ไปสู่การพัฒนาวิทยาใหม่ ตัวอย่างเช่น กลยุทธ์ในการยับยั้งการสร้างและการทำงานของ leukotriene ถูกนำมาใช้ในการพัฒนารักษาโรคหอบหืด ยาต้าน leukotriene receptor ชนิดแรกได้รับการรับรองให้นำมาใช้กับผู้ป่วยโรคหอบหืดได้ในปี 1998 และยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ lipooxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสร้าง leukotriene ออกวางตลาดในฐานะยารักษาโรคหอบหืดครั้งแรกในปี ค.ศ. 2006 ในกรณีของชิงเมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่า zingerone ซึ่งเป็นสารประกอบที่สกัดได้จากชิงนั้นออกฤทธิ์ปกป้องการทำลายปอดของหนูถีบจักรจากการชักนำให้เกิดการอักเสบด้วย lipopolysaccharide ได้ (Xie et al., 2014)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อค้นหาหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อมาสนับสนุนประโยชน์ของเหง้าชิงต่อการบรรเทาอาการของโรคระบบทางเดินหายใจ โดยออกแบบการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของหลอดลมของน้ำมันชิงโดยใช้หลอดลมที่แยกจากกายของหนูขาว นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบหากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันชิงเพื่ออธิบายฤทธิ์ดังกล่าวอันได้แก่ (1) การกระตุ้น β_2 -adrenergic receptor (2) การปิดกั้น voltage-gated Ca^{2+} channel และ (3) ความเกี่ยวข้องกับเส้นทาง nitric oxide และ prostaglandin สุดท้ายผู้วิจัยยังได้ทำการทดลองเพื่อระบุชนิดของสารประกอบในน้ำมันชิงที่ทำให้เกิดฤทธิ์ขยายหลอดลมดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ประกอบด้วยวัตถุประสงค์ 3 ประการดังต่อไปนี้

1. ศึกษาผลของน้ำมันขิงที่สกัดจากเหง้าขิงโดยวิธีกลั่นด้วยน้ำต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม
2. ระบุสารออกฤทธิ์ในน้ำมันขิงที่ส่งผลให้เกิดฤทธิ์คลายตัวของหลอดลม
3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อขยายหลอดลมของน้ำมันขิงและสารออกฤทธิ์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยใช้หลอดลมที่แยกจากกายของหนูขาว จัดเป็นการศึกษาในระดับ *in vitro* ซึ่งจะปราศจากกลไกการปรับสภาพของร่างกายเป็นทดแทนฤทธิ์ที่เกิดขึ้นของสารที่ได้รับ ดังนั้นผลที่เกิดขึ้นจากการศึกษานี้อาจแตกต่างจากการใช้ในสัตว์ทดลองที่ยังมีชีวิต

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยสนับสนุนให้เกิดการใช้ขิงเป็นการรักษาทางเลือกเพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ การอธิบายกลไกการออกฤทธิ์และระบุสารออกฤทธิ์ของน้ำมันขิงจากงานวิจัยนี้ก่อให้เกิดการใช้ขิงอย่างมีเหตุผล

บทที่ 2

วรรณกรรมบทบทวน

ขิงซึ่งเป็นพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber officinale* อยู่ใน family Zingiberaceae ถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร เครื่องดื่มและยาแผนโบราณหรือการแพทย์ทางเลือกทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในแถบเอเชีย ส่วนที่นำมาใช้คือเหง้าหรือลำต้นใต้ดินของขิง

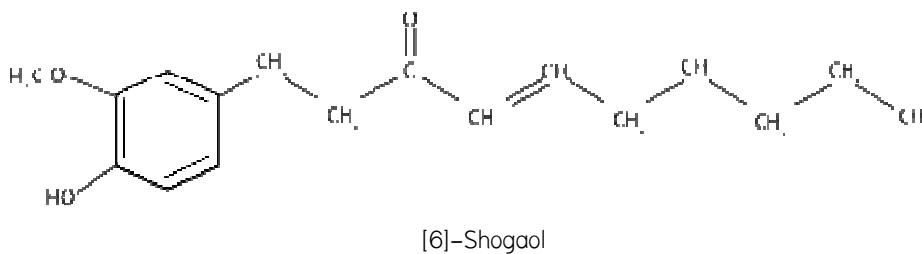
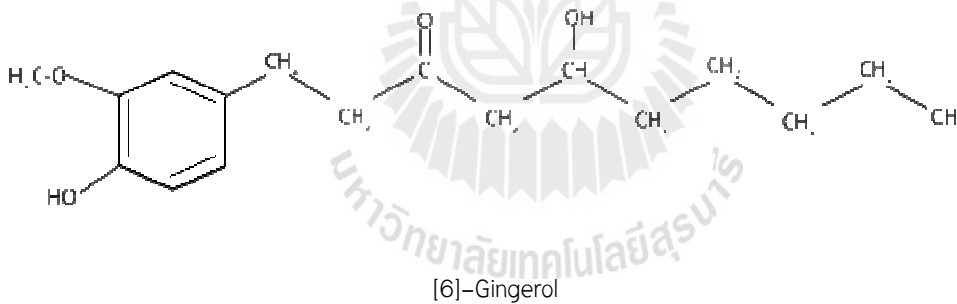
ขิงเป็นไม้ล้มลุก มีลำต้นใต้ดินแตกแขนง ลำต้นเทียมสูงประมาณ 90 เซนติเมตร เหง้ามีลักษณะอวบ เนื้อภายในมีสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอม ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวรูปหอก กว้างประมาณ 2-3 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลม เรียงสลับเป็น 2 แถว ไม่มีก้านใบ ดอกพบได้ไม่บ่อย ช่อดอกแทงจากเหง้าใต้ดิน ใบประดับเรียงเวียนอัดกันแน่น รูปไข่ กว้าง ขอบโค้งเข้าเล็กน้อย สีเขียวอ่อน ดอกสีเหลืองอ่อนมีปาก (labellum) รูปไข่สีม่วงแดงคล้ำมีจุดและแถบสีเหลืองอ่อน มีการเพาะปลูกอย่างกว้างขวางในภูมิภาคที่มีภูมิอากาศร้อนชื้น เช่น ประเทศไทย จีน ไต้หวัน อินเดีย บังคลาเทศ จาเมกา และไนจีเรีย เป็นต้น (Kemper, 1999)

ขิงถูกใช้มาทำประโยชน์ในทางการแพทย์ในประเทศแถบเอเชียเป็นเวลานานหลายร้อยปีแล้ว เนื่องจากกลิ่นหอมและรสชาติที่เผ็ดร้อนของขิง โดยนำมาใช้รักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร เช่น แก้วปวดท้อง ท้องเสีย ขับลม ช่วยย่อยอาหาร แก้อาเจียน เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้แก้หวัด แก้วปวดศีรษะและปวดข้อได้ด้วย (Borrelli et al., 2004; Ghayur et al., 2005) นักวิจัยเชื่อว่าฤทธิ์ของขิงที่ช่วยลดอาการปวดท้องเกิดจากการออกฤทธิ์โดยตรงต่อทางเดินอาหารจากความสามารถในการดูดซับสารต่างๆ ร่วมกับคุณสมบัติในการลดอาการหดเกร็งของลำไส้ (Ernst and Pittler, 2000) มีงานวิจัยพบว่าขิงสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านการทำงานของเกล็ดเลือดและมีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Thomson et al., 2002) ด้วยเหตุนี้ปัจจุบันขิงจึงเป็นสินค้าที่มีความสำคัญลำดับต้นๆ ในแง่ของการค้าระหว่างประเทศ

การศึกษาทางพิษวิทยาเคยพบว่าขิงมีส่วนประกอบหลายชนิด ได้แก่ gingerols, shogaols, zingerone และ paradol (Langner et al., 1998) [6]-Gingerol และ [6]-shogaol ซึ่งเป็นสารที่มีกลิ่นฉุนแรงเป็นสารที่พบมากที่สุดในการขิง (Connell and McLachlan, 1972; Ghayur et al., 2005) สารประกอบ [6]-gingerol ถูกพบว่าเป็นสารออกฤทธิ์ซึ่งก่อให้เกิดผลทางด้านเภสัชวิทยาของขิง เช่น ฤทธิ์แก้ปวดและฤทธิ์ต้านอักเสบ (Young et al., 2005) ดังนั้น [6]-gingerol จึงถูกใช้เป็นหนึ่งในการ marker สำคัญเพื่อแสดงมาตรฐานของผลิตภัณฑ์จากขิง เชื่อว่าสารในกลุ่ม shogaol นั้นเกิดจากสาร

ตั้งต้นในกลุ่ม gingerols โดยปฏิกิริยา dehydration (Connell and Sutherland, 1969; Jolad *et al.*, 2004) ด้วยเหตุนี้ น่าจะเป็นสาเหตุให้พบ shogaols จำนวนไม่มากนักในขิงสด แต่พบในปริมาณมากกว่าในขิงแห้งหรือในสารสกัด โครงสร้างทางเคมีของ [6]-Gingerol และ [6]-shogaol แสดงไว้ในรูปที่ 2.1

กลิ่นหอมของขิงนั้นเกิดจากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่เป็นส่วนประกอบในขิง มีรายงานพบว่าขิงมีส่วนประกอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยอยู่ประมาณ 1-3% ซึ่งอยู่ในส่วนที่เรียกว่า oleoresin โดยมีส่วนผสมของสารประกอบในกลุ่ม gingerols, shogaols และ zingiberone โดยจะมีจำนวนอะตอมของคาร์บอนที่ side chain แตกต่างกัน (Shadmani *et al.*, 2004) โดยปกติสารประกอบในกลุ่มของ shogaols จะมีกลิ่นหอมฉุนเป็น 2 เท่าของสารประกอบในกลุ่ม gingerols สารประกอบ oleoresin ที่ได้จากขิงนั้นถูกใช้เพื่อแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องดื่มอย่างกว้างขวาง สารประกอบอื่นๆ ที่สำคัญในขิง ได้แก่ zingiberene และ bisabolone (Wohlmuth *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีการนำน้ำมันขิงไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำหอมและเพื่อใช้ในการสูดดมบำบัด (aroma therapy) ด้วย



รูปที่ 2.1 สารออกฤทธิ์สำคัญของขิง (Shukla and Singh, 2007)

ในงานวิจัยด้านการแพทย์มีการศึกษายืนยันถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขิง ได้แก่ การนำไปใช้ลดอาการคลื่นไส้อาเจียนหลังการผ่าตัดได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับยาหลอก (Chaiyakunapruk et al., 2006) ในทำนองเดียวกันมีงานวิจัยที่พบว่าสามารถลดอาการคลื่นไส้อาเจียนระดับปานกลางในผู้หญิงท้องซึ่งมีอายุครรภ์น้อยกว่า 16 สัปดาห์ได้ (Saberi et al., 2013) นอกจากนี้สารสกัดจากขิงยังสามารถลดการเกิดหลอดเลือดอุดตันในหนูถีบจักร ซึ่งได้รับการชักนำให้เกิดการขาด apolipoprotein E โดยพบว่าการป้องกันการเกิดหลอดเลือดแข็งจาก plaque นั้นเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ลดปฏิกิริยา oxidation ของ low density lipoprotein (LDL) จากการทำงานของ macrophage (Fuhrman et al., 2000) ขิงยังมีคุณสมบัติในการปกป้องอวัยวะภายใน เช่น ตับอ่อนและตับ โดยพบว่าสารประกอบพวก polyphenol ที่สกัดได้จากเหง้าขิงสามารถไปลดการทำลายตับจากสาร streptozotocin ในหนูขาว (Kazeem et al., 2013) และลดอันตรายของตับอ่อนจากการทำลายของ hydrogen peroxide ได้ (Rackova et al., 2013) ยิ่งไปกว่านั้นนักวิจัยกลุ่มหนึ่งยังได้รายงานไว้ว่า gingerol ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในขิงสามารถลดการทำลายไตจากการชักนำของ gentamicin เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าสารต้านแบคทีเรีย gentamicin ก่อให้เกิดไตพิการได้ด้วยการผลิต oxidative stress และส่งผลให้ไตเกิดการอักเสบ มีการศึกษาวิจัยสนับสนุนว่า gingerol สามารถลดกระบวนการ transcription ของ TNF- α , IL-2 mRNA และ IFN- γ mRNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การอักเสบและการตายของเซลล์ได้ (Rodrigues et al., 2014) ฤทธิ์ด้านการอักเสบและลดความเจ็บปวดของขิงได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ในหนูถีบจักร โดยผลการทดลองจากการฉีดสาร [6]-gingerol เข้าทางหน้าท้องแสดงให้เห็นว่าสารประกอบหลักของขิงลดอาการบวมที่ฝ่าเท้าของหนูที่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นการอักเสบ carrageenan (Young et al., 2005) ส่วน [6]-shogaol ซึ่งเป็นสารประกอบหลักอีกชนิดหนึ่งในขิงถูกพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของตับอ่อนมนุษย์ได้ และยังไปเพิ่มฤทธิ์ของสาร gemcitabine ในการต้านการเกิดเนื้องอกโดยไปยับยั้งการอักเสบผ่าน pathway ที่มี TLR4/NF- κ B เป็นตัวกลาง (Zhou et al., 2014) นักวิจัยพยายามที่จะทดสอบฤทธิ์ของ gingerol ในการต้านมะเร็งที่เกิดจากการกระตุ้นของฮอร์โมนเพศชาย testosterone เพื่ออธิบายกลไกการออกฤทธิ์โดยทำการศึกษาในเซลล์ LNCaP cell ซึ่งไวต่อฮอร์โมนเพศชาย ผลการทดลองชี้แนะว่า [6]-gingerol ชักนำให้เซลล์ดังกล่าวเกิดการตายแบบ apoptosis โดยมีการ downregulation ของโปรตีน Bcl-2 และ survivin ควบคู่ไปกับการเกิด upregulation ของโปรตีน Bax (Shukla and Singh, 2007) ในการศึกษาเดียวกันนี้แต่ทำการทดสอบในระดับ *in vivo* โดยใช้หนูถีบจักรที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งที่ต่อมลูกหมากด้วย testosterone ปกติพบว่า [6]-gingerol สามารถต้าน

การเกิดโรคมะเร็งได้ในการทำงานเดียวกับผลใน *in vitro* ในกรณีของกล้ามเนื้อเรียบของอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าน้ำมันซิงสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกที่แยกจากกายของหนูขาวทั้งแบบที่กระตุ้นด้วย PGF2 α และแบบที่เกิดขึ้นเอง (Buddhakala et al., 2008)

มีการศึกษาวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติของซิงในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบสามารถนำไปใช้ประโยชน์หลายประการในการรักษาโรค นักวิจัยที่ชื่อ Pancho และคณะ (Pancho et al., 1989) ได้รายงานฤทธิ์คลายตัวของหลอดเลือดดำที่แยกจากกายของหนูขาวและกระตุ้นให้หดตัวด้วย noradrenaline ของสารสกัดหยาบจากซิง รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากซิง ได้แก่ 6]-gingerol และ [6]-shogaol นอกจากนั้นทั้งสารสกัดและสารออกฤทธิ์ดังกล่าวทั้งสองชนิดยังสามารถทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดอีกด้วย โดยกลไกที่เกี่ยวข้องส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากการไปเปลี่ยนแปลงระดับแคลเซียมภายในเซลล์ อีกทั้งซิงยังช่วยลดความไวต่อสารกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการแพ้ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของโรคหอบหืด ดังนั้นเป็นไปได้อย่างยิ่งที่ซิงจะมีประโยชน์อย่างมากในการเบาเทาอาการหายใจลำบากในผู้ป่วยโรคหอบหืด โดยอาจใช้ทั้งแบบยาเดี่ยวหรือร่วมกับยาที่ออกฤทธิ์กระตุ้น β -adrenergic receptor (Townsend et al., 2013) เมื่อไม่นานมานี้เอง นักวิจัยได้ทำการทดสอบเพื่ออธิบายกลไกการออกฤทธิ์ภายในเซลล์ของ [6]-gingerol, [8]-gingerol และ [6]-shogaol ในการเสริมฤทธิ์กับยาที่กระตุ้น β -adrenergic receptor พบว่าสารออกฤทธิ์ของซิงเหล่านี้ไปยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase type 4 และ cytoskeletal regulatory protein ต่างๆ ภายในเซลล์ (Townsend et al., 2014) ก่อให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด นอกจากนี้ นักวิจัยยังพบวาสารสกัดด้วยน้ำจากเหง้าซิงยังสามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือด aorta ที่ถูกกระตุ้นด้วย phenylephrine และ atropine ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่า ฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของซิงเกิดจากการกระตุ้น muscarinic receptor และการปิดกั้น Ca²⁺ channel (Ghayur et al., 2005) สุดท้าย นักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอล-น้ำจากเหง้าซิงต่อการหดตัวของหลอดเลือดโดยการการศึกษาใน lung slice ที่เตรียมจากหนูถีบจักร พบว่าฤทธิ์ต้านการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบเกี่ยวข้องกับการปิดกั้นของ Ca²⁺ channel เช่นเดียวกัน (Ghayur et al., 2008) จากผลการทดลองที่ได้รายงานมาแล้วทั้งหมด ทำให้เกิดหลักฐานที่ค่อนข้างชัดเจนซิงเป็นพืชที่มีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคหลอดเลือด เช่นบรรเทาอาการไอ และใช้บรรเทาอาการหายใจลำบากในผู้ป่วยโรคหอบหืด อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันซิงต่อการหดตัวของหลอดเลือดมาก่อน อีกทั้งยังไม่เคยมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ของน้ำมันซิงและกลไกออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

Citral (cis/trans), eucalyptol, camphene, carbachol, propranolol, L-NAME, hexane และ indomethacin ที่ใช้ในการศึกษานี้ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich (สหรัฐอเมริกา) NaCl, NaHCO₃, CaCl₂, KCl, NaH₂PO₄, MgSO₄ และ glucose ซื้อจากบริษัท Carlo Erba (อิตาลี)

2. การเก็บพืช

เหง้าขิง (อายุประมาณ 10-12 เดือน) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ซื้อมาจากตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา การพิสูจน์เพื่อยืนยันชนิดของพืชทำโดย ผศ. ดร. สุรพล แสนสุข คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตัวอย่างพืชเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (หมายเลขตัวอย่าง: Pharm-Chu-004)



รูปที่ 3.1 เหง้าขิงตัวอย่าง

3. การสกัดน้ำมันขิง

หลังจากล้างเศษดินและสิ่งที่เป็นเปื้อนออกจากตัวอย่างจนสะอาดด้วยน้ำและน้ำกลั่นในครั้งสุดท้ายแล้ว นำไปหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปกลั่นด้วยน้ำ (water-distillation) ที่ 80°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำน้ำมันขิงที่ได้ไปทำให้ปราศจากน้ำด้วยการเติม anhydrous sodium sulfate ลงไป เก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อ ตัวทำละลายที่ใช้เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของน้ำมันขิงคือ hexane ที่ความเข้มข้น 1:1 v/v

4. การตรวจสอบส่วนประกอบในน้ำมันขิง

การตรวจสอบชนิดของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันขิงทำได้โดยใช้เครื่อง gas chromatography และ mass spectrometry (GC/MS; Model CP-3800-1200 L Quadrupole MS/MS) คอลัมน์ที่ใช้แยกสารคือ FactorFour capillary column VF-5ms ขนาด $30\text{ m} \times 2.25\text{ mm}; 0.25\text{ }\mu\text{m}$) โดยมีก๊าซ helium เป็นตัวพาด้วยความเร็ว 0.7 ml/min อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 250°C ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้ได้ 40°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนปรับให้เพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 4°C/min จนกระทั่งถึง 250°C เครื่อง spectrometer ใช้แบบ electron ionization (EI) mode โดยใช้ ionization energy เท่ากับ 70 eV ช่วงการสแกนอยู่ระหว่าง $35\text{--}400\text{ amu}$ ตั้งเครื่อง detector ไว้ที่ 1200 V ตั้งอัตราเร็วการสแกนที่ 0.5 sec per scan อุณหภูมิแหล่งกำเนิดไอออนตั้งที่ 250°C การระบุชนิดของสารทำได้โดยเปรียบเทียบ mass spectra ที่ได้กับข้อมูลจาก The National Institute of Standards and Technology (NIST) library ซึ่งผู้ผลิตจัดหาให้มาพร้อมกับเครื่องมือ การตรวจสอบยืนยันทำได้โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

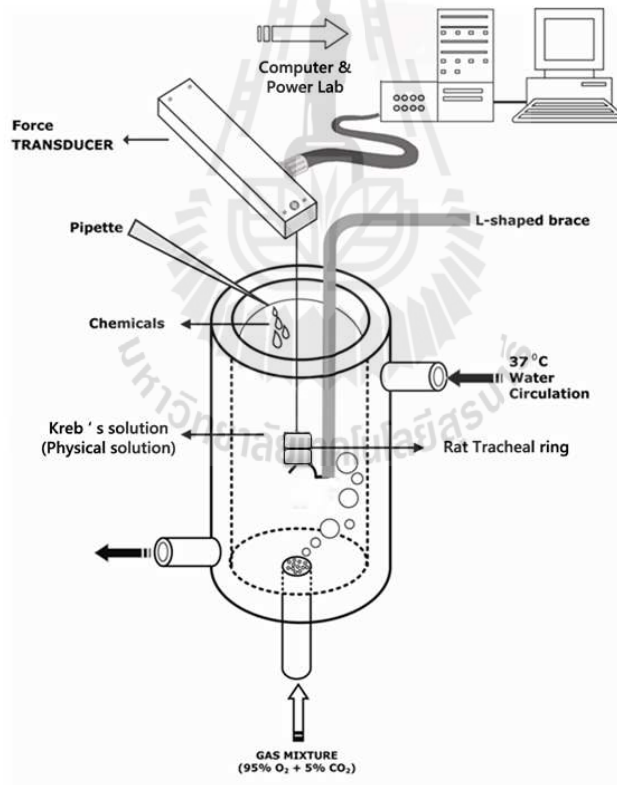
5. การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

5.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar น้ำหนัก $230\text{--}380\text{ กรัม}$ ได้มาจากหน่วยงานสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี การดูแลและปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองเป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองแห่งชาติ ภายใต้การกำกับดูแลของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งวิธีการทดลองของโครงการได้รับการรับรองแล้วจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์ทดลอง โดยให้หนูทดลองอยู่ในกรงแขวน 2 ตัว/กรง ปูด้วยวัสดุรองนอน ให้กินน้ำและอาหารแบบอิสระ ควบคุมอุณหภูมิห้องให้ได้ $25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $45\text{--}50\%$ ให้แสงสว่างโดยปิดเปิดไฟสลับกันช่วงละ 12 ชั่วโมง

5.2 การเตรียมหลอดลม

การแยกหลอดลมจากกายของหนูขาวทำตามวิธีที่ได้รายงานมาแล้ว (Evangelista et al., 2007) ดังต่อไปนี้ หนูถูกเมตาฆ่าตายด้วยการเคลื่อนกระดูกคอ ตัดหลอดลมออกจากกายสัตว์ทดลอง แล้วทำการเลาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจนหมด จากนั้นตัดตามขวางออกเป็นส่วนๆ แต่ละส่วนจะมีลักษณะเป็นวงแหวนประกอบด้วย 2 cartilage ซึ่งจะทำให้ได้วงแหวนหลอดลมมีความกว้างประมาณ 2-3 มิลลิเมตร นำแต่ละวงแหวนไปแชวนติดตั้งในอ่างทดสอบ (organ bath) ขนาดความจุ 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลาย Krebs's (pH 7.4) ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37°C และพ่น carbogen (ประกอบด้วย $\text{O}_2=95\%$ และ $\text{CO}_2=5\%$) ลงในสารละลายตลอดการทดลอง ส่วนประกอบของสารละลาย Krebs's ในหน่วย mM เป็นดังต่อไปนี้: NaCl (120), NaHCO_3 (22), CaCl_2 (2.5), KCl (4.6), NaH_2PO_4 (1.2), MgSO_4 (1.2) และ glucose (11.5) การผูกหลอดลมด้านหนึ่งกับตะขอด้านล่าง ส่วนอีกปลายหนึ่งต่อเข้ากับ force transducer (Model MLT 1030/D, ADInstruments) ดังรูปที่ 3.2



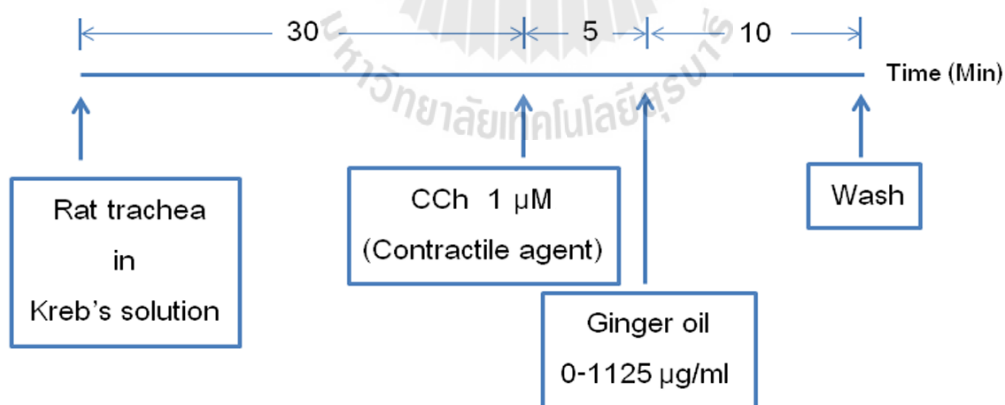
รูปที่ 3.2 เครื่องมือวัดแรงดึงของกล้ามเนื้อหลอดลมที่แยกจากกายของหนูขาว
(ดัดแปลงจาก Yildiz, Seyrek, and Gul, 2003)

5.3 การวัดแรงดึงของกล้ามเนื้อหลอดลม

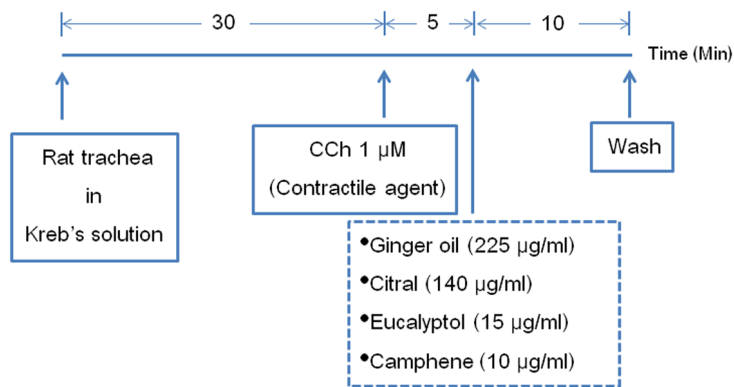
วงแหวนหลอดลมที่ถูกติดตั้งตามข้อ 5.2 แล้วจะถูกปล่อยให้เข้าสู่สภาวะพัก (ความตึง 1 กรัม) นานเป็นเวลา 30 นาทีก่อนเริ่มทำการทดลอง แรงดึงของกล้ามเนื้อถูกวัดด้วย isometric force transducers แล้วส่งสัญญาณไปบันทึกไว้ด้วยเครื่อง Power Lab Chart recorder (Model ML866, ADInstruments) หลังจากที่เข้าสู่สภาวะปกติแล้ว หลอดลมจะถูกกระตุ้นด้วย $1 \mu\text{M}$ carbachol (CCh) carbachol เป็นสารออกฤทธิ์กระตุ้น muscarinic receptor แบบไม่เฉพาะเจาะจง แรงดึงที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วย carbachol จะใช้เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากทำการทดลองเสร็จในแต่ละการทดลอง หลอดลมจะถูกล้างด้วยสารละลาย Krebs's หลายครั้งๆ ละ 15 นาที จนกระทั่งแรงดึงกลับเข้าสู่สภาวะปกติก่อนเริ่มทำการทดลองครั้งต่อไป

5.4 การศึกษาผลของน้ำมันขิงต่อการหดตัวของหลอดลมที่ถูกกระตุ้นด้วย carbachol

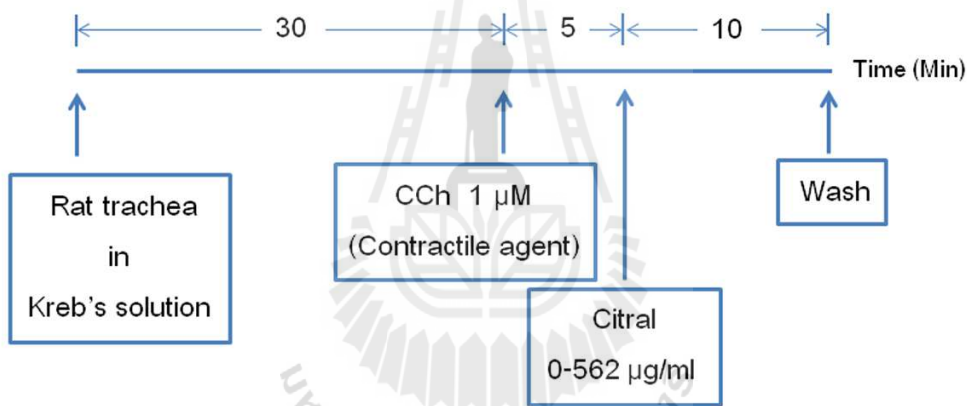
หลังจากกระตุ้นด้วย carbachol รอจนกระทั่งการหดตัวของหลอดลมคงที่ไม่เพิ่มขึ้นอีกต่อไป นาน 5 นาที เติมสารละลายน้ำมันขิงให้ความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ $0-1125 \mu\text{g/ml}$ เพื่อหา dose response curve การตอบสนองของน้ำมันขิงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อแสดงค่าเป็น %การหดตัว เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้จากการกระตุ้นด้วย carbachol ผู้วิจัยได้ทดสอบการตอบสนองของหลอดลมต่อตัวทำละลาย hexane ที่ความเข้มข้นเดียวกับในสารละลายน้ำมันขิง คือ 0.125% พบว่าไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลม ช่วงเวลาของการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 รูปแบบการทดลองเพื่อศึกษาการตอบสนองของหลอดลมต่อน้ำมันขิง



รูปที่ 3.4 รูปแบบการทดลองเพื่อวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันขิง



รูปที่ 3.5 รูปแบบการทดลองเพื่อวิเคราะห์หา dose response curve ของ citral

5.5 การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ในน้ำมันขิงที่ทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัว

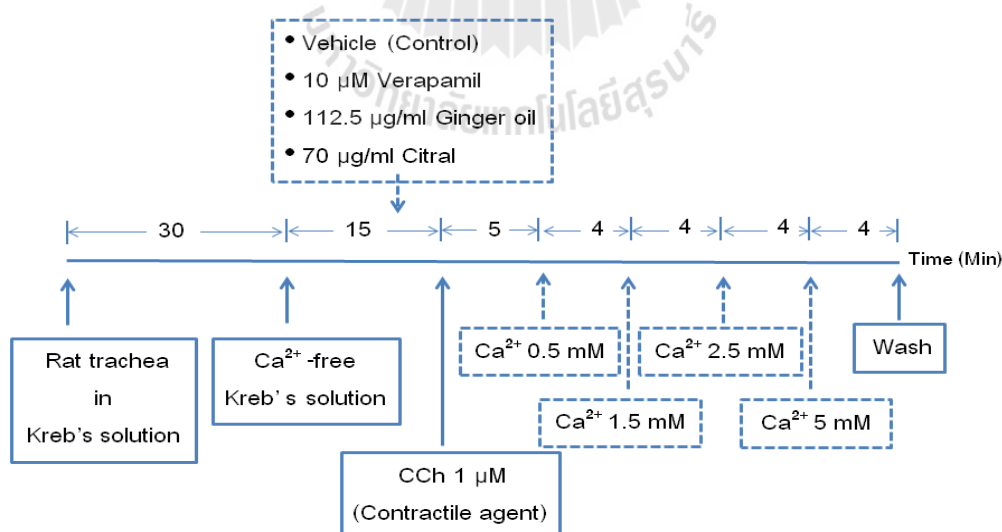
การทดสอบหาสารออกฤทธิ์ของน้ำมันขิงในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบทำโดยนำเนื้อเยื่อจากหลอดลมที่ตัดได้เป็นวงแหวนไปป้อนในสารละลาย Krebs นาน 30 นาทีแล้วชักนำให้เกิดการหดตัวด้วย 1 μM carbachol หลังจากกล้ามเนื้อหดตัวคงที่นาน 5 นาทีแล้วจึงเติมสารละลายน้ำมันขิงให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 225 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งการหดตัวที่ 50% (half-maximal inhibition concentration: IC_{50}) ความเข้มข้นดังกล่าวเมื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC/MS แล้วพบว่า มีส่วนประกอบเป็น citral, eucalyptol และ camphene เท่ากับ 140, 15, และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการ

ประเมินฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของ citral, eucalyptol และ camphene ตามความเข้มข้นที่คำนวณได้ (รูปที่ 3.4) และจากผลการทดลองพบว่า citral เป็นสารหลักที่ส่งผลให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อ จากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของ citral เพิ่มเติมเพื่อหา dose response curve และค่า IC_{50} ของ citral โดยการทดสอบกับความเข้มข้นตั้งแต่ 0–562 $\mu\text{g/ml}$ ตามการทดลองในรูปที่ 3.5

6. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ

6.1 ผลของน้ำมันขิงและ citral ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อมี calcium ภายนอกเซลล์ในระดับต่างๆ กัน

การทดสอบหากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral ว่าเกี่ยวข้องกับ การเข้าออกของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์หรือไม่ ทำโดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์กับการตอบสนอง ต่อฤทธิ์ของยา (concentration–response relationship) เนื้อเยื่อของหลอดลมถูกป้อนในสารละลาย Krebs's ซึ่งปราศจากแคลเซียม (แทน CaCl_2 ด้วย 80 mM KCl ร่วมกับการเติม 1 mM EGTA) แล้วเติมน้ำมันขิง (112.5 $\mu\text{g/ml}$) หรือ citral (70 $\mu\text{g/ml}$) ลงในสารละลาย จากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์สะสมเป็นลำดับขั้นจาก 0, 1.5, 2.5 และ 5 mM การทดลองนี้ใช้ verapamil hydrochloride (10 μM) ซึ่งออกฤทธิ์เป็น calcium channel blocker แทนน้ำมันขิงและ citral เพื่อเป็น positive control การออกแบบการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 3.6

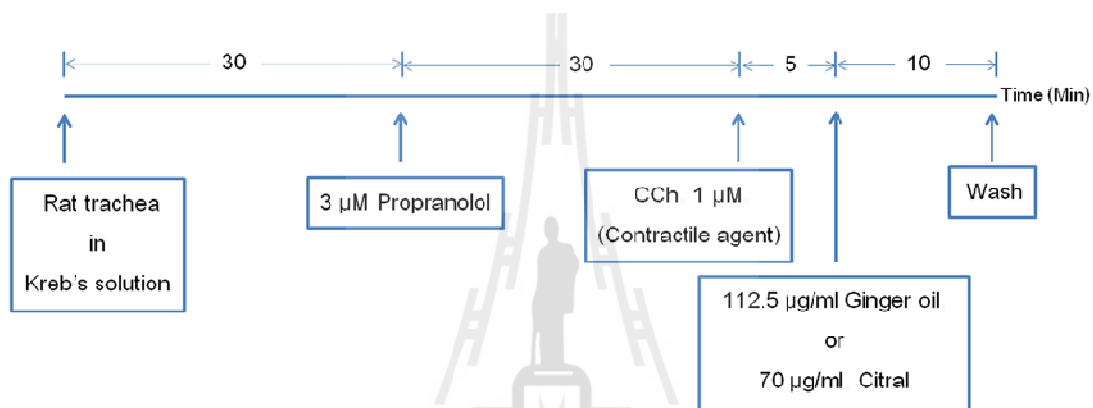


รูปที่ 3.6 รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ calcium ภายนอกเซลล์ต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral

6.2 ผลของสารต้าน β -adrenergic receptor ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ

citral

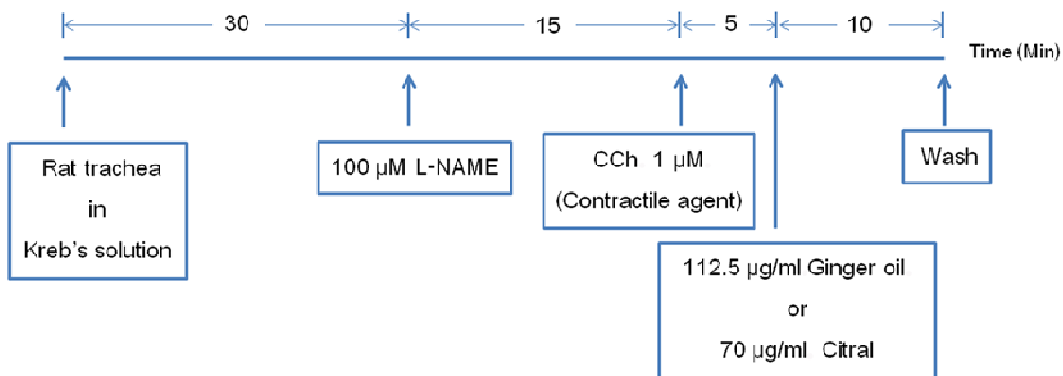
ในการทดสอบความเกี่ยวข้องระหว่างฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral กับ β -adrenergic receptor ทำโดยบ่มเนื้อเยื่อด้วยสารต้าน β -adrenergic receptor ซึ่งมีชื่อว่า propranolol ($3 \mu\text{M}$) เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการกระตุ้นด้วย $1 \mu\text{M}$ carbachol จากนั้นถึงเติมน้ำมันขิง ($112.5 \mu\text{g/ml}$) หรือ citral ($70 \mu\text{g/ml}$) ลงในอ่างทดสอบ เปรียบเทียบกับผลตอบสนองของน้ำมันขิงและ citral เมื่อไม่ถูกบ่มด้วย propranolol ก่อนการถูกกระตุ้น ช่วงเวลาของการบ่มสารต่าง ๆ เป็นไปดังรูป 3.7



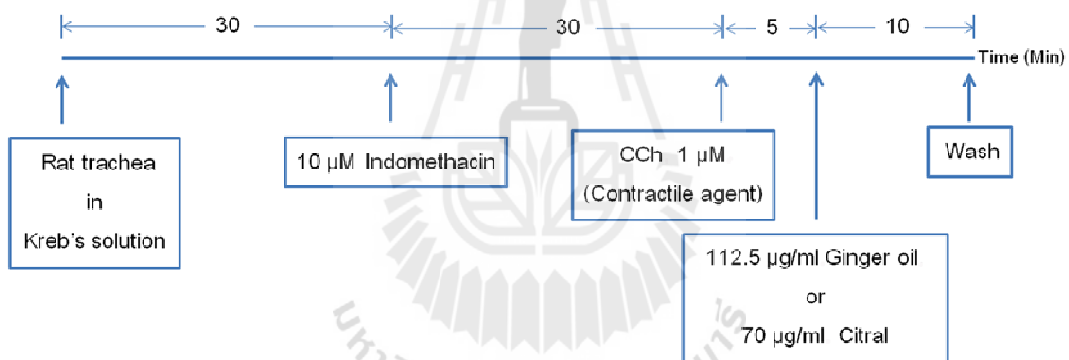
รูปที่ 3.7 รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ propranolol ต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral

6.3 ผลของสารต้าน nitric oxide synthase และ cyclooxygenase ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral

เพื่อทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ซึ่งเกี่ยวข้องกับ nitric oxide ของน้ำมันขิงและ citral ทำการบ่มเนื้อเยื่อด้วย L-NAME ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ นาน 15 นาทีก่อนการกระตุ้นด้วย carbachol (Estrada-Soto et al., 2012) ส่วนการศึกษาความเกี่ยวข้องกับ prostaglandin หลอดลมถูกบ่มด้วย indomethacin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ cyclooxygenase ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 30 นาที (Sydney de Sousa et al., 2010) หลังจากการหดตัวจากการกระตุ้นด้วย carbachol คงที่เป็นเวลา 5 นาที จึงเติมน้ำมันขิงและ citral ลงในอ่างทดสอบ ทำนองเดียวกับการทดลองในข้อ 6.2 ช่วงเวลาของการศึกษาเกี่ยวกับ nitric oxide และ cyclooxygenase pathway เป็นไปดังรูป 3.8 และ 3.9 ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ L-NAME ต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral



รูปที่ 3.9 รูปแบบการทดลองเพื่อทดสอบผลของ indomethacin ต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ทั้งหมดแสดงอยู่ในค่าของ mean \pm standard error of mean (S.E.M) ค่า IC_{50} ของสารต่างๆ หมายถึงค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลมคิดเป็น 50% ของการตอบสนองสูงสุดเมื่อกระตุ้นด้วย carbachol ส่วนค่า EC_{50} เป็นความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งผลของสารกระตุ้นลง 50% ทั้งค่า IC_{50} และ EC_{50} เป็นค่าการคำนวณจากกราฟ semi-logarithmic plots แสดงอยู่ในหน่วยของ $\mu\text{g/ml}$

วิธีทางสถิติที่ใช้ทดสอบความแตกต่างของข้อมูลในการศึกษานี้ คือ Student's paired t-tests เพื่อทดสอบก่อนและหลังการใช้สาร ส่วน one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Student-Newman-Keuls comparison test ใช้ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 18 ในการวิเคราะห์ ความแตกต่างที่มีค่า $p < 0.05$ ใช้เป็นเกณฑ์ในตัดสินว่า ข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

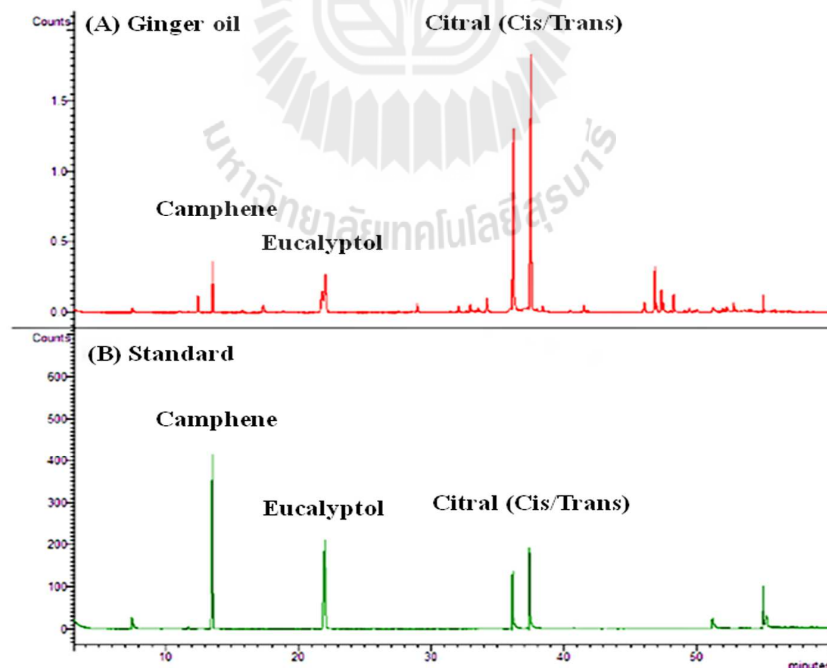


บทที่ 4

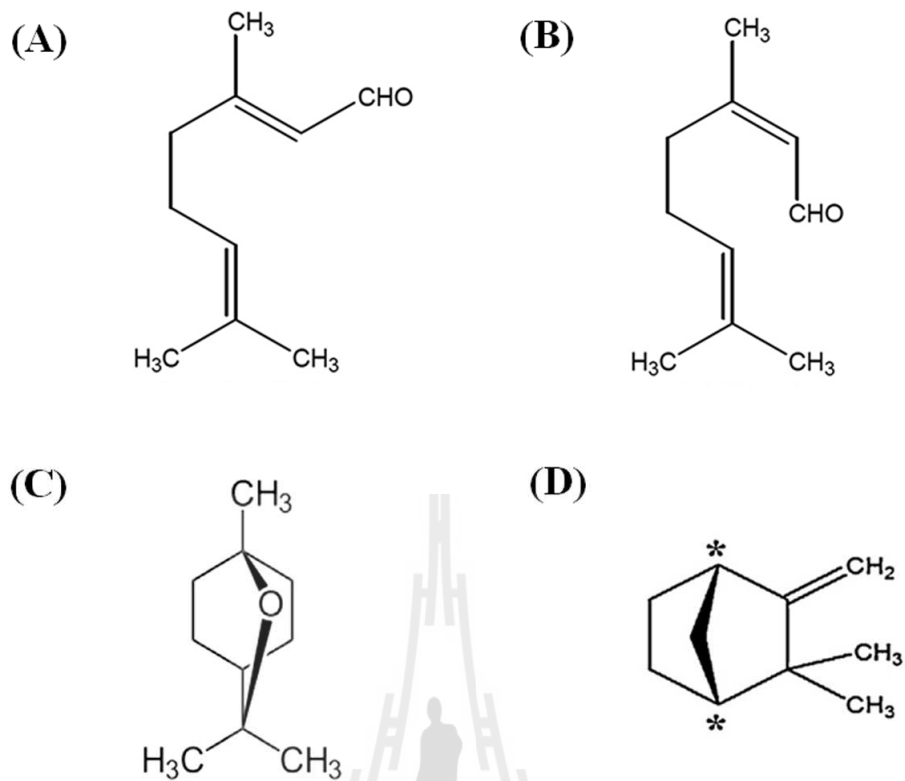
ผลการวิจัย

4.1 สารประกอบในน้ำมันขิง

น้ำมันขิงที่สกัดได้จากวิธีกลั่นด้วยน้ำซึ่งได้จากการศึกษานี้มีลักษณะเป็นสีเหลืองอ่อนมีกลิ่นฉุน ปริมาณ yield ที่สกัดได้ประมาณ 0.13% (w/w) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมที่ได้กับข้อมูล NIST library พบว่าประกอบด้วยสารจำนวนมาก แต่ด้วยข้อจำกัดในการจัดหาสารมาตรฐานมาเปรียบเทียบ การวิจัยครั้งนี้จึงใช้สารมาตรฐานซึ่งพบในปริมาณสูงที่สุดมาทำการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณที่มีอยู่ในน้ำมันขิง ซึ่งประกอบด้วยสาร 3 ชนิด คือ citral, eucalyptol และ camphene ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC/MS (รูปที่ 4.1) ทำให้ทราบว่า citral เป็นสารประกอบหลัก โดยเมื่อคำนวณเป็น % แล้วพบว่า น้ำมันขิงมีส่วนประกอบเป็น citral อยู่ 62.4% และมี eucalyptol และ camphene อยู่ 6.9% และ 4.6% ตามลำดับ ส่วนที่เหลืออีก 26.1% เป็นสารที่ยังไม่ได้วิเคราะห์ให้แน่ชัดว่าเป็นสารชนิดใดในงานวิจัยนี้



รูปที่ 4.1 สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันขิงจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS (A) chromatogram ที่ได้จากน้ำมันขิง และ (B) chromatogram ที่ได้จากสารมาตรฐาน



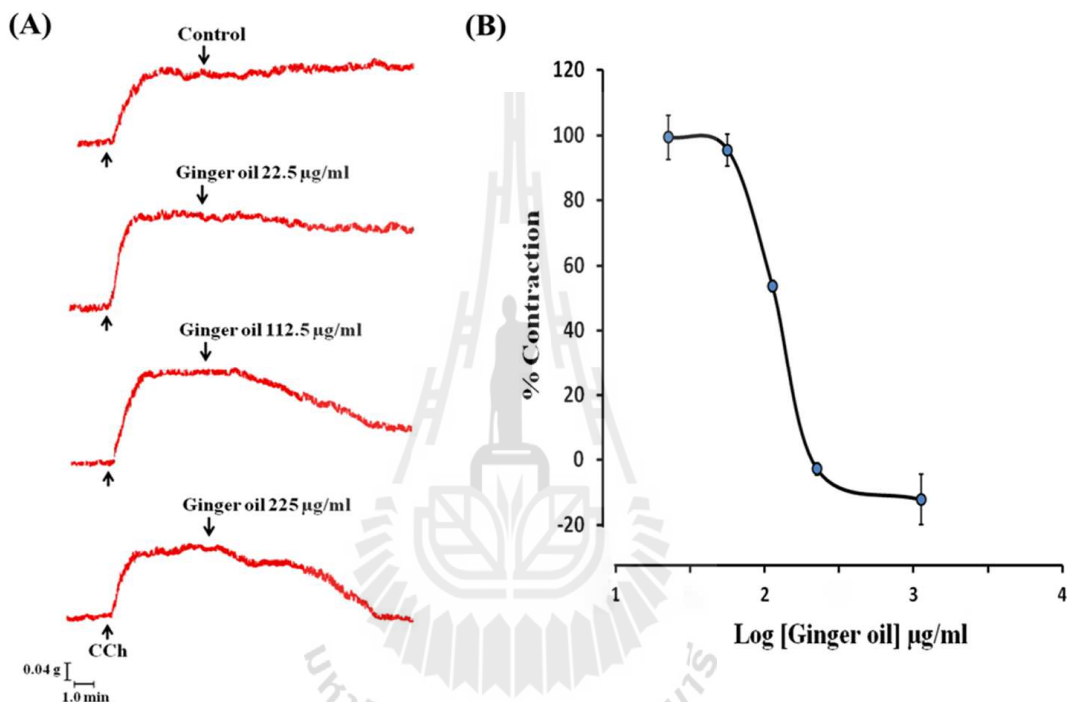
รูปที่ 4.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหลักซึ่งพบในน้ำมันขิง (A) Geranial (trans-citral หรือ citral A); (B) Neral (cis-citral หรือ citral B) [ที่มาของรูป: Dudai et al., 2000]; (C) 1,8-cineole หรือ eucalyptol [ที่มาของรูป: Rodenak Kladniew et al., 2014] และ (D) DL-camphene (* หมายถึง chiral centers) [ที่มาของรูป: Lee, Chiu, Lee, and Lee, 2014]

ดังที่ปรากฏในรูปที่ 4.2A และ 4.2B จะเห็นว่า citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal) เป็น linear monoterpene ที่ประกอบไปด้วย geometric isomers 2 แบบ ได้แก่ trans-citral หรือ citral A โดยมีชื่อเรียกเป็นชื่อพ้องว่า geranial ส่วนอีกไอโซเมอร์หนึ่งเป็น cis-citral หรือ citral B มีชื่อพ้องว่า neral สามารถพบไอโซเมอร์ทั้งสองชนิดนี้ในน้ำมันหอมระเหยที่เป็นส่วนประกอบในพืชอื่นๆ หลายชนิด (Dudai et al., 2000; Dudai, Weinstein, Krup, Rabinski, and Ofir, 2005) นอกจากนี้ในรูปที่ 4.2 ยังแสดงโครงสร้างของ eucalyptol (รูป 4.2C) และ camphene (รูป 4.2D) ที่พบในน้ำมันขิงด้วย

4.2 ผลของน้ำมันขิงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมหลังกระตุ้นด้วย carbachol

ผลการทดลองจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันขิงมีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมคลายตัวหลังจากที่กระตุ้นให้เกิดการหดตัวด้วย carbachol อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

รูปที่ 4.3A แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อการยับยั้งการหดตัวของหลอดลมของน้ำมันขิงในความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1125 $\mu\text{g/ml}$ ฤทธิ์คลายตัวกล้ามเนื้อเรียบของน้ำมันขิงเป็นไปแบบที่เรียกว่า concentration-dependent (รูปที่ 4.3B) หลังการคำนวณพบว่าค่า IC_{50} ของน้ำมันขิงที่ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อหลอดลมเท่ากับ $120 \pm 17 \mu\text{g/ml}$ ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบตัวทำละลายความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการละลายน้ำมันขิงพบว่า ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลังถูกกระตุ้นด้วย carbachol

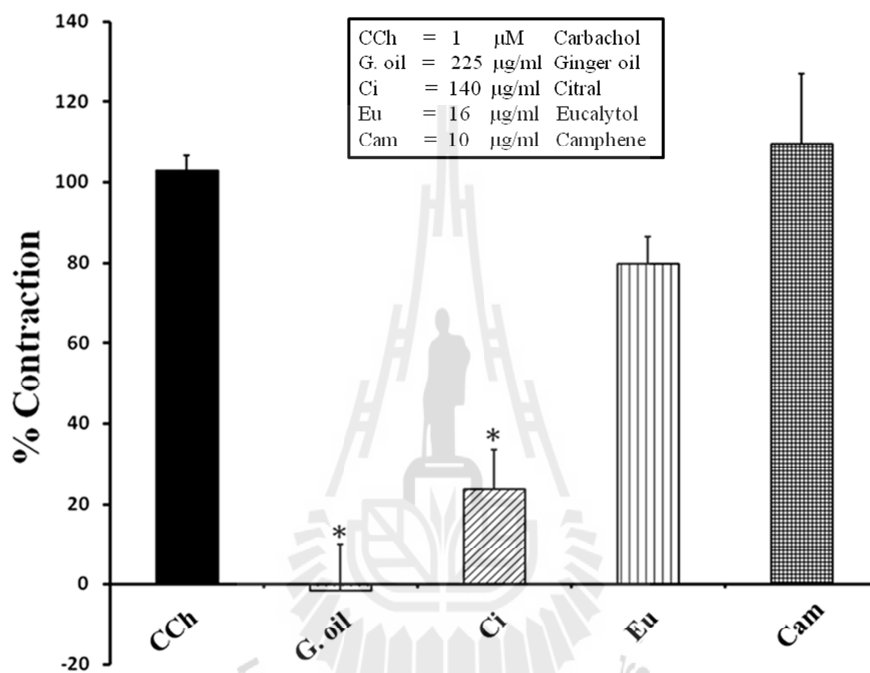


รูปที่ 4.3 ฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของน้ำมันขิง (A) Tracing แสดงการตอบสนองของกล้ามเนื้อเรียบต่อน้ำมันขิง (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการตอบสนองกับความเข้มข้นของน้ำมันขิง (concentration-response curve) ค่าที่ใช้ในรูป B คือ % การหดตัวเมื่อเทียบกับการหดตัวเต็มที่หลังถูกกระตุ้นด้วย carbachol (1 μM) โดยไม่ได้รับน้ำมันขิง ค่า IC_{50} ของน้ำมันขิงที่คำนวณได้เท่ากับ $120 \pm 17 \mu\text{g/ml}$ ($n = 5-8$)

4.3 สารออกฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบในน้ำมันขิง

ผลการทดลองในรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นถึงผลของน้ำมันขิงในขนาด 225 $\mu\text{g/ml}$ ว่าทำให้เกิดการคลายตัวอย่างสมบูรณ์ เมื่อทดสอบการตอบสนองของหลอดลมด้วย citral ขนาด 140 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเท่ากับที่มีอยู่ในน้ำมันขิงที่ความเข้มข้น 225 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสามารถยับยั้งการหด

ตัวลงเหลือ $23.7 \pm 9.9\%$ ($p < 0.05$) ส่วนการทดสอบด้วย eucalyptol นั้นเนื่องจาก eucalyptol เป็นส่วนประกอบในน้ำมันขิงเพียง 6.9% ความเข้มข้นของ eucalyptol ในการทดลองนี้จึงเท่ากับ $16 \mu\text{g/ml}$ เท่านั้น พบว่า eucalyptol ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมเหลือ $79.8 \pm 6.7\%$ ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และดังที่เห็นได้จากรูปที่ 4.4 camphene ในขนาด $10 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งเท่ากับที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันขิงไม่มีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ

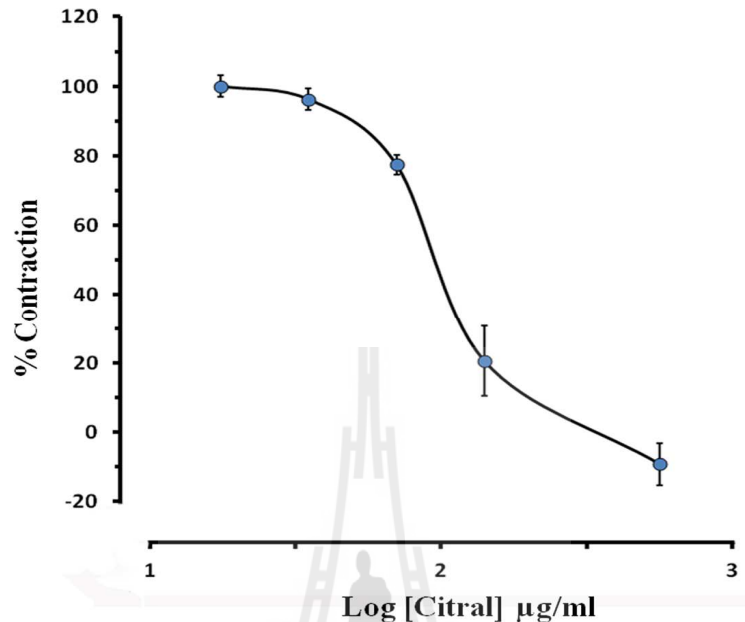


รูปที่ 4.4 ผลของสารประกอบในน้ำมันขิงต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม หลังจากเติมน้ำมันขิง (225 $\mu\text{g/ml}$), citral (140 $\mu\text{g/ml}$) และ eucalyptol (16 $\mu\text{g/ml}$) ลงในอ่างทดลองพบว่า การหดตัวลงเหลือ -1.5 ± 11.5 , 23.7 ± 9.9 และ $79.8 \pm 6.7\%$ ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($102.9 \pm 3.7\%$) ค่าการหดตัวที่เกิดจากการเติม camphene (10 $\mu\text{g/ml}$) เท่ากับ $109.5 \pm 17.5\%$ ค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่า mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ ($n = 5-8$)

4.4ฤทธิ์ของ citral ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 4.3 พบว่า citral เป็นสารออกฤทธิ์หลักของน้ำมันขิง จึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของ citral ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการหดตัวของหลอดลม ในรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นถึงผลการตอบสนองของหลอดลมต่อ citral ในความเข้มข้นตั้งแต่ 0–562 $\mu\text{g/ml}$

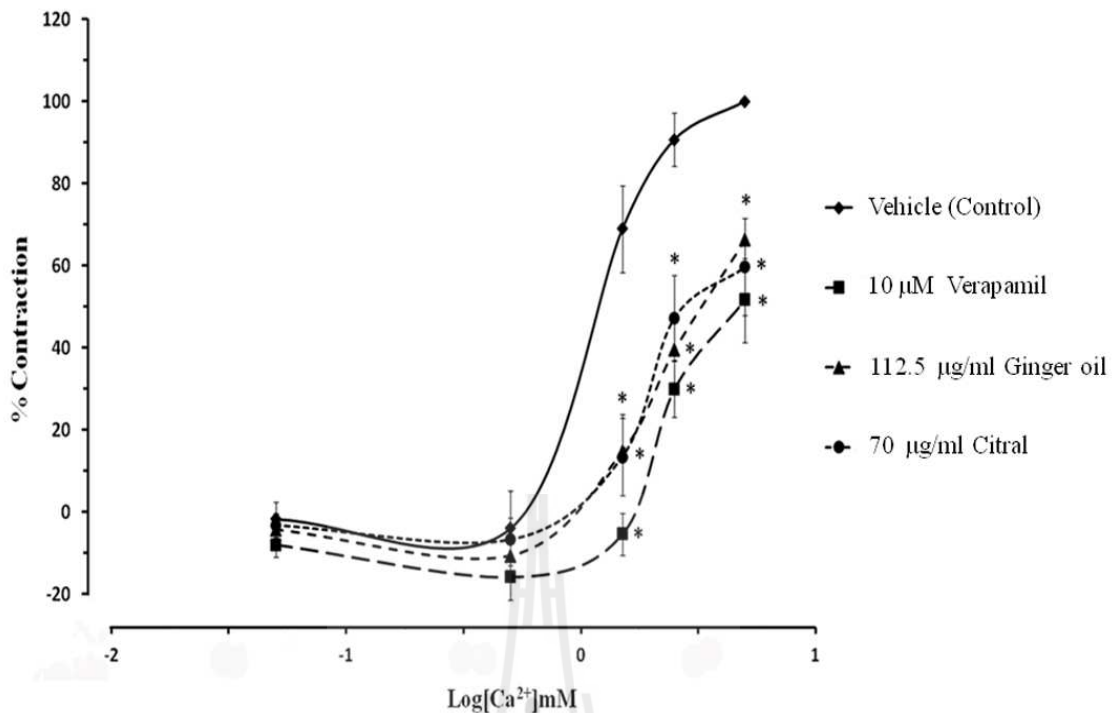
การยับยั้งการหดตัวของหลอดลมของ citral เป็นแบบที่เรียกว่า concentration-dependent fashion ค่า IC_{50} ที่คำนวณได้เท่ากับ $110 \pm 9 \mu\text{g/ml}$



รูปที่ 4.5 การตอบสนองของกล้ามเนื้อหลอดลมต่อ citral ความเข้มข้นของ citral ที่ใช้อยู่ระหว่าง 0–562 $\mu\text{g/ml}$ จากการคำนวณพบว่าค่า EC_{50} ของ citral เท่ากับ $110 \pm 9 \mu\text{g/ml}$ ค่าการหดตัวที่แสดงในกราฟเป็นค่า mean \pm S.E.M. (n = 6)

4.5 ผลของน้ำมันขิงและ citral ต่อการทำงานของ Ca^{2+} channel

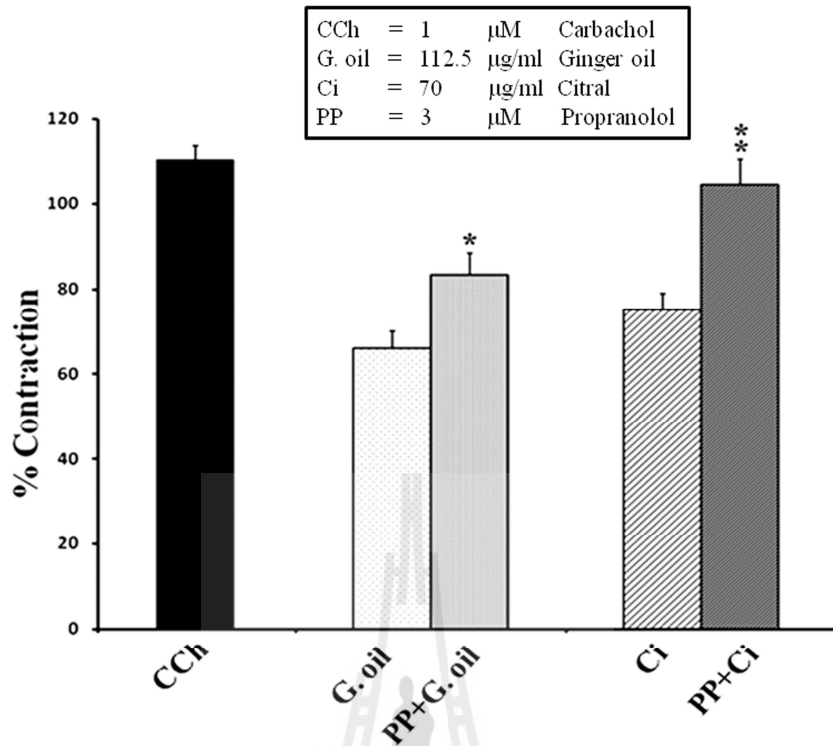
การศึกษาผลของน้ำมันขิงและ citral ต่อการทำงานของ Ca^{2+} channel ทำโดยศึกษาอิทธิพลของแคลเซียมภายนอกเซลล์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.6 กราฟ concentration–response ของแคลเซียมภายนอกเซลล์เริ่มตั้งแต่ความเข้มข้น 0–5 mM verapamil (10 μM) ที่ใช้เป็น positive control จะยับยั้งการทำงานของ calcium channel ทำให้การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลดลง จะเห็นได้ว่าทั้งน้ำมันขิงและ citral ทำให้กราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวเคลื่อนไปทางขวาเช่นเดียวกับ verapamil ค่า EC_{50} ของ $CaCl_2$ ขณะที่ไม่มีสารอื่นพบว่าเท่ากับ $2.4 \pm 0.2 \text{ mM}$ ขณะที่ EC_{50} ของ $CaCl_2$ เมื่อบ่มพร้อมกับน้ำมันขิง (112.5 $\mu\text{g/ml}$) และ citral (70 $\mu\text{g/ml}$) เพิ่มขึ้นเป็น 4.3 ± 0.2 และ $6.6 \pm 1.1 \text{ mM}$ ตามลำดับ ในกรณีของ verapamil พบว่าค่า EC_{50} ของ $CaCl_2$ เพิ่มขึ้นเป็น $6.5 \pm 1.4 \text{ mM}$



รูปที่ 4.6 กราฟ concentration–response ของแคลเซียมภายนอกเซลล์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลม กราฟความสัมพันธ์เคลื่อนไปทางขวาเมื่อกล้ามเนื้อได้รับการบ่มด้วย verapamil น้ำมันขิง และ citral คำนวณค่า EC_{50} ของ $CaCl_2$ ขณะที่ไม่มีสารอื่นเท่ากับ 2.4 ± 0.2 mM ขณะที่ EC_{50} ของ $CaCl_2$ เมื่อบ่มพร้อม กับ verapamil (10 μ M) น้ำมันขิง (112.5 μ g/ml) และ citral (70 μ g/ml) เท่ากับ 6.5 ± 1.4 , 4.3 ± 0.2 และ 6.6 ± 1.1 mM ตามลำดับ ค่าที่แสดงในกราฟคือค่า mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ (n = 5–8)

4.6 ผลของยาต้าน β -adrenergic receptor ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral

รูปที่ 4.7 แสดงอิทธิพลของ propranolol ต่อการคลายตัวของหลอดลมเมื่อได้รับน้ำมันขิง และ citral พบว่าการบ่มเนื้อเยื่อหลอดลมด้วย propranolol จะทำให้ฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของทั้งน้ำมันขิง (112.5 μ g/ml) และ citral (70 μ g/ml) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เห็นได้จากเมื่อบ่มด้วย propranolol การหดตัวของกล้ามเนื้อที่ได้รับน้ำมันขิงเพิ่มจาก 66.1 ± 4.0 เป็น $83.5 \pm 4.9\%$ ขณะที่การหดตัวของกล้ามเนื้อที่ได้รับ citral เพิ่มจาก $75.3 \pm 3.7\%$ to $104.7 \pm 6.0\%$

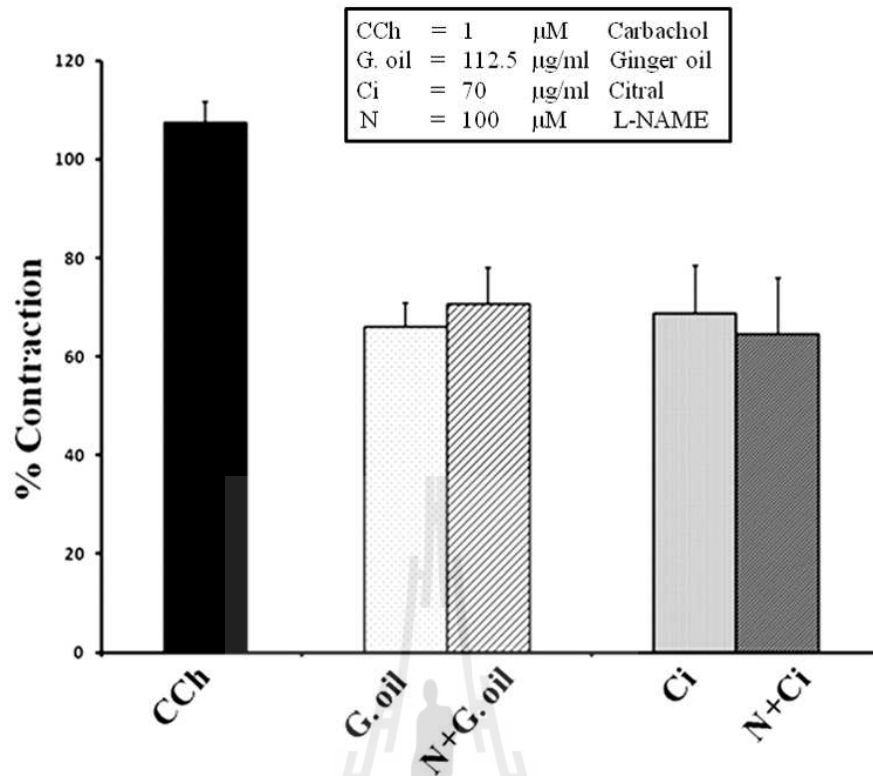


รูปที่ 4.7 ผลของยาต้าน β -adrenergic receptor ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral เปรียบเทียบฤทธิ์ของน้ำมันขิง (112.5 μ g/ml) และ citral (70 μ g/ml) ต่อหลอดลมระหว่างที่มีและไม่มี propranolol (3 μ M) หลังจากถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbachol (1 μ M) พบว่า propranolol ทำให้ลดฤทธิ์คลายตัวของน้ำมันขิงและ citral ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าที่แสดงในกราฟคือค่า mean \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ (n = 5–8) เทียบกับกลุ่มน้ำมันขิง และ ** $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม citral (n = 5–8)

4.7 ผลของสารยับยั้ง NOS ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral

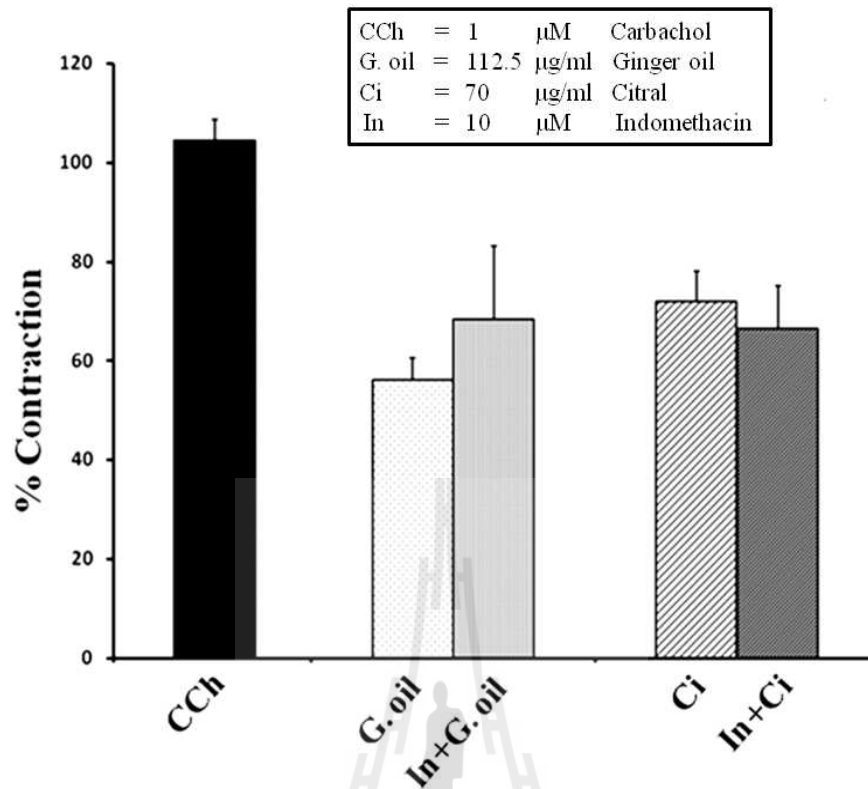
ผลการทดลองในรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของน้ำมันขิงและสารออกฤทธิ์ไม่เกี่ยวข้องกับ nitric oxide เพราะว่า L-NAME ไม่เปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของทั้งน้ำมันขิงและ citral ในการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) การตอบสนองของหลอดลมต่อ L-NAME หลังจากถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbachol แล้วได้รับน้ำมันขิงคือ $73.9 \pm 9.6\%$ (จากเดิมที่ไม่ได้รับ L-NAME คือ $68.9 \pm 9.6\%$) ขณะที่การตอบสนองของหลอดลมต่อ L-NAME หลังจากถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbachol แล้วได้รับ citral คือ $64.6 \pm 11.4\%$ (จากเดิมที่ไม่ได้รับ L-NAME คือ $70.7 \pm 7.5\%$)



รูปที่ 4.8 ผลของสารยับยั้ง NOS ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของน้ำมันขิง (112.5 $\mu\text{g/ml}$) และ citral (70 $\mu\text{g/ml}$) ต่อหลอดลมระหว่างที่มีและไม่มี L-NAME (100 μM) หลังจากถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbachol (1 μM) พบว่า L-NAME ไม่มีผลต่อฤทธิ์คลายตัวของน้ำมันขิง และ citral อย่างมีนัยสำคัญ ค่าที่แสดงในกราฟคือค่า mean \pm S.E.M. $p > 0.05$ ($n = 5-8$)

4.8 ผลของสารยับยั้ง COX ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral

ผลการทดลองเพื่อศึกษา COX pathway เป็นไปในทำนองเดียวกับ NOS pathway จากรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมไม่เกี่ยวข้องกับ prostaglandin เนื่องจาก indomethacin ไม่เปลี่ยนแปลงฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของทั้งน้ำมันขิงและ citral อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) การตอบสนองของหลอดลมต่อ indomethacin หลังจากถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbachol แล้วได้รับน้ำมันขิงคือ $68.2 \pm 15.0\%$ (จากเดิมที่ไม่ได้รับ indomethacin คือ $56.1 \pm 4.5\%$) ขณะที่การตอบสนองของหลอดลมต่อ indomethacin หลังจากถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbachol แล้วได้รับ citral คือ $66.4 \pm 8.7\%$ (จากเดิมที่ไม่ได้รับ indomethacin คือ $72.0 \pm 6.2\%$)



รูปที่ 4.9 ผลของสารยับยั้ง COX ต่อฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของน้ำมันขิง (112.5 μ g/ml) และ citral (70 μ g/ml) ต่อหลอดลมระหว่างที่มีและไม่มี indomethacin (10 μ M) หลังจากถูกกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbachol (1 μ M) พบว่า indomethacin ไม่มีผลต่อฤทธิ์คลายตัวกล้ามเนื้อเรียบของน้ำมันขิงและ citral อย่างมีนัยสำคัญ ค่าที่แสดงในกราฟคือค่า mean \pm S.E.M. $p > 0.05$ (n = 5-8)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การใช้ซิงเพื่อเป็นยารักษาโรคทางเลือกยังคงเป็นที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัย ไม่ว่าจะเป็นการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร (Apariman *et al.*, 2006; Willetts *et al.*, 2003; Yamahara *et al.*, 1989) ช่วยลดความดันโลหิต (Ghayur *et al.*, 2005) และใช้แก้ปวดลดอักเสบ (Altman and Marcussen, 2001) มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำน้ำมันซิงมาใช้ในสูคนธบำบัด (aromatherapy) เพื่อเป็นการรักษาทางเลือกในการบรรเทาอาการปวดเข่า (Yip and Tam, 2008) และซิงยังมีฤทธิ์ทำให้มดลูกคลายตัวช่วยลดอาการปวดประจำเดือน (Buddhakala *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาดด้วยน้ำและเมทานอลจากซิงช่วยคลายกล้ามเนื้อหลอดลมของหนูขาวได้ (Ghayur and Gilani, 2007) พบว่าซิงสามารถลดความไวในการถูกกระตุ้นและการทำลายโครงสร้างของหลอดลม (Aimbire *et al.*, 2007; Kuo, Hsu, Huang, Tsai, and Ko, 2011) มีการวิจัยในมนุษย์พบว่าซิงสามารถลดการตีบตัวของหลอดลมในผู้ป่วยโรคหอบหืด (Rouhi *et al.*, 2006) การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อแสดงฤทธิ์ขยายหลอดลมของน้ำมันซิงและสารออกฤทธิ์ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม รวมทั้งอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ขยายหลอดลมดังกล่าวในระดับโมเลกุล

จากข้อมูลที่ได้มีการเผยแพร่มาแล้ว พบว่ามีสารที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันซิงอยู่มากกว่า 60 ชนิด สารส่วนใหญ่จัดเป็นสารประกอบพวก monoterpenoid อย่างไรก็ตาม ส่วนประกอบของน้ำมันซิงที่มีรายงานจากงานวิจัยที่ต่างกันจะมีส่วนประกอบของ monoterpenoid แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสถานที่และสภาพดินฟ้าอากาศที่ปลูก (Gupta *et al.*, 2011; Sasidharan, Venugopal, and Menon, 2011) จากวิเคราะห์ด้วย GC/MS ในการศึกษาวิจัยนี้พบว่า สารประกอบหลักในน้ำมันซิงที่สกัดได้คือ citral, eucalyptol และ camphene เมื่อเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลกับฐานข้อมูลจาก NIST library พบว่ายังมีสารประกอบอื่น ๆ ที่คาดการณ์ว่าน่าจะเป็น α -pinene, β -phellandrene และ zingiberene เช่นเดียวกับที่มีรายงานมาก่อนแล้ว แต่มีปริมาณค่อนข้างน้อยจากการคำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยใช้ GC/MS พบว่า citral เป็นสารประกอบที่มีมากที่สุดคือน้ำมันซิงที่สกัดได้จากงานวิจัยนี้ คือพบถึง 62.4%

มีรายงานถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ citral หลายประการ เช่น ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์ฆ่าแมลง ฤทธิ์ต้านฮีสตามีน และฤทธิ์ต้านเนื้องอก (Dudai *et al.*, 2000; Farah, Trimble, Ndebele, and Mawson, 2010; Rodov, Ben-Yehoshua, Fang, Kim, and Ashkenazi,

1995; Somolinos, García, Condón, Mackey, and Pagán, 2010) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานฤทธิ์ขยายหลอดลมของ citral มาก่อนหน้านี้

ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของกลายกล้ามเนื้อของน้ำมันขิงและ citral ในหลอดลมที่แยกจากการหนูขาวซึ่งกระตุ้นให้หดตัวด้วยสารกระตุ้น muscarinic receptor ที่มีชื่อว่า carbachol ดังที่เห็นได้จากรูปที่ 4.3 และ 4.4 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าทั้งน้ำมันขิงและ citral ยับยั้งการหดตัวของหลอดลมด้วยลักษณะที่เรียกว่า dose-dependent โดยเมื่อใช้น้ำมันขิงในขนาด 225 µg/ml จะทำให้เกิดการตอบสนองสูงสุด แต่เมื่อใช้ citral ที่ความเข้มข้น 140 µg/ml ซึ่งเป็นขนาดที่มีอยู่ในน้ำมันขิง หลอดลมมีการคลายตัวลงเหลือความตึงเท่ากับ 25 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย carbachol แต่ไม่ได้รับสารใดๆ ผลการทดลองชี้แนะว่าน่าจะมีสารประกอบอื่นในน้ำมันขิงที่ช่วยทำให้หลอดลมคลายตัวได้ เช่น eucalyptol มีรายงานจากงานวิจัยอื่นพบว่า eucalyptol สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดลมได้ โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 408.9 µg/ml (Nascimento *et al.*, 2009) จะเห็นว่าค่าดังกล่าวสูงกว่าความเข้มข้นของ eucalyptol ที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันขิงที่สกัดได้ในการศึกษานี้ ซึ่งเท่ากับ 16 µg/ml เท่านั้น สอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 4.4 ซึ่งไม่เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อของ eucalyptol จากการศึกษานี้ชี้แนะว่าฤทธิ์ของน้ำมันขิงในการคลายตัวของกล้ามเนื้อหลอดลมเกิดจาก citral เป็นหลักและมี eucalyptol เป็นตัวช่วย ซึ่งต่างจากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืช *Artemisia maritima* L. ซึ่งพบว่ามี eucalyptol เป็นส่วนประกอบถึง 40% (Shah *et al.*, 2011) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์หลักในการขยายหลอดลมจากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชชนิดนี้คงจะเกิดจาก eucalyptol เป็นหลัก

ปัจจุบันการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยารักษาโรคทางเลือกเพื่อขยายหลอดลมได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก มีทั้งความพยายามในการหาสารออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์เพื่อใช้อธิบายฤทธิ์ขยายหลอดลมดังกล่าว โดยทั่วไปอาจกล่าวได้ว่าการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมมีกลไกสำคัญ คือ การกระตุ้น β_2 -adrenergic receptor (Delmotte, Rasmeyer, Bai, and Sanderson, 2010) และการยับยั้ง cholinergic pathway นอกเหนือไปจากนั้นการหลั่งสารกลุ่มที่สร้างจากชั้น endothelium เช่น nitric oxide (Munakata *et al.*, 1990) และ prostaglandin (Ismailoglu, Sahin-Erdemli, Sungur, and Ilhan, 2004) ก็ยังมีส่วนควบคุมการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ นักวิจัยค้นพบกลไกการออกฤทธิ์ขยายหลอดลมของสมุนไพรบางชนิดว่าเกิดจากการกระตุ้น β_2 -adrenergic receptor (Chaudhary *et al.*, 2012) และยับยั้ง cholinergic receptor ร่วมกับการปิดกั้น calcium channel (Khan and Gilani, 2009) นอกจากนี้ Sydney de Sousa และคณะ (de Sousa *et al.*, 2010) ยังพบว่าฤทธิ์ขยายหลอดลมของน้ำมันหอมระเหยที่

สกัดจากสะระแหน่ (*Mentha piperita*) เกี่ยวข้องกับการปล่อยสาร prostaglandin E2 และ nitric oxide ออกมาจาก endothelium cells

Carbachol ซึ่งออกฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อหลอดลมหดตัวเกิดจากการกระตุ้น M_3 muscarinic receptor (Janbaz *et al.*, 2013) การกระตุ้น M_3 receptor ซึ่งเป็น G-protein coupled receptor จะก่อให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase C ส่งผลให้ระดับ IP_3 เพิ่มขึ้น แล้วไปกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง calcium จาก sarcoplasmic reticulum (SR) จากนั้นจึงไปกระตุ้นให้เกิด Ca^{2+} influx จากภายนอกเซลล์แล้วไปทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Pereira, Marques, Sudo, Kaplan, and Zapata-Sudo, 2013) Ca^{2+} สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยสองช่องทางหลักเป็นอย่างน้อย คือ L-type voltage-operated calcium channels และ receptor-operated cation channels (Ersoy *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2013) เป็นที่ยอมรับกันว่าสารปิดกั้น Ca^{2+} channel สามารถช่วยทำให้หลอดลมคลายตัวได้ เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันขิงในการคลายตัวกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม การวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ Ca^{2+} channel blocker, β -adrenergic receptor antagonist สารยับยั้งเอนไซม์ NOS และสารยับยั้งเอนไซม์ COX เป็นเครื่องมือในการศึกษาความเกี่ยวข้องกับ Ca^{2+} channel, β_2 -adrenergic receptor, nitric oxide และ prostaglandin ตามลำดับ

Verapamil ที่ใช้ในการศึกษานี้ออกฤทธิ์ปิดกั้น L-type voltage-operated Ca^{2+} channel แบบแข่งขัน (competitive antagonist) Verapamil จัดเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของ Ca^{2+} channel ของสารต่าง ๆ (Fleckenstein, 1977) หลักการที่ใช้อธิบายคือ เมื่อมี competitive antagonist อยู่ด้วยจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของ agonist เพิ่มขึ้นเพื่อให้เกิดผลตอบสนองเท่าเดิม ซึ่งสารที่เป็น competitive antagonist จะทำให้กราฟ dose-response curve ของ agonist เลื่อนไปทางขวามือ EC_{50} ของ agonist จะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเมื่อไม่มี competitive antagonist ตรงกันข้ามกับเมื่อมีสารที่ออกฤทธิ์เป็น noncompetitive antagonist ร่วมด้วย จะทำให้ผลตอบสนองลดลงไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของ agonist มากขึ้นเท่าใดก็ตาม ในกรณีหลังนี้ค่า EC_{50} จะคงเดิม ในงานวิจัยถึงได้ทดสอบความเป็นไปได้ของน้ำมันขิงและ citral ที่อาจจะออกฤทธิ์ยับยั้ง Ca^{2+} channel พบว่าเมื่อเติมน้ำมันขิงหรือ citral ในอ่างทดสอบ กราฟ dose-response curve ของ Ca^{2+} เลื่อนไปทางขวามือ และค่า EC_{50} ของ Ca^{2+} เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าน้ำมันขิงออกฤทธิ์ขยายหลอดลมมีกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งเกิดจากการยับยั้ง Ca^{2+} channel โดยมี citral เป็นสารออกฤทธิ์

ยาที่ออกฤทธิ์เป็น β_2 -adrenoceptor agonist นั้นเป็นยาที่นิยมใช้รักษาอาการหลอดลมตีบในผู้ป่วยโรคหอบหืดเนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการรักษาดี (Ge, Dai, Wan, Liu, and Mei, 2013) เมื่อ β_2 -adrenergic receptor ถูกกระตุ้นจะทำให้ระดับ adenylyl cyclase activity ของเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระดับ cAMP ภายในเซลล์สูงขึ้นและไปกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase A (PKA)

ปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟสให้กับ target protein หลายอย่างภายในเซลล์จากการทำงานของ PKA ส่งผลให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบความเป็นไปได้ที่น้ำมันขิงจะก่อให้เกิดการคลายตัวจากการกระตุ้น β_2 -adrenergic pathway พบว่า propranolol ซึ่งออกฤทธิ์เป็น β -adrenergic antagonist ยับยั้งฤทธิ์คลายตัวของน้ำมันขิงและ citral ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่าน้ำมันขิงทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยส่วนหนึ่งไปกระตุ้น β_2 -adrenoceptor โดยมี citral เป็นสารออกฤทธิ์

นักวิจัยพบว่ายาที่ออกฤทธิ์เป็น Ca^{2+} channel blocker มีประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับความผิดปกติของหลอดเลือดที่มีความไวต่อสิ่งกระตุ้น (Janbaz, Nisar, Ashraf, and Qadir, 2012) และมีนักวิจัยหลายกลุ่มศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดจากพืชและพบว่าเกิดจากการปิดกั้น Ca^{2+} channel ตัวอย่างเช่น สารสกัดด้วยเมทานอลของ *Amaranthus spinosus* ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดกระต่ายเมื่อกระตุ้นด้วย carbachol โดยทำให้ Ca^{2+} concentration response curves เคลื่อนไปทางขวาเช่นเดียวกับ diltiazem (Ca^{2+} channel blocker) ตัวอย่างที่สอง คือนักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งพบว่าสารสกัดจากพืช *Amaranthus spinosus* นี้่ออกฤทธิ์โดยกระตุ้น β_2 -adrenergic receptor ร่วมกับการปิดกั้น calcium channel (Tiwari, Dwivedi, and Kakkar, 2010) ทำนองเดียวกับฤทธิ์ของน้ำมันขิงที่พบในงานวิจัยนี้ และเมื่อไม่นานมานี้ Janbaz และคณะ (Janbaz *et al.*, 2013) รายงานว่าสารสกัดจาก *Tephrosia purpurea* Linn. ทำให้หลอดเลือดของกระต่ายคลายตัวได้ในลักษณะเดียวกับการใช้ verapamil หลังได้รับการกระตุ้นให้หดตัวด้วย carbochol และตัวอย่างสุดท้ายคือ สารสกัดจาก *Fumaria parviflora* ทำให้หลอดเลือดที่เตรียมจากหนูตะเภาและจากกระต่ายคลายตัวเกิดจากการปิดกั้น calcium channel และ muscarinic receptor ร่วมกัน (Najeeb ur, Bashir, Al-Rehaily, and Gilani, 2012) ในกรณีของ citral นอกจากฤทธิ์ในการปิดกั้น calcium channel แล้ว ฤทธิ์ต้าน M_3 muscarinic receptor ก็เป็นอีกกลไกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้เช่นกัน กลไกดังกล่าวนี้ น่าจะได้มีการทดสอบต่อไปในอนาคต

นอกจากจะเป็นสารประกอบหลักที่ช่วยทำให้น้ำมันขิงมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแล้ว citral ยังถูกพบว่าเป็นสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากพืชอื่นอีกด้วย มีรายงานว่า citral เป็นส่วนประกอบหลัก (81.9%) ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จาก *Pectis brevipedunculata* และพบว่าออกฤทธิ์โดยไปยับยั้ง Ca^{2+} influx ที่ผ่าน voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels (Pereira *et al.*, 2013) ในทำนองเดียวกันก็มีรายงานว่า citral เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจาก *Cymbaogon citratus* เมื่อทำการทดสอบกับกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด aorta ของหนูขาว พบว่าทำให้หลอดเลือดคลายตัว สุดท้ายเป็นการทดสอบฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของ citral ใน ileum ที่แยกจากกายของกระต่ายพบว่าเกิดจากการต้าน Ca^{2+} influx เช่นกัน (Devi, Sim, and Ismail, 2011)

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าสารที่หลั่งออกมาจากชั้น epithelium มีความสำคัญต่อการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Butler, Adler, Evans, Morgan, and Szarek, 1987) ความสมดุลระหว่างการสร้างและหลั่งสารเหล่านี้มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการหดและคลายตัวของหลอดเลือดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง nitric oxide (Buga, Gold, Wood, Chaudhuri, and Ignarro, 1989; Nijkamp, van der Linde, and Folkerts, 1993) และ prostaglandins (Farmer, Hay, Raeburn, and Fedan, 1987; Tschirhart, Frossard, Bertrand, and Landry, 1987) ทั้ง nitric oxide และ guanylyl cyclase ซึ่งเป็น target molecule ของ nitric oxide ซึ่งพบได้ในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างยิ่งทั้งในแง่ของสรีรวิทยาและพยาธิวิทยา (Hamad, Range, Holland, and Knox, 1999) ในคนและสัตว์ nitric oxide ออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (Belvisi *et al.*, 1992) ในผู้ป่วยที่เป็นภูมิแพ้ (allergic rhinitis) และผู้ป่วยโรคหอบหืด รวมทั้งผู้ป่วยที่มีปัญหาหายใจลำบากในโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจอื่น ๆ พบว่าระดับ nitric oxide จะเพิ่มขึ้น (Sydney de Sousa *et al.*, 2010) เชื่อว่าน่าจะเป็นกลไกที่ร่างกายใช้เพื่อช่วยปรับสภาพการหดตัวของหลอดเลือดให้คืนสู่ปกติ มีรายงานแน่ชัดว่าสารที่กระตุ้นเอนไซม์ NOS ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดคลายตัว (Iijima, Challiss, and Boyle, 1995; Lin *et al.*, 2006; Nakahara *et al.*, 2002)

กระบวนการอักเสบเกี่ยวข้องกับสารเคมีจำนวนมากในร่างกาย โดยเริ่มจากการปล่อยสารตั้งต้นที่มีชื่อว่า arachidonic acid เพื่อสร้างสารกลุ่ม prostaglandins โดยการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) อันประกอบด้วย เอนไซม์ COX-1 และ COX-2 เอนไซม์ COX-2 เป็นโมเลกุลเป้าหมายของยาต้านอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) ร่างกายจะมีเอ็นที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ COX-1 แสดงออกอยู่ทั่วไปในทุกเนื้อเยื่อ ส่วนเอ็นที่ควบคุมการสร้าง COX-2 นั้นจะแสดงออกในขณะที่มีการอักเสบและการทำลายเซลล์ (Janbaz *et al.*, 2012) อาจกล่าวได้ว่า prostaglandins นั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการทำงานของร่างกายทั้งในสภาวะปกติและพยาธิสภาพ (Narumiya, Sugimoto, and Ushikubi, 1999) prostaglandin E₂ (PGE₂) ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของสารกลุ่มนี้ถูกพบว่าสร้างและปล่อยออกมาจาก epithelial cells ของทางเดินหายใจทั้งในกล้ามเนื้อเรียบและ parenchyma cells มีฤทธิ์ทำให้เกิดการคลายตัว (Ersoy *et al.*, 2008) ฤทธิ์ดังกล่าวเกิดจากการกระตุ้น EP₂ receptor ซึ่งเป็น G-protein coupled receptor ชนิด Gs protein ส่งผลให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Penn and Benovic, 2008) ทำนองเดียวกับ nitric oxide ระดับ PGE₂ จะเพิ่มขึ้นทั้งในกล้ามเนื้อเรียบและใน fibroblast เมื่อมีการอักเสบของปอด เชื่อว่า PGE₂ เป็น prostanoid ที่ทำหน้าที่ในการปกป้องเนื้อเยื่อต่างๆ ของทางเดินหายใจ (Profita *et al.*, 2003; Taha *et al.*, 2000)

การบ่มเนื้อเยื่อของหลอดเลือดด้วย L-NAME ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ nitric oxide synthase ไม่มีผลกระทบต่อฤทธิ์ของน้ำมันขิงและ citral ในการทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดคลายตัว เช่นเดียวกับกับการบ่มด้วย indomethacin ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase ก็ไม่ทำให้ฤทธิ์การคลายตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดโดยน้ำมันขิงและ citral เปลี่ยนแปลงไปเช่นกัน ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบของน้ำมันขิงและ citral นั้นไม่เกี่ยวกับการหลั่ง nitric oxide และ prostaglandins

กลไกการออกฤทธิ์ของ citral ที่เกี่ยวข้องกับ nitric oxide ในการคลายตัวของหลอดเลือดที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากกลไกการออกฤทธิ์ของ citral ต่อกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กส่วน ileum ที่แยกจากกายของกระต่ายที่ได้จากรายงานอื่น นักวิจัยบางกลุ่มพบว่าฤทธิ์คลายตัวกล้ามเนื้อเรียบของ citral ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในพืช *Cymbopogon citratus* จะลดลงเมื่อบ่มเนื้อเยื่อก่อนด้วย L-NAME (Devi *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานกลไกการออกฤทธิ์ของ citral ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด aorta ว่า citral ทำให้หลอดเลือดขยายตัวเนื่องจากไปมีผลต่อการทำงานของ nitric oxide/cGMP (Pereira *et al.*, 2013; Devi *et al.*, 2011) ความแตกต่างอาจเป็นไปได้ว่ากลไกการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่เป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อที่ต่างกันอาจมีความแตกต่างกันในรายละเอียด และกลไกการควบคุมที่เป็นกลไกหลัก อาจจะไม่เหมือนกันทั้งหมด

ส่วนในกรณีของ COX pathway พบว่าผลของ citral ต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดซึ่งได้จากงานวิจัยนี้มีความคล้ายคลึงกับผลของ citral ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในพืชอื่นเช่น *C. citratus* มีการรายงานโดยนักวิจัยกลุ่มอื่นว่า citral ไม่มีผลต่อ COX pathway เนื่องจาก indomethacin ไม่มีผลกระทบต่อฤทธิ์ของ citral ต่อการคลายตัวของเส้นเลือด aorta ที่แยกจากกายของหนูขาว (Devi *et al.*, 2011) การที่ indomethacin ไม่มีผลต่อฤทธิ์การคลายตัวของกล้ามเนื้อหลอดเลือดอาจเป็นไปได้ว่า ในการศึกษาทดลองนี้มีการออกแบบให้สังเกตผลใน early-phase response แต่บทบาทของ prostaglandin นั้นเกี่ยวข้องกับ late-phase response เป็นสำคัญ (Holgate, Church, and Lichtenstein, 2006) พบว่าในช่วงหลังของการเกิดปฏิกิริยาของโรคหอบหืดนั้นขบวนการอักเสบจะเข้ามามีบทบาทมากกว่าในช่วงแรก มีผู้เสนอแนะว่า citral ซึ่งเป็นสารประกอบหลักใน *C. citratus* ให้ฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยไปเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร cytokines ที่เป็น transcription factor NF- κ B โดยทำการทดลองกับ macrophage ที่ได้จากหนู (Bachiega and Sforzin, 2011; Tamaoki, Nakata, Kawatani, Tagaya, and Nagai, 2000) ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันขิงและสารออกฤทธิ์ citral ในช่วง late-phase response ของโรคหอบหืดยังควรจะได้รับการศึกษาต่อไป

สรุป การศึกษาวิจัยนี้ได้พบว่าน้ำมันขิงมีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมคลายตัว โดยมี citral เป็นสารออกฤทธิ์หลัก ฤทธิ์ดังกล่าวเกิดจากการกระตุ้น β_2 -adrenergic receptor ร่วมกับการปิดกั้น Ca^{2+} channel งานวิจัยนี้ทำให้เกิดหลักฐานทางเภสัชวิทยาเพื่อสนับสนุนการใช้ ขิงเป็นพืชสมุนไพรในการเป็นยาขยายหลอดลม



เอกสารอ้างอิง

- Aimbire, F., Penna, S. C., Rodrigues, M., Rodrigues, K. C., Lopes–Martins, R. A., and Sertie, J. A. (2007). Effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinalis* rhizomes on LPS–induced rat airway hyperreactivity and lung inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. 77(3–4): 129–138.
- Altman, R. D., and Marcussen, K. C. (2001). Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 44(11): 2531–2538.
- Altmann, K. N., Gilman, N., Hayoz, J., Willis, R. F., and Himpfel, F. J. (2001). Effect of magnetic doping on the electronic states of Ni. **Physical Review Letters**. 87(13): 137201.
- Apariman, S., Ratchanon, S., and Wiriyasirivej, B. (2006). Effectiveness of ginger for prevention of nausea and vomiting after gynecological laparoscopy. **Journal of Medical Association of Thailand**. 89(12): 2003–2009.
- Ayres–Sampaio, D., Teodoro, A. C., Sillero, N., Santos, C., Fonseca, J., and Freitas, A. (2014). An investigation of the environmental determinants of asthma hospitalizations: An applied spatial approach. **Applied Geography**. 47: 10–19.
- Bachiega, T. F., and Sforcin, J. M. (2011). Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**. 137(1): 909–913.
- Belvisi, M. G., Stretton, C. D., Miura, M., Verleden, G. M., Tadjkarimi, S., Yacoub, M. H., and Barnes, P. J. (1992). Inhibitory NANC nerves in human tracheal smooth muscle: a quest for the neurotransmitter. **Journal of Applied Physiology (1985)**. 73(6): 2505–2510.
- Borrelli, F., Capasso, R., Pinto, A., and Izzo, A. A. (2004). Inhibitory effect of ginger (*Zingiber officinale*) on rat ileal motility *in vitro*. **Life Sciences**. 74(23): 2889–2896.
- Boushey, H. A. (2009). Drugs used in asthma. In B. G. Katzung, S. B. Master, and A. J. Trevor (eds.). **Basic & Clinical Pharmacology** (16th ed., pp 473–507). New York. McGraw–Hill.

- Buddhakala, N., Talubmook, C., Sriyotha, P., Wray, S., and Kupittayanant, S. (2008). Inhibitory effects of ginger oil on spontaneous and $\text{PGF}_2\alpha$ -induced contraction of rat myometrium. **Planta Medica**. 74(4): 385–391.
- Buga, G. M., Gold, M. E., Wood, K. S., Chaudhuri, G., and Ignarro, L. J. (1989). Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**. 161(1): 61–72.
- Butler, G. B., Adler, K. B., Evans, J. N., Morgan, D. W., and Szarek, J. L. (1987). Modulation of rabbit airway smooth muscle responsiveness by respiratory epithelium. Involvement of an inhibitory metabolite of arachidonic acid. **American Review of Respiratory Disease**. 135(5): 1099–1104.
- Chaiyakunapruk, N., Kitikannakorn, N., Nathisuwan, S., Leeprakobboon, K., and Leelasettagool, C. (2006). The efficacy of ginger for the prevention of postoperative nausea and vomiting: A meta-analysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 194(1): 95–99.
- Chaudhary, M. A., Imran, I., Bashir, S., Mehmood, M. H., Rehman, N. U., and Gilani, A. H. (2012). Evaluation of gut modulatory and bronchodilator activities of *Amaranthus spinosus* Linn. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 12: 166.
- Connell, D. W., and McLachlan, R. (1972). Natural pungent compounds: IV. Examination of the gingerols, shogaols, paradols and related compounds by thin-layer and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. 67(1): 29–35.
- Connell, D. W., and Sutherland, M. D. (1969). A re-examination of gingerol, shogaol, and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Australian Journal of Chemistry**. 22(5): 1033–1043.
- Delmotte, P., Ressmeyer, A. R., Bai, Y., and Sanderson, M. J. (2010). Mechanisms of airway smooth muscle relaxation induced by beta2-adrenergic agonists. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**. 15: 750–764.
- Devi, R. C., Sim, S. M., and Ismail, R. (2011). Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated rabbit ileum. **Journal of Smooth Muscle Research**. 47(5): 143–156.

- Dudai, N., Larkov, O., Putievsky, E., Lerner, H. R., Ravid, U., Lewinsohn, E., and Mayer, A. M. (2000). Biotransformation of constituents of essential oils by germinating wheat seed. **Phytochemistry**. 55(5): 375–382.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., and Ofir, R. (2005). Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta Medica**. 71(05): 484–488.
- Ernst, E., and Pittler, M. H. (2000). Efficacy of ginger for nausea and vomiting: A systematic review of randomized clinical trials. **British Journal of Anaesthesia**. 84(3): 367–371.
- Ersoy, S., Orhan, I., Turan, N. N., Sahan, G., Ark, M., and Tosun, F. (2008). Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. **Phytomedicine**. 15(12): 1087–1092.
- Estrada-Soto, S., Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molinac, R., and Ibarra-Barajas, M. (2012). Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. **Journal of Ethnopharmacology**. 139: 513–518.
- Evangelista, G. L., Coelho-de-Souza, A. N., Santos, C. F., Leal-Cardoso, J. H., Lopes, E. A. B., dos Santos, M. V., and Magalhaes, P. J. C. (2007). Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**. 109(3): 515–522.
- Farah, I. O., Trimble, Q., Ndebele, K., and Mawson, A. (2010). Retinoids and citral modulated cell viability, metabolic stability, cell cycle progression and distribution in the α 549 lung carcinoma cell line – biomed 2010. **Biomedical Sciences Instrumentation**. 46: 410–421.
- Farmer, S. G., Hay, D. W., Raeburn, D., and Fedan, J. S. (1987). Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. **British Journal of Pharmacology**. 92(1): 231–236.
- Fleckenstein, A. (1977). Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 17: 149–166.

- Fuhrman, B., Rosenblat, M., Hayek, T., Coleman, R., and Aviram, M. (2000). Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Nutrition**. 130(5): 1124–1131.
- Ge, Y. B., Dai, Q., Wan, D. R., Liu, Q. H., and Mei, Z. N. (2013). Relaxant effect of 1-butanol fraction from *Elaeagnus pungens* leaf through inhibiting L-type Ca^{2+} channel on guinea pig tracheal smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**. 150(1): 196–201.
- Ghayur, M. N., and Gilani, A. H. (2007). Inhibitory activity of ginger rhizome on airway and uterine smooth muscle preparations. **European Food Research and Technology**. 224: 477–481.
- Ghayur, M. N., Gilani, A. H., Afridi, M. B., and Houghton, P. J. (2005). Cardiovascular effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways. **Vascular Pharmacology**. 43(4): 234–241.
- Ghayur, M. N., Gilani, A. H., and Janssen, L. J. (2008). Ginger attenuates acetylcholine-induced contraction and Ca^{2+} signalling in murine airway smooth muscle cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 86(5): 264–271.
- Gupta, S., Pandotra, P., Ram, G., Anand, R., Gupta, A. P., Husain, K., and Mallavarapu, G. R. (2011). Composition of a monoterpenoid-rich essential oil from the rhizome of *Zingiber officinale* from north western Himalayas. **Natural Product Communications**. 6(1): 93–96.
- Hamad, A. M., Range, S. P., Holland, E., and Knox, A. J. (1999). Desensitization of guanylyl cyclases in cultured human airway smooth-muscle cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 20(5): 1087–1095.
- Holgate, S. T., Church, M., and Lichtenstein, L. M. (2006). **Allergy**. (3rd ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Ijioma, S. C., Challiss, R. A., and Boyle, J. P. (1995). Comparative effects of activation of soluble and particulate guanylyl cyclase on cyclic GMP elevation and relaxation of bovine tracheal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**. 115(5): 723–732.

- Ismailoglu, U. B., Sahin-Erdemli, I., Sungur, A., and Ilhan, M. (2004). Effects of lipopolysaccharide on epithelium-dependent relaxation in coaxial bioassay. **European Journal of Pharmacology**. 487(1-3): 233-239.
- Janbaz, K. H., Latif, M. F., Saqib, F., Imran, I., Zia-Ul-Haq, M., and De Feo, V. (2013). Pharmacological effects of *Lactuca serriola* L. in experimental model of gastrointestinal, respiratory, and vascular ailments. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013: 304-394.
- Janbaz, K. H., Nisar, U., Ashraf, M., and Qadir, M. I. (2012). Spasmolytic, bronchodilatory and antioxidant activities of *Erythrina superosa* Roxb. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. 69(6): 1111-1117.
- Jolad, S. D., Lantz, R. C., Solyom, A. M., Chen, G. J., Bates, R. B., and Timmermann, B. N. (2004). Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE₂ production. **Phytochemistry**. 65(13): 1937-1954.
- Kazeem, M. I., Akanji, M. A., Yakubu, M. T., and Ashafa, A. O. (2013). Protective effect of free and bound polyphenol extracts from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on the hepatic antioxidant and some carbohydrate metabolizing enzymes of streptozotocin-induced diabetic rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013: 7.
- Kemper, J. K. (1999). **Ginger (*Zingiber officinale*)**. Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research [On-line]. Available: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm.1-13>.
- Khan, A. U., and Gilani, A. H. (2009). Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx. **Journal of Ethnopharmacology**. 126(3): 480-486.
- Kiuchi, F., Iwakami, S., Shibuya, M., Hanaoka, F., and Sankawa, U. (1992). Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**. 40(2): 387-391.
- Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Huang, M. S., Tsai, M. J., and Ko, Y. C. (2011). Ginger suppresses phthalate ester-induced airway remodeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59(7): 3429-3438.

- Langner, E., Greifenberg, S., and Gruenwald, J. (1998). Ginger: History and use. **Advances in Therapy**. 15(1): 25–44.
- Lee, T., Chiu, Y. H., Lee, Y., and Lee, H. L. (2014). Thermal properties and structural characterizations of new types of phase change material: Anhydrous and hydrated palmitic acid/camphene solid dispersions. **Thermochimica Acta**. 575: 81–89.
- Lin, R. J., Wu, B. N., Lo, Y. C., An, L. M., Dai, Z. K., Lin, Y. T., and Chen, I. J. (2006). A xanthine-based epithelium-dependent airway relaxant KMUP-3 (7-[2-[4-(4-nitrobenzene)piperazinyl]ethyl]-1,3-dimethylxanthine) increases respiratory performance and protects against tumor necrosis factor- α -induced tracheal contraction, involving nitric oxide release and expression of cGMP and protein kinase G. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 316(2): 709–717.
- Munakata, M., Masaki, Y., Sakuma, I., Ukita, H., Otsuka, Y., Homma, Y., and Kawakami, Y. (1990). Pharmacological differentiation of epithelium-derived relaxing factor from nitric oxide. **Journal of Applied Physiology**. 69(2): 665–670.
- Najeeb ur, R., Bashir, S., Al-Rehaily, A. J., and Gilani, A. H. (2012). Mechanisms underlying the antidiarrheal, antispasmodic and bronchodilator activities of *Fumaria parviflora* and involvement of tissue and species specificity. **Journal of Ethnopharmacology**. 144(1): 128–137.
- Nakahara, T., Yunoki, M., Moriuchi, H., Mitani, A., Sakamoto, K., and Ishii, K. (2002). Relaxation and potentiation of cGMP-mediated response by ibudilast in bovine tracheal smooth muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 366(3): 262–269.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. **Physiological Reviews**. 79(4): 1193–1226.
- Nascimento, N. R. F., Refosco, R. M. D. C., Vasconcelos, E. C. F., Kerntopf, M. R., Santos, C. F., Batista, F. J. A., and Fonteles, M. C. (2009). 1,8-Cineole induces relaxation in rat and guinea-pig airway smooth muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 61(3): 361–366.

- Nijkamp, F. P., van der Linde, H. J., and Folkerts, G. (1993). Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea pig *in vivo* and *in vitro*. Role of the epithelium. **American Review of Respiratory Disease**. 148(3): 727–734.
- Pelaia, G., Renda, T., Gallelli, L., Vatrella, A., Busceti, M. T., Agati, S., and Marsico, S. A. (2008). Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. **Respiratory Medicine**. 102(8): 1173–1181.
- Penn, R. B., and Benovic, J. L. (2008). Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. **Proceedings of the American Thoracic Society**. 5(1): 47–57.
- Pereira, S., Marques, A., Sudo, R., Kaplan, M., and Zapata–Sudo, G. (2013). Vasodilator activity of the essential oil from aerial parts of *Pectis brevipedunculata* and its main constituent citral in rat aorta. **Molecules**. 18(3): 3072–3085.
- Peters, S. P., Ferguson, G., Deniz, Y., and Reisner, C. (2006). Uncontrolled asthma: A review of the prevalence, disease burden and options for treatment. **Respiratory Medicine**. 100(7): 1139–1151.
- Profita, M., Sala, A., Bonanno, A., Riccobono, L., Siena, L., Melis, M. R., and Vignola, A. M. (2003). Increased prostaglandin E₂ concentrations and cyclooxygenase–2 expression in asthmatic subjects with sputum eosinophilia. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 112(4): 709–716.
- Rackova, L., Cupakova, M., Tazky, A., Micova, J., Kolek, E., and Kost'alo, D. (2013). Redox properties of ginger extracts: Perspectives of use of *Zingiber officinale* Rosc. as antidiabetic agent. **Interdisciplinary Toxicology**. 6(1): 26–33.
- Rodenak Kladniew, B., Polo, M., Montero Villegas, S., Galle, M., Crespo, R., and Garcia de Bravo, M. (2014). Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8–cineole, and simvastatin on human cell lines. **Chemico–Biological Interactions**. 214: 57–68.
- Rodov, V., Ben–Yehoshua, S., Fang, D. Q., Kim, J. J., and Ashkenazi, R. (1995). Preformed antifungal compounds of lemon fruit: Citral and its relation to disease resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43(4): 1057–1061.

- Rodrigues, F. A., Prata, M. M., Oliveira, I. C., Alves, N. T., Freitas, R. E., Monteiro, H. S., and Havt, A. (2014). Gingerol fraction from *Zingiber officinale* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 58(4): 1872–1878.
- Rouhi, H., Ganji, F., and Nasri, H. (2006). Effect of ginger on the improvement of asthma [The evaluation of its treatment of effects]. **Pakistan Journal of Nutrition**. 5: 373–376.
- Saberi, F., Sadat, Z., Abedzadeh–Kalahroudi, M., and Taebi, M. (2013). Acupressure and ginger to relieve nausea and vomiting in pregnancy: A randomized study. **Iranian Red Crescent Medical Journal**. 15(9): 854–861.
- Sasidharan, I., Venugopal, V. V., and Menon, A. N. (2011). Essential oil composition of two unique ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivars from Sikkim. **Natural Product Research**. 26(19): 1759–1764.
- Shadmani, A., Azhar, I., Mazhar, F., Hassan, M. M., Ahmed, S. W., Ahmad, I., and Shamim, S. (2004). Kinetic studies on *Zingiber officinale*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 17(1): 47–54.
- Shah, A. J., Gilani, A. H., Abbas, K., Rasheed, M., Ahmed, A., and Ahmad, V. U. (2011). Studies on the chemical composition and possible mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilatory activities of the essential oil of *Artemisia maritima* L. **Archives of Pharmacal Research**. 34(8): 1227–1238.
- Shukla, Y., and Singh, M. (2007). Cancer preventive properties of ginger: A brief review. **Food and Chemical Toxicology**. 45(5): 683–690.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., and Pagán, R. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. **Journal of Applied Microbiology**. 108(6): 1928–1939.
- Sydney de Sousa, A. A., Gomes Soares, P. M., Saldanha de Almeida, A. N., Maia, A. R., Prata de Souza, E., and Assreuy, A. M. S. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 130: 433–436.
- Taha, R., Olivenstein, R., Utsumi, T., Ernst, P., Barnes, P. J., Rodger, I. W., and Giaid, A. (2000). Prostaglandin H synthase 2 expression in airway cells from patients with

- asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 161: 636–640.
- Tamaoki, J., Nakata, J., Kawatani, K., Tagaya, E., and Nagai, A. (2000). Ginsenoside-induced relaxation of human bronchial smooth muscle via release of nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**. 130(8): 1859–1864.
- Thomson, M., Al-Qattan, K. K., Al-Sawan, S. M., Alnaqeeb, M. A., Khan, I., and Ali, M. (2002). The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. 67(6): 475–478.
- Tiwari, M., Dwivedi, U. N., and Kakkar, P. (2010). Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. **Food and Chemical Toxicology**. 48(10): 2913–2919.
- Townsend, E. A., Siviski, M. E., Zhang, Y., Xu, C., Hoonjan, B., and Emala, C. W. (2013). Effects of ginger and its constituents on airway smooth muscle relaxation and calcium regulation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 48(2): 157–163.
- Townsend, E. A., Zhang, Y., Xu, C., Wakita, R., and Emala, C. W. (2014). Active components of ginger potentiate beta-agonist-induced relaxation of airway smooth muscle by modulating cytoskeletal regulatory proteins. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 50(1): 115–124.
- Tschirhart, E., Frossard, N., Bertrand, C., and Landry, Y. (1987). Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 243(1): 310–316.
- Willets, K. E., Ekangaki, A., and Eden, J. A. (2003). Effect of a ginger extract on pregnancy-induced nausea: A randomised controlled trial. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**. 43: 139–144.
- Wohlmuth, H., Smith, M. K., Brooks, L. O., Myers, S. P., and Leach, D. N. (2006). Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)

- grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54(4): 1414–1419.
- Xie, X., Sun, S., Zhong, W., Soromou, L. W., Zhou, X., Wei, M., and Ding, Y. (2014). Zingerone attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**. 19(1): 103–109.
- Yamahara, J., Huang Qi, R., Naitoh, Y., Kitani, T., and Fujimura, H. (1989). Inhibition of cytotoxic drug-induced vomiting in suncus by a ginger constituent. **Journal of Ethnopharmacology**. 27(3): 353–355.
- Yip, Y. B., and Tam, A. C. Y. (2008). An experimental study on the effectiveness of massage with aromatic ginger and orange essential oil for moderate-to-severe knee pain among the elderly in Hong Kong. **Complementary Therapies in Medicine**. 16(3): 131–138.
- Young, H. Y., Luo, Y. L., Cheng, H. Y., Hsieh, W. C., Liao, J. C., and Peng, W. H. (2005). Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. **Journal of Ethnopharmacology**. 96(1–2): 207–210.
- Zhou, L., Qi, L., Jiang, L., Zhou, P., Ma, J., Xu, X., and Li, P. (2014). Antitumor activity of gemcitabine can be potentiated in pancreatic cancer through modulation of TLR4/NF- κ B signaling by 6-shogaol. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**. 16(2): 246–257.





Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action



Thitiya Mangprayool^{a,b}, Sajeera Kupittayanant^a, Nuannoi Chudapongse^{a,*}

^a Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^b The Center for Scientific and Technological Equipment, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 20 March 2013

Received in revised form 6 May 2013

Available online 17 May 2013

Keywords:

Ginger oil

Zingiber officinale

Citral

Bronchodilation

β -Adrenoceptor

ABSTRACT

The extract of ginger, the rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), has been reported to possess anti-hyperactivity and anti-inflammation on airway. The present study described bronchodilatory activity of ginger oil and identified its active compound. Ginger oil was extracted by hydro-distillation. The compositions of ginger oil were analyzed by gas chromatography and mass spectrometer. Citral, eucalyptol and camphene were found to be the major components. Ginger oil and citral, but not camphene, suppressed rat tracheal contraction induced by carbachol (CCh). Consistent with previous report, eucalyptol showed a relaxing effect on rat airway. Since the content of eucalyptol in ginger oil was relatively low, the contribution of eucalyptol to the bronchodilatory effect of ginger oil was small. To elucidate the mechanisms responsible for the myorelaxing effect, propranolol (a β -adrenergic receptor antagonist), indomethacin (a COX inhibitor) and L-NAME (a NOS inhibitor) were used to block the inhibitory effects of ginger oil and citral. It was found that propranolol, but not indomethacin and L-NAME, reversed bronchodilatory effects of both ginger oil and citral, suggesting that a possible mechanism involved β -adrenergic receptor. This study provides the pharmacological basis supporting the therapeutic potential of *Z. officinale* rhizomes as a bronchodilator.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ginger is a popular name of the rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae) which is distributed worldwide particularly in Asia. In addition to being extensively used as spices in food and drinks, ginger has been employed as an alternative medicine around the world for treatment of gastrointestinal tract disorders, including dyspepsia, indigestion, diarrhea, motion sickness and nausea related to pregnancy, surgery or chemotherapy [1–3]. Recently, ginger has received increasing attention due to its pharmacological activities such as blood pressure lowering, pain-killing and uterine smooth muscle relaxing effects [4–6]. It has been

reported that ginger reduced the symptoms, such as nocturnal cough and dyspnea in asthmatic patients [7]. Its hydroethanolic extract has been shown to inhibit airway hyperreactivity and lung inflammation [8,9]. The inhibitory effects of aqueous and methanolic crude extracts of ginger on tracheal smooth muscle were described [10]; however, the effects of ginger oil and its active compounds on airway smooth muscle have never been reported. The aim of this study is to investigate the effect of ginger oil on tracheal smooth muscle in vitro and to identify the compounds responsible for this activity. The possible mechanisms of action were also elucidated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Citral (*cis/trans*), eucalyptol, camphene, carbachol, propranolol, L-NAME and indomethacin were purchased from

Abbreviations: CCh, carbachol; COX, cyclooxygenase; GC/MS, gas chromatography and mass spectrometry; L-NAME, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester; NOS, nitric oxide synthase.

* Corresponding author. Tel.: +66 4422 4620; fax: +66 4422 4650.

E-mail address: nuannoi@sut.ac.th (N. Chudapongse).

Sigma-Aldrich (USA). NaCl, NaHCO₃, CaCl₂, KCl, NaH₂PO₄, MgSO₄ and glucose were purchased from Carlo Erba (Italy).

2.2. Plant material and oil extract

Fresh rhizomes of *Z. officinale* (at 10 months of age) were collected from local markets in Muang district, Nakhon Ratchasima province, Thailand. The plant sample was identified at the Forest Herbarium of Thailand and confirmed by Dr. Surapon Saensouk, a plant taxonomist from Mahasarakham University. The specimen has been kept at the School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology. The voucher specimen number is Pharm-Chu-004.

Prior to the distillation procedure, unpeeled rhizomes were washed and chopped into small pieces. The sample was put into extract apparatus and subjected to hydro-distillation for 8 h at 80 °C. The obtained ginger oil was dried over anhydrous sodium sulfate and then kept in tightly sealed containers at 4 °C for subsequent experiments. The yield of ginger oil was 0.13% (w/w). A stock solution was obtained by dissolving small aliquots of ginger oil in hexane (1:1 v/v).

2.3. Determination of constituents of ginger oil by GC/MS

Ginger oil was analyzed chemically by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS; Model CP-3800-1200L Quadrupole MS/MS). Briefly, compounds were separated on a FactorFour capillary column VF-5ms (30 m × 2.25 mm; 0.25 µm) using the carrier gas helium (0.7 ml/min). The injector temperature was 250 °C and the column temperature was maintained at 40 °C for 5 min and then programmed at 4 °C/min to 250 °C. The spectrometers were operated in electron-ionization (EI) mode at 70 eV ionization energy, the scan range was 35–400 amu. The detector was set as fixed voltage at 1200 V and the scan rate was 0.5 s per scan. The ionization source temperature was 250 °C. The identification of the major compounds was performed by comparing their mass spectra with the NIST library available in the instrument and confirmed by comparing with standards.

2.4. Rat tracheal preparation and contractility measurements *in vitro*

Male Wistar rats, weighing 230–380 g, were used in this study. The experiments performed on rats were conducted in accordance with the current ethical principles and guidelines for the care and use of research animals of the Institutional Animal Care and Use Committee, National Research Council of Thailand, under our local institutional approval.

Rat trachea was prepared according to method previously described [11]. Rats were sacrificed by cervical dislocation. The trachea was carefully dissected and cleaned of external connective tissue and then cut into several two-cartilage segments. Each tracheal segment was mounted vertically in an organ bath (10 ml capacity) containing Krebs solution (37 °C pH 7.4) and aerated with carbogen (O₂ 95% and CO₂ 5%). The compositions of Krebs solution (mM) were: NaCl 120; NaHCO₃ 22; CaCl₂ 2.5; KCl 4.6; NaH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2 and glucose 11.5 (pH 7.4). One end of the tracheal ring was tied by a fine cotton thread to a hook at the bottom of the bath and the other to a force transducer (Force Transducer

Model MLT 1030/D, ADI Instruments). Tissues were mounted under an initial resting tension of 1 g and left to equilibrate for a period of 30 min before starting the experimental protocol. Tension changes were recorded using isometric force transducers connected to a Power Lab Chart recorder (Model ML866, ADI Instruments). After the equilibration period, control contractions were induced by adding 1 µM carbachol (CCh), a non-selective muscarinic receptor agonist, to the organ bath. When two successive control contractions showed similar amplitude, preparations were considered to be equilibrated. The CCh-induced contraction was used as reference for maximal percentage response. The contractile amplitude was measured at the peak deflection.

2.5. Study on the effect of ginger oil on CCh-induced contraction

A tracheal segment was incubated in Krebs solution and equilibrated for 30 min. Tracheal contractions were induced by CCh (1 µM). Once sustained contractions elicited by CCh were established, ginger oil (22.5–1125 µg/ml final concentration) was added to obtain the dose response curve. The responses were expressed as percent reduction of the CCh-induced tracheal contraction. Control experiments were performed with the vehicle (0.125% hexane) which showed no effect on tracheal contraction.

2.6. Determination of active ingredients of ginger oil on the relaxing effect

To examine the compounds responsible for the myorelaxant effect of ginger oil, tracheal preparations were treated with ginger oil (225 µg/ml) and its major constituents, namely citral (140 µg/ml), eucalyptol (15 µg/ml) and camphene (10 µg/ml) for 10 min after a stable response to CCh-induced contraction were achieved. Reduction of contraction was recorded during the last 5-min period. In the parallel control experiments, the effects of the solvent vehicle on the contraction of the trachea were also tested.

2.7. Study on the effect of β-adrenergic antagonist, NOS and COX inhibitors on the relaxation produced by ginger oil and citral

To examine the possible mechanism of tracheal relaxant effect of ginger oil, the tracheal strips were pretreated with 3 µM propranolol (a β-adrenergic blocker), 100 µM L-NAME (a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor) and 10 µM indomethacin (a cyclooxygenase (COX) inhibitor) prior to CCh for an appropriate period of time in accordance with previous reports [12–14]. After sustained CCh-induced contraction, ginger oil or citral was added into the organ bath. Changes of contraction force were recorded over the same period as described in the previous section.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error of mean (S.E.M). Maximal contraction after each concentration of ginger oil was used to construct a concentration–response curve. It was expressed as the percentage of control contraction evoked by CCh. The EC₅₀, defined as the concentration (in µg/ml) of ginger oil at which the maximal CCh-induced contraction was

inhibited by 50%, was calculated by interpolation from semi-logarithmic plots, and expressed as means \pm S.E.M. The significance ($p < 0.05$) of the results was assessed by Student's paired *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student–Newman–Keuls comparison test.

3. Results and discussion

In recent years, ginger rhizomes have been increasingly used as alternative medicine in several ailments such as gastrointestinal tract disorders, hypertension, inflammation and pain. Ginger oil is one of several essential oils that have been used in aromatherapy as an alternative treatment for short-term knee pain relief [15]. In terms of the respiratory system, ginger has been reported to relax rat tracheal smooth muscle [10], reduce rat airway hyperreactivity and remodeling [8,9] and relieve bronchospasm in asthmatic patients [7]. In the present study, we first reported the *in vitro* myorelaxant properties of ginger oil in rat isolated trachea contracted with the muscarinic agonist carbachol. Fig. 1 showed that ginger oil (22.5–1125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inhibited the contractile responses induced by CCh (1 μM) in a concentration-dependent manner ($p < 0.05$). The EC_{50} value for ginger oil-induced relaxation was $120 \pm 17 \mu\text{g}/\text{ml}$. Vehicle (the same concentrations used to dissolve ginger oil) produced no significant change in CCh-induced contraction (data not shown).

More than sixty constituents in ginger oil have been identified and are mostly monoterpenoids. However, the contents previously reported of these monoterpenoids varied presumably due to the difference in cultivated places [16,17]. In this study, the results from GC/MS analysis (Fig. 2) revealed that citral was the major component in our ginger oil preparation. It was found that ginger oil was composed of (values in % of oil weight) citral (*cis/trans*) 62.4, eucalyptol

6.9, and camphene 4.6, as its major constituents. The remaining (26.1%) were unidentified chemicals. It should be noted that a number of compounds, such as α -pinene (RT = 12.96 min), β -phellandrene (RT = 22.82 min) and zingiberene (RT = 47.41 min) were also detected in our ginger oil preparation based on the data from the NIST library. However, due to our limitation to obtain standards, only three major compounds with high possibility of being the active ingredients were identified and quantified. As shown in Fig. 3, citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal) is a linear monoterpene with two geometric isomers – geranial (*trans*-citral or citral A) and neral (*cis*-citral or citral B) which is also present in the essential oil of several other aromatic plants [18,19]. The pharmacological activities of citral such as bactericide, fungicide, insecticide, antihistamine, and anti-tumor agent have been reported [19–23]; however its bronchodilatory activity has never been described. Our results showed that citral was responsible for the airway relaxing effect of ginger oil whereas camphene did not alter the contraction induced by carbachol. The EC_{50} of citral on carbachol-induced rat tracheal contraction was $110 \pm 9 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n = 6$). As shown in Fig. 4, ginger oil at 225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ practically abolished the CCh-evoked tracheal contraction; and 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ citral (the concentration corresponding to its content in ginger oil used) reduced the contraction to $23.7 \pm 9.9\%$ of control ($p < 0.05$). In the case of eucalyptol (1,8-cineole), its inhibitory effect on rat airway smooth muscle has been observed; however, the EC_{50} from previous report was 408.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [24] which was much higher than its content in ginger oil. The concentration of ginger oil required for 100% airway relaxation (225 $\mu\text{g}/\text{ml}$) contained only 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of eucalyptol. At this concentration, eucalyptol reduced the amplitude of tracheal contraction (to $79.8 \pm 6.7\%$), but not significantly (Fig. 4). When treated

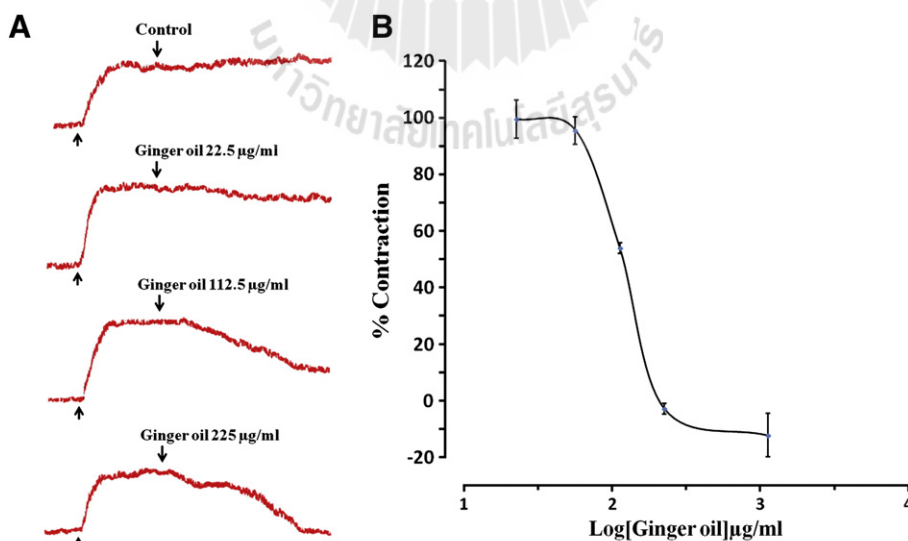


Fig. 1. Tracings demonstrating effect (A) and concentration–response curve (B) of ginger oil on rat tracheal contraction induced by CCh. Values in panel B were expressed as % of contractions produced by CCh (1 μM) in the absence of ginger oil and vertical bars indicate S.E.M. The ginger oil at 225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ produced 100% relaxation and the calculated EC_{50} was $120 \pm 17 \mu\text{g}/\text{ml}$. * $p < 0.05$ ($n = 6$).

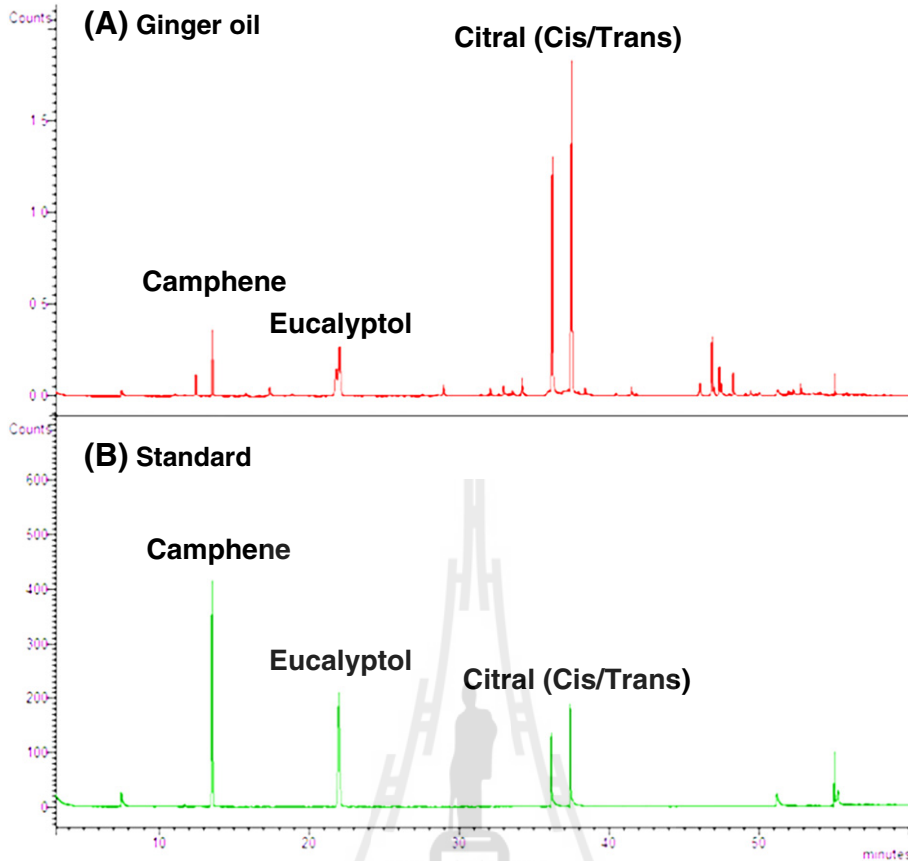


Fig. 2. Chemical compositions of ginger oil.

with the mixture of citral and eucalyptol, tracheal preparations were more relaxed than when treated with either citral or eucalyptol alone (data not shown). The essential oil extracted from *Artemisia maritima* L. has been found to contain about 40% of eucalyptol [25]. It is likely that eucalyptol could be one of the major active compounds for

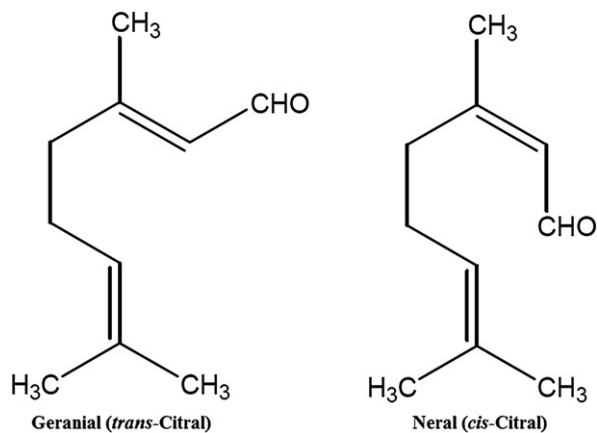


Fig. 3. Chemical structure of *cis*- and *trans*-citral.

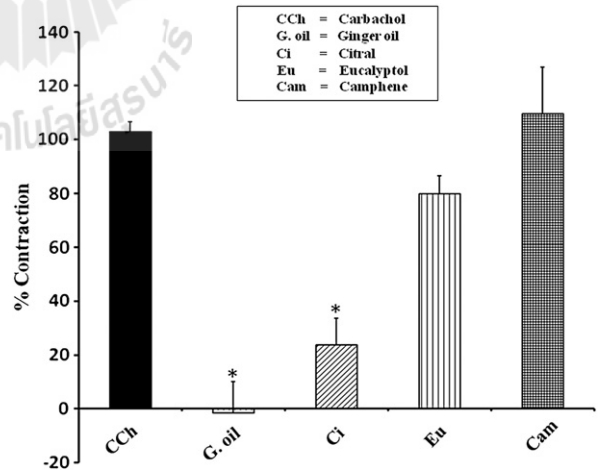


Fig. 4. Myorelaxing effects of ginger oil and its major compositions. Ginger oil (225 $\mu\text{g/ml}$), citral (140 $\mu\text{g/ml}$), eucalyptol (16 $\mu\text{g/ml}$) and camphene (10 $\mu\text{g/ml}$) were added on the plateau of a steady sustained contraction elicited by CCh (1 μM) in isolated rat trachea. Ginger oil, citral and eucalyptol reduced the amplitude of tracheal contraction to -1.5 ± 11.5 , 23.7 ± 9.9 and $79.8 \pm 6.7\%$, respectively compared to control ($102.9 \pm 3.7\%$). In contrast, camphene did not affect rat tracheal smooth muscle contraction as the amplitude was $109.5 \pm 17.5\%$. Results are reported as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ ($n = 5-8$).

the bronchodilatory activity of the essential oil extract from *A. maritima*.

Currently, the use of medicinal plants for bronchodilatory effects has received increasing attention from researchers. Both active ingredients and mechanisms of action underlying the antispasmodic and bronchodilatory activities have been studied. It is well known that the relaxation of respiratory smooth muscle is caused by two crucial mechanisms which are the activation of β_2 -adrenergic receptor [26] and the release of endothelium-derived relaxant factors such as nitric oxide [27] and prostaglandins [28]. Mechanisms that have been reported to participate in the bronchodilatory action of medicinal plants include β_2 -adrenergic receptor [14], cholinergic pathways and blockade of calcium channel [29]. Moreover, de Sousa and colleagues [30] have found the participation of prostaglandin E_2 and nitric oxide in the relaxant effect of *Mentha piperita* essential oil. In order to assess the possible mechanisms underlying the bronchodilatory activities of ginger oil and citral, their inhibitory effects were studied in the presence of β -adrenergic receptor antagonist, COX and NOS inhibitors. It was found that only propranolol reversed the inhibitory effects of ginger oil and citral on airway contraction induced by carbachol, whereas indomethacin and L-NAME were ineffective. It is widely known that stimulation of β_2 -adrenergic receptor by agonist leads to an increase of adenyl cyclase activity, thus resulting in an increase of intracellular cAMP levels. The traditional mechanism for cAMP action is via the stimulation of protein kinase A to phosphorylate a variety of target proteins to induce airway smooth muscle cell relaxation. When pre-incubated with propranolol, the relaxing effects of ginger oil (112.5 $\mu\text{g/ml}$) and citral (70 $\mu\text{g/ml}$, concentration corresponding to its content in ginger oil used) were significantly reduced ($p < 0.05$). Propranolol reversed the bronchodilatory effects of ginger oil and citral on CCh-induced tracheal contraction from 66.1 ± 4.0 to $83.5 \pm 4.9\%$ and $75.3 \pm 3.7\%$ to $104.7 \pm 6.0\%$, respectively (Fig. 5A). Contrary to the anti-inflammatory effect on lung of the hydroalcoholic extract of *Z. officinale* rhizomes [8], the relaxing effect of ginger oil in this study was not related to prostaglandins or nitric oxide because indomethacin and L-NAME did not significantly alter the inhibitory effects of ginger oil and citral ($p > 0.05$). In Fig. 5B, the contraction responses to CCh in the presence of ginger oil with and without L-NAME were $73.9 \pm 9.6\%$ and $68.9 \pm 9.6\%$, whereas those of citral were 70.7 ± 7.5 and $64.6 \pm 11.4\%$, respectively. When pre-incubated with indomethacin (Fig. 5C), the CCh-induced tracheal contraction in the presence of ginger oil and citral were $68.2 \pm 15.0\%$ (control = $56.1 \pm 4.5\%$) and $66.4 \pm 8.7\%$ (control = $72.0 \pm 6.2\%$), respectively. These results indicated that the myorelaxing effect of ginger oil was mediated through β_2 -adrenergic receptor and citral was most

likely the major active compound. However, eucalyptol and some of other unidentified constituents may also partly contribute to the bronchodilatory effect of ginger oil.

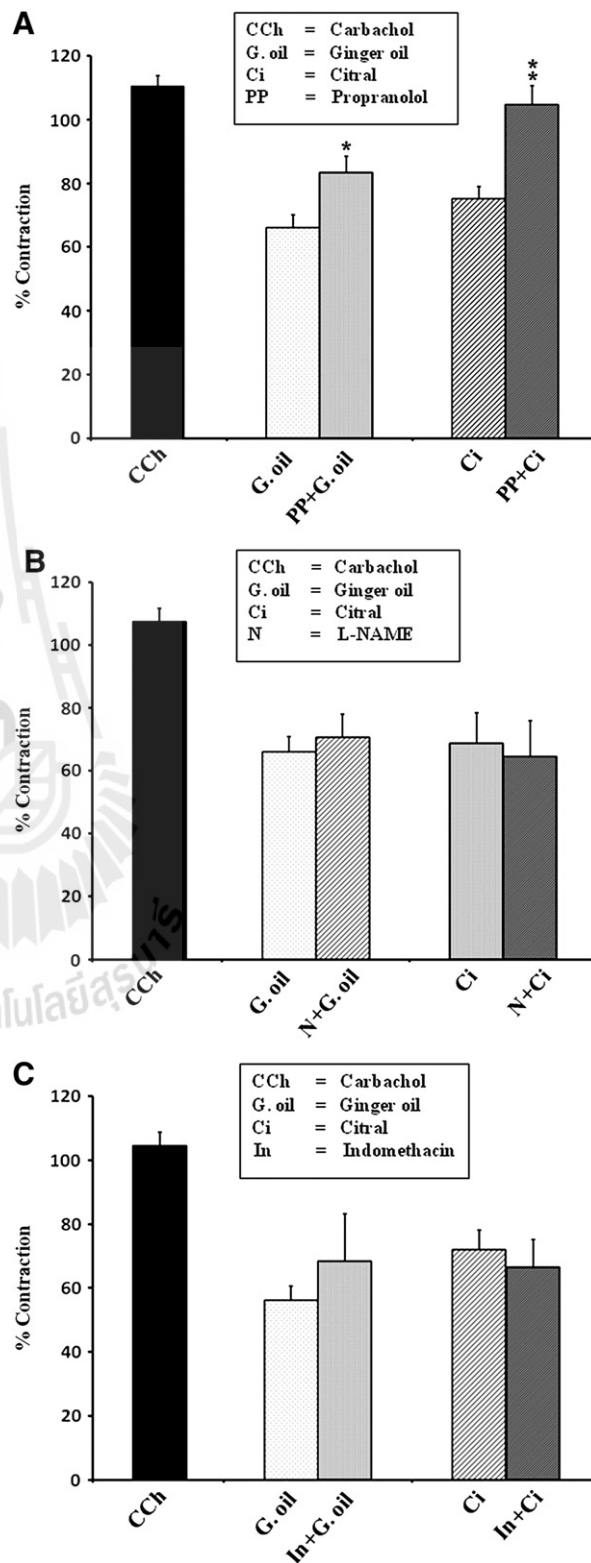


Fig. 5. Effects of β -adrenergic receptor antagonist, COX and NOS inhibitors on bronchodilatory activity of ginger oil and citral. The effects of ginger oil (112.5 $\mu\text{g/ml}$) and citral (70 $\mu\text{g/ml}$) were evaluated in the presence of propranolol (3 μM ; for 30 min) on sustained contraction elicited by CCh (1 μM) in isolated rat trachea (A). Propranolol significantly reversed the inhibitory effects of ginger oil and citral. However, pre-incubation with L-NAME at 100 μM for 15 min (B) and indomethacin at 10 μM for 30 min (C) did not significantly alter the relaxation of tracheal smooth muscle rings induced by ginger oil and citral. Data are reported as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ ($n = 5-8$) compared to ginger oil group; and ** $p < 0.05$ compared to citral group ($n = 5-8$).

In conclusion, the bronchodilatory effects of ginger oil and citral, its major active ingredient, were reported. The possible mechanism underlying this relaxing effect appeared to involve β_2 -adrenergic receptor. This study provides the pharmacological basis supporting therapeutic potential of *Z. officinale* rhizomes as a bronchodilator.

Acknowledgments

This research project was funded by the National Research Council of Thailand (Grant No: SUT1-104-53-24-10). We thank Dr. Surapon Saensouk for his assistance in plant verification.

References

- [1] Apariman S, Ratchanon S, Wiriyastrivej B. Effectiveness of ginger for prevention of nausea and vomiting after gynecological laparoscopy. *J Med Assoc Thai* 2006;89:2003–9.
- [2] Willetts KE, Ekangaki A, Eden JA. Effect of a ginger extract on pregnancy-induced nausea: a randomised controlled trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2003;43:139–44.
- [3] Yamahara J, Huang Qi R, Naitoh Y, Kitani T, Fujimura H. Inhibition of cytotoxic drug-induced vomiting in *Suncus* by a ginger constituent. *J Ethnopharmacol* 1989;27:353–5.
- [4] Altman RD, Marcussen KC. Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:2531–8.
- [5] Buddhakala N, Talubmook C, Sriyotha P, Wray S, Kupittayanant S. Inhibitory effects of ginger oil on spontaneous and $PGF_2\alpha$ -induced contraction of rat myometrium. *Planta Med* 2008;74:385–91.
- [6] Ghayur MN, Gilani AH, Afridi MB, Houghton PJ. Cardiovascular effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways. *Vascul Pharmacol* 2005;43:234–41.
- [7] Rouhi H, Ganji F, Nasri H. Effect of ginger on the improvement of asthma [The evaluation of its treatment of effects]. *Pak J Nutr* 2006;5:373–6.
- [8] Aimbire F, Penna SC, Rodrigues M, Rodrigues KC, Lopes-Martins RA, Sertie JA. Effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinalis* rhizomes on LPS-induced rat airway hyperreactivity and lung inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;7:129–38.
- [9] Kuo P-L, Hsu Y-L, Huang M-S, Tsai M-J, Ko Y-C. Ginger suppresses phthalate ester-induced airway remodeling. *J Agric Food Chem* 2011;59:3429–38.
- [10] Ghayur MN, Gilani AH. Inhibitory activity of ginger rhizome on airway and uterine smooth muscle preparations. *Eur Food Res Technol* 2007;224:477–81.
- [11] Evangelista GL, Coelho-de-Souza AN, Santos CF, Leal-Cardoso JH, Lopes EA, dos Santos MV, et al. Essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. *J Ethnopharmacol* 2007;109:515–22.
- [12] Estrada-Soto S, Sánchez-Recillas A, Navarrete-Vázquez G, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M. Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *J Ethnopharmacol* 2012;139:513–8.
- [13] Fehri B, Mueen Ahmed K, Aiache J. The relaxant effect induced by *Allium sativum* L. bulb aqueous extract on rat isolated trachea. *Phcog Mag* 2011;7:14–8.
- [14] Chaudhary MA, Imran I, Bashir S, Mehmood MH, Rehman NU, Gilani AH. Evaluation of gut modulatory and bronchodilator activities of *Amaranthus spinosus* Linn. *BMC Complement Altern Med* 2012;12:166.
- [15] Yip YB, Tam ACY. An experimental study on the effectiveness of massage with aromatic ginger and orange essential oil for moderate-to-severe knee pain among the elderly in Hong Kong. *Complement Ther Med* 2008;16:131–8.
- [16] Gupta S, Pandotra P, Ram G, Anand R, Gupta AP, Husain K, et al. Composition of a monoterpenoid-rich essential oil from the rhizome of *Zingiber officinale* from north western Himalayas. *Nat Prod Commun* 2011;6:93–6.
- [17] Sasidharan I, Venugopal VV, Menon AN. Essential oil composition of two unique ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivars from Sikkim. *Nat Prod Res* 2011;26:1759–64.
- [18] Dudai N, Weinstein Y, Krup M, Rabinski T, Ofir R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med* 2005;71:484–8.
- [19] Dudai N, Larkov O, Putievsky E, Lerner HR, Ravid U, Lewinsohn E, et al. Biotransformation of constituents of essential oils by germinating wheat seed. *Phytochemistry* 2000;55:375–82.
- [20] Abramson CH, Aldama E, Sulbaran E. Exposure to citral, cinnamon and ruda disrupts the life cycle of a vector of Chagas disease. *Am J Environ Sci* 2007;3:7–8.
- [21] Farah IO, Trimble Q, Ndebele K, Mawson A. Retinoids and citral modulated cell viability, metabolic stability, cell cycle progression and distribution in the A549 lung carcinoma cell line. *Biomed Sci Instrum* 2010;46:410–21.
- [22] Rodov V, Ben-Yehoshua S, Fand DQ, Kim JJ, Ashkenaza R. Performed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. *J Agric Food Chem* 1995;43:1057–61.
- [23] Somolinos M, García D, Condón S, Mackey B, Pagán R. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *J Appl Microbiol* 2010;108:1928–39.
- [24] Nascimento NRF, Refosco RMDC, Vasconcelos ECF, Kerntopf MR, Santos CF, Batista FJA, et al. 1,8-Cineole induces relaxation in rat and guinea-pig airway smooth muscle. *J Pharm Pharmacol* 2009;61:361–6.
- [25] Shah AJ, Gilani AH, Abbas K, Rasheed M, Ahmed A, Ahmad VU. Studies on the chemical composition and possible mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilatory activities of the essential oil of *Artemisia maritima* L. *Arch Pharm Res* 2011;34:1227–38.
- [26] Delmotte P, Ressmeyer AR, Bai Y, Sanderson MJ. Mechanisms of airway smooth muscle relaxation induced by β_2 -adrenergic agonists. *Front Biosci* 2010;15:750–64.
- [27] Munakata M, Masaki Y, Sakuma I, Ukita H, Otsuka Y, Homma Y, et al. Pharmacological differentiation of epithelium-derived relaxing factor from nitric oxide. *J Appl Physiol* 1990;69:665–70.
- [28] Ismailoglu UB, Sahin-Erdemli I, Sungur A, Ilhan M. Effects of lipopoly-saccharide on epithelium-dependent relaxation in coaxial bioassay. *Eur J Pharmacol* 2004;487:233–9.
- [29] Khan AU, Gilani AH. Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx. *J Ethnopharmacol* 2009;126:480–6.
- [30] de Sousa AA, Gomes PM, de Almeida AN, Maia AR, de Souza EP, Assreuy AM. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *J Ethnopharmacol* 2010;130:433–6.