รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย

เรื่อง
อันตรกิริยาของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน
ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริฯ
กับหน้าที่การทำงานของ พี-ไกลโคโปรตีน

ผู้รับผิดชอบโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภญ. สุรีย์ เจียรณ์มงคล

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

อันตรกิริยาของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวานในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริฯ กับหน้าที่การทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน

Interaction between P-glycoprotein and anti-diabetic medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

ผศ. ดร. ภญ. สุรีย์ เจียรณ์มงคล **ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา**

ผศ. ดร. ภญ. นนทิมา วรรธนะภูติ **ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม**

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัยชิ้นนี้ ขอขอบคุณ รศ. ดร. ภญ. สุรัตนา อำนวยผล ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม ศูนย์นวัตกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของสารสกัดพืชสมุนไพร 4 ชนิดในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ต่อการขนส่งยาผ่านเยื่อเลือกผ่านลำไส้เล็ก โดยใช้แบบจำลองเซลล์คาโค-2 เป็นแบบจำลองชั้นเยื่อบุสำหรับศึกษาการดูดซึมสาร ตัวอย่างพืชดังกล่าวประกอบด้วยลำป้าง (*Pterospermum littorale* Craib; วงศ์ Sterculiaceae) เขลง (*Dialium cochinchinense* Pierre; วงศ์ Fabaceae) พลองใบรี (*Mamecylon plebejum* Kurz. var. ellipsoideum Craib.; วงศ์ Melastomataceae) และโพทะเล (*Thespesia populnea* (L.) Soland.ex Corr.; วงศ์ Malvaceae) โดยส่วนของพืชทั้ง 4 ชนิดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายของการใช้ยาในโรคเบาหวานได้ การศึกษาดังกล่าวจะวัดผลของสารตัวอย่างที่มีต่อสภาพความสมบูรณ์และการทำงานในการเป็นเยื่อเลือกผ่านที่จำกัดการดูดซึมสารผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ โดยติดตามวัดผลของสารที่มีต่อค่าการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเยื่อบุ และการแพร่ผ่านของสารมาตรฐานลูสิเฟอร์เยลโล และผลของสารในการรบกวนการดูดซึมยาที่เป็นซับสเตรดของพี-ไกลโคโปรตีน ผลที่ได้จากการศึกษาพบสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด (ในความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถนำมาทดสอบได้) ไม่มีผลต่อสภาพความสมบูรณ์ของโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นและการทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ตลอดจนไม่มีผลต่อกระบวนการดูดซึมยาทางช่องว่างระหว่างเซลล์แต่อย่างใด สำหรับผลของสารตัวอย่างในการรบกวนการดูดซึมยาที่เป็นซับสเตรดของพี-ไกลโคโปรตีนจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: การขนส่งยาทางช่องว่างระหว่างเซลล์ อันตรกิริยาระหว่างยา พี-ไกลโคโปรตีน เขลง พลองใบรี ลำป้าง โพทะเล

Abstract

The purpose of this study was to investigate and compare the effects of 4 herbal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn on the drug absorption through intestinal restrictive barrier, using the in vitro model of the Caco-2 cells. The plants were selected into this study by its ability to inhibit α-glucosidase, which is a drug target for diabetic control. These plants included *Pterospermum littorale* Craib (Family Sterculiaceae); *Dialium cochinchinense* Pierre (Family Fabaceae); *Mamecylon plebejum* Kurz. var. ellipsoideum Craib. (Family Melastomataceae) and *Thespesia populnea* (L.) Soland.ex Corr. (Family Malvaceae). The effects of plant extracts on paracellular transport and their interaction with P-glycoprotein (P-gp) were determined. The restrictive integrity of Caco2 monolayers was assessed by transepithelial electrical resistant (TEER) values and Lucifer yellow transport. The results demonstrated that all of the plant extracts at the highest concentration in this study had no disruptive effect on the integrity and restrictive barrier property of the Caco-2 monolayers. The findings suggested that these extracts would not affect the tight junction integrity. Thus, they would be unable to facilitate the paracellular transport pathway. The interference on the absorption of P-gp substrate will be studied further.

Keywords: Paracellular transport, drug interaction, P-glycoprotein, *Pterospermum littorale, Dialium cochinchinense, Mamecylon plebejum, Thespesia populnea*

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	2
ผลการศึกษา	4
สรุปและวิจารณ์ผล	13
เอกสารอ้างอิง	15
ประวัตินักวิจัยและคณะ	17

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ค่าการต้านการนำไฟฟ้า (TEER) ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ก่อนและหลังการได้รับสารตัวอย่าง [ในสภาวะที่มี lucifer yellow (LY) เท่านั้นและ ในสภาวะที่มี LY ร่วมกับสารตัวอย่าง; LY+TP, LY+DC, LY+ PL หรือ LY+MP].....	6
ภาพที่ 2	ค่าการต้านการนำไฟฟ้า (TEER) ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ก่อนและหลังการได้รับสารตัวอย่าง [ในสภาวะที่ไม่มี lucifer yellow].....	7
ภาพที่ 3	ผลของสารสกัดพืชสมุนไพร TP, DC, PL, และ MP ต่อการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุที่เวลาต่างๆ.....	8
ภาพที่ 4	การแพร่ผ่านของ Lucifer yellow (LY transport) ผ่านชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 หลังได้รับสารตัวอย่าง.....	9
ภาพที่ 5	ค่าการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุคาโค-ทูก่อนและหลังการให้สารตัวอย่างทางฝั่ง apical compartment.....	12
ภาพที่ 6	ค่าการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุคาโค-ทูก่อนและหลังการให้สารตัวอย่างทางฝั่ง basolateral compartment.....	13

อันตรกิริยาของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวานในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ กับหน้าที่การทำงานของพี-ไกลโคโปรตีน

Interaction between P-glycoprotein and anti-diabetic medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

สุรีย์ เจียรณ์มงคล* และ นนทิมา วรรธนะภูติ**

Suree Jianmongkol* and Nontima Vardhanabhuti**

*ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา **ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
*Department of Pharmacology and Physiology, ** Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การนำพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์นั้นต้องคำนึงถึงประสิทธิผลในการรักษาและความปลอดภัยในการใช้ ตลอดจนเมื่อนำพืชสมุนไพรไปใช้ร่วมกับยาอื่นๆ เนื่องจากมีความเป็นไปได้สูงที่สารที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรเหล่านั้นจะมีผลรบกวนการออกฤทธิ์หรือเหนี่ยวนำให้เกิดพิษของยาอื่น ซึ่งปัญหาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและพืชสมุนไพรเกิดได้จากผลของพืชสมุนไพรที่มีต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ได้แก่ การดูดซึม การกระจายตัว การถูกทำลายโดยเอนไซม์ในร่างกาย การขับยาออกจากร่างกาย (Riley and Grime, 2004) ทำให้ความเข้มข้นของยาที่อวัยวะเป้าหมายเปลี่ยนแปลงไปอาจน้อยลงหรือเพิ่มขึ้นจากเดิมได้ ในโครงการนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาปัญหาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยากับพืชสมุนไพรที่เกี่ยวข้องกับการแพร่ผ่านของพืชสมุนไพรเข้าสู่ร่างการและการแพร่ผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เป็นอวัยวะเป้าหมาย ตลอดจนผลจากการใช้พืชสมุนไพรที่มีต่อการแพร่ผ่านของยาอื่น

ความสามารถในการแพร่ผ่านของสารเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆนั้นมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย หรือการแพร่ผ่านของยาหรือสารจากเลือดไปยังระบบอวัยวะ ปัจจัยที่จำกัดการแพร่ผ่านที่สำคัญได้แก่ (1) ตัวพาที่ขจัดการเข้าสู่เซลล์ของสาร (efflux transporter) เช่น P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistant protein (MRP) เป็นต้น (Fromm, 2003; 2004) (2) โครงสร้างไทท์จังก์ชั่น (tight junction) ซึ่งเปรียบเสมือนตัวช่วยยึดเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงกันให้แน่นหนามากขึ้น และทำให้สารไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ จากรายงานการศึกษาต่างๆ พบว่าการรบกวนการทำงานของ P-gp เป็นปัญหาหนึ่งในการใช้ยาร่วมกันหลายชนิด เช่นการเกิดพิษของ digoxin จาก verapamil ซึ่งยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ทำให้มีการสะสมของ digoxin จนเกิดพิษขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์รบกวนทำงานของ P-gp เช่น curcuminoids, curcumin (Anuchapreeda et al., 2002;

Nabekura et al., 2005; Ampasavate et al., 2009), quercetin, kaempferol (Kitagawa et al., 2005; Morris and Zhang, 2006), capsaicin, [6]-gingeral, resveratrol (Nabekura et al., 2005) หรือสารสกัดจากมะระ (Konishi et al., 2004) เป็นต้น รวมถึงมีรายงานว่าสารสมุนไพรมีผลต่อโครงสร้าง หน้าที่ของไทท์จังก์ชั่นอีกด้วยเช่นผลของ quercetin ในการปกป้องโครงสร้างดังกล่าว (Amasheh et al., 2008; Suzuki and Hara, 2009; Chuenkitiyanon et al., 2010; 2012)

ในชุดโครงการนี้มีวัตถุประสงค์คัดกรองหาพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านเบาหวาน โดยเลือกศึกษาในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ซึ่งมีความหลากหลายของพันธุ์พืชสมุนไพรมาก ทำให้มีโอกาสค้นพบพืชใหม่ๆที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเบาหวาน จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพร 4 ชนิดในพื้นที่ของโครงการฯ ได้แก่ ลำป้าง (*Pterospermum littorale* Craib; วงศ์ Sterculiaceae) เขลง (*Dialium cochinchinense* Pierre; วงศ์ Fabaceae) พลองใบรี (*Mamecylon plebejum* Kurz. var. ellipsoideum Craib.; วงศ์ Melastomataceae) และโพทะเล (*Thespesia populnea* (L.) Soland.ex Corr.; วงศ์ Malvaceae) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายของการใช้ยาในโรคเบาหวานได้ และมีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ P-glycoprotein ในแบบจำลองเซลล์คาโค-2 นอกจากนี้ยังพบว่าลำป้างและเขลงสามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ P- glycoprotein ได้อีกด้วย ซึ่งผลดังกล่าวอาจทำให้เกิดปัญหาอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมยาได้เมื่อนำไปใช้ร่วมกับยาอื่น นอกจากนี้ปัญหาอันตรกิริยายังอาจเกิดได้จากการรบกวนโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นทำให้การดูดซึมสารผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์เปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทดสอบโอกาสที่พืชสมุนไพรดังกล่าวจะรบกวนการดูดซึมยาที่เป็นซับสเตรดของพี-ไกลโคโปรตีน และรบกวนการแพร่ผ่านของยาผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular penetration) เพื่อให้มีข้อมูลที่จำเป็นต่อการพัฒนาพืชสมุนไพรให้ออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของพืชสมุนไพรเป้าหมายในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริฯ ที่มีต่อการขนส่งยาผ่านเยื่อเลือกผ่านลำไส้เล็ก โดย

- ศึกษาผลที่มีต่อการทำหน้าที่ของโครงสร้างไทท์จังก์ชั่น
- ศึกษาผลกระทบที่มีต่อการแพร่ผ่านของยาหรือสารอื่นที่เป็นซับสเตรดของพี-ไกลโคโปรตีน

วิธีดำเนินการศึกษา

โครงการนี้เลือกศึกษาตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ได้แก่ใบพลองใบรี เปลือกลำป้าง ผลโพทะเล เปลือกเขลง

1. การเตรียมตัวอย่าง

พืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดได้มีการจัดเตรียมโดยการหมักแช่แอลกอฮอร์นาน 5 วันและนำส่วนที่สกัดได้มาระเหยที่ความดันต่ำให้แห้ง จากนั้นทำการ partition เพิ่มเติม และเก็บสารสกัดทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20 เซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ

ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ: ความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้ เกิดความเป็นพิษต่อแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเซลล์พลองใบรี (MP, ความเข้มข้นไม่เกินกว่า 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร); ลำป้าง (PL, ความเข้มข้นไม่เกินกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร); โพทะเล (TP, ความเข้มข้นไม่เกินกว่า 75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเขลง (DC, ความเข้มข้นไม่เกินกว่า 75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

2. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง Caco 2

เซลล์ Caco 2 (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) ถูกเพาะ เลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS, 1% nonessential amino acid, 1% l-glutamine 1% และ penicillin–streptomycin ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 เซลเซียสและมีความชื้นสัมพัทธ์ 95%) และทำการ subculture ทุก 3-4 วัน (ความหนาแน่น 70%)

3. การเตรียมแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงคาโค2 ให้เป็นเยื่อเลือกผ่านลำไส้เล็ก

แบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงคาโค2 ที่สามารถใช้เป็นเยื่อเลือกผ่านลำไส้เล็กสำหรับศึกษาผลอันตรกิริยาของสารสมุนไพรนั้นจะต้องมีโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นที่สมบูรณ์และมีการแสดงออกของตัวขนส่งยาออก (efflux transporter) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพี-ไกลโคโปรตีน ซึ่งการในการเลี้ยงเซลล์คาโค2 ให้มีลักษณะดังกล่าว มีขั้นตอนดังนี้

- เซลล์ Caco 2 (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) ถูกเพาะ เลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS, 1% nonessential amino acid, 1% l-glutamine 1% และ penicillin–streptomycin ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 เซลเซียสและมีความชื้นสัมพัทธ์ 95%) และทำการ subculture ทุก 3-4 วัน (ความหนาแน่น 70%)
- ในการสร้างแบบจำลองเยื่อเลือกผ่านลำไส้เล็ก ให้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บน transwell inserts (polycarbonate, 12 mm diameter, 0.4 μm pore size; Corning Incorporated, Corning, NY, USA) เป็นเวลา 21 วัน ในระหว่างนี้สามารถตรวจวัดการเกิดไทท์จังก์ชั่นโดยวัดการแพร่ผ่านโดยใช้สารมาตรฐาน คือ Lucifer yellow ซึ่ง Lucifer yellow เป็นสารที่แทบจะไม่สามารถแพร่ผ่าน plasma membrane เข้าสู่เซลล์ แต่สารนี้จะแพร่ผ่านเซลล์ช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) โดยในสภาวะปกติ Lucifer yellow จะแพร่ผ่านเซลล์เยื่อบุผิวในอัตราที่น้อยกว่าร้อยละ 5 ต่อชั่วโมง และการทดสอบการแพร่ผ่านเซลล์ของ Lucifer yellow นี้ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสมบูรณ์ การจัดเรียงตัวกันแน่นของเซลล์และการสร้าง tight junction ที่สมบูรณ์ของเซลล์ Caco-2 ซึ่งนอกจาก Lucifer yellow แล้วยังติดตามไทท์จังก์ชั่นด้วยการวัดค่า transmembrane electrical resistance (TER)

โดยใช้ Millicell-ERS-eletrode (Millipore) ก่อนเริ่มการทดลองและหลังการทดลองจะต้องมีค่ามากกว่า 300 Ωcm2

4. ศึกษาผลของพืชสมุนไพรที่มีต่อการแพร่ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์

ทำการวัดความสามารถของพืชสมุนไพรในการเปิดโครงสร้างไทท์จังก์ชั่น โดยให้สารสกัดแก่เซลล์เพาะเลี้ยงในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และติดตามค่า TER ที่เวลาต่างๆกัน

5. ศึกษาผลกระทบที่มีต่อการแพร่ผ่านของยาหรือสารอื่น

ทำการวัดผลของของพืชสมุนไพรที่มีต่อการแพร่ผ่านของสารมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control เช่น rhodamine ในทิศทาง apical ถึง basolateral (A-B) และ basolateral ถึง apical (B-A) ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเขย่า 120 รอบ/นาที โดยทั้งด้าน apical และ basolateral จะควบคุม pH ให้เป็น 7.4 ก่อนเริ่มทำการทดลอง

การทดลองการแพร่ผ่านของสารในทิศทาง A – B นำเซลล์ Caco-2 ที่เลี้ยงไว้บน transwell insert ที่มีสารละลายของสารทดสอบอยู่ เคลื่อนย้ายออกมายังหลุมใหม่ที่บรรจุด้วย HBSS-Hepes (Hank's Buffered Salt Solution ที่ประกอบด้วย Hepes 25mM) ที่เวลา 15, 30 หรือ 60 นาที

การทดลองการแพร่ผ่านของสารในทิศทาง B – A โดยนำสารละลายของสารทดสอบมาใส่ลงในด้าน basolateral side หลังจากนั้นเก็บสารละลายทางด้าน apical side ที่เวลา 30, 60 หรือ 120 นาที
วิเคราะห์ผลโดยนำสารละลายที่เก็บได้จากทั้ง A – B และ B – A มาหาความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง HPLC (UV-vis) แล้วคำนวนหา Apparent permeability (Papp) จากสมการ Papp = dQ/dt โดย

Papp คือ apparent permeability coefficient (เซนติเมตร/วินาที) ในขณะที่ dQ/dt คือ อัตราเร็วในการแพร่ผ่าน (นาโนโมล/วินาที) และ C0 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นทางด้านที่ใส่สารทดสอบ (ไมโครโมลาร์) หลังจากนั้นนำค่า Papp ที่ได้จากทั้ง 2 ทิศทางมาคำนวณหาค่า efflux ratio โดย

Efflux ratio = PappB-A/ Papp A-B เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการที่ไม่มีสารทดสอบ

ผลการศึกษา

1. การเตรียมแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยง Caco2 บน Transwell® inserts ให้มีการแสดงออก P-glycoprotein และ โครงสร้างไทท์จังก์ชั่น

ในขณะนี้สามารถจัดทำแบบจำลองเซลล์ Caco-2 อายุ 21 วันหลัง seeding ให้เป็นเยื่อเลือกผ่านให้เป็นเยื่อเลือกผ่านลำไส้เล็กที่เป็นมาตรฐานและมีความสม่ำเสมอ โดยแบบจำลองที่สร้างขึ้นนั้นทำโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์

บน Transwell® inserts (polycarbonate, 0.4 μm pore side, 24 mm diameter; Corning Incorporated, Corning, NY, USA) ในสภาวะการเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum , 1% non-essential amino acids และ 1% penicillin/streptomycin ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95% โดยมีค่าพารามิเตอร์ของการเป็นเยื่อเลือกผ่าน Caco-2 อยู่ในเกณฑ์เหมาะสม ค่าพารามิเตอร์ประกอบด้วยค่าการนำไฟฟ้า (TER) อยู่ในช่วง 728.52 – 1092.78 Ω cm2; n=30 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าระดับที่ยอมรับโดยทั่วไป (>300-400 Ω cm2) อัตราการแพร่ผ่านของ Lucifer yellow ต่ำ โดยคิดเป็นร้อยละ 0.05 ± 0.01 ต่อชั่วโมง และมีการแสดงออกของ P-glycoprotein ในระดับที่เหมาะสม โดยดูการขนส่ง rhodamine 123 ซึ่งเป็น substrate ของ P-gp เปรียบเทียบระหว่างที่มี verapamil และ ไม่มี verapamil ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ P-gp ผลการศึกษาแสดงค่า Papp ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ผ่าน (Papp) และ net transport ของ Rhodamine ผ่านชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

	Papp (A-to-B) cms^{-1}	Papp (B-to-A) cms^{-1}	Efflux ratio
Rhodamine 123	$2.03 \pm 0.42 \times 10^{-6}$	$13.03 \pm 1.53 \times 10^{-6}$	6.4
Rhodamine 123 + verapamil	$2.33 \pm 0.38 \times 10^{-6}$	$4.86 \pm 0.41 \times 10^{-6}$	2.1

จะเห็นได้ว่าค่าการดูดซึมของ rhodamine123 จาก (efflux ratio) มากกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามข้อแนะนำของ USFDA สำหรับ P-gp substrate และ verapamil ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ P-gp มีผลลดค่าการดูดซึมของ rhodamine ได้ ดังนั้นแบบจำลองที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบสารสกัดต่อไป

2. การศึกษาผลของสารตัวอย่างที่มีต่อการแพร่ผ่านยาผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์

2.1 ผลของสารตัวอย่างต่อความสมบูรณ์และการทำงาน (monolayer integrity) ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

2.1.1 ผลของสารตัวอย่างต่อค่าการต้านการนำไฟฟ้า (TEER)

การทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบค่า TEER ก่อนการเติมสารตัวอย่างและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ใน 3 สภาวะ ได้แก่ (1) ในสภาวะที่มี lucifer yellow (LY) เท่านั้นและ (2) ในสภาวะที่มี LY ร่วมกับสารตัวอย่าง (TP DC PL หรือ MP) และ (3) ในสภาวะที่มีสารตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งพบว่าก่อนเริ่มทำการทดลองและหลังสิ้นสุดการทดลองค่า TEER ไม่มีความแตกต่างกัน และยังมีค่า TEER สูงกว่า 300 Ω cm2 (ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 1, 2) นอกจากนี้จากการติดตามค่า TEER ของแบบจำลองเยื่อเลือกผ่านในสภาวะที่มีสารตัวอย่างนาน 2 ชั่วโมง พบว่าสารตัวอย่าง ไม่มีผลรบกวนการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด

(ภาพที่ 3) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าสารตัวอย่างไม่มีผลเปลี่ยนแปลง monolayer integrity ของเซลล์ Caco-2 และไม่มีผลต่อการแพร่ผ่านของสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นกลไกหลักของสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี

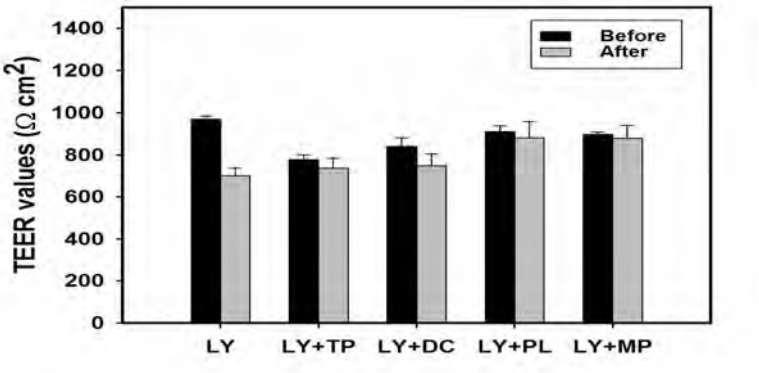
ตารางที่ 2 ค่าการต้านการนำไฟฟ้า (TEER) ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ก่อนและหลังการได้รับสารตัวอย่าง

สารตัวอย่าง (ความเข้มข้น)	**TEER values (Ω cm^2)***	
	Before	**After**
LY (100 µM)	969.173 ± 15.459	699.130 ± 38.902
LY (100 µM)+ TP (75 µg/ml)	778.028 ± 22.052	737.800 ± 47.682
LY (100 µM)+ DC (75 µg/ml)	840.933 ± 42.332	750.028 ± 55.205
LY (100 µM)+ PL (100 µg/ml)	910.468 ± 27.447	881.628 ± 78.111
LY (100 µM)+ MP (200 µg/ml)	898.055 ± 11.925	879.105 ±62.241

* ผลแสดงเป็นค่า mean ± S.E. จาก 3 – 4 independent experiments

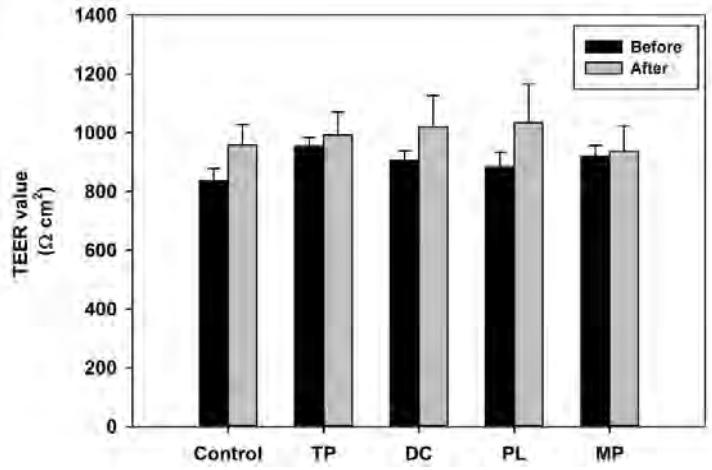
หมายเหตุ (1) LY = Lucifer yellow; MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง

(2) ความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร



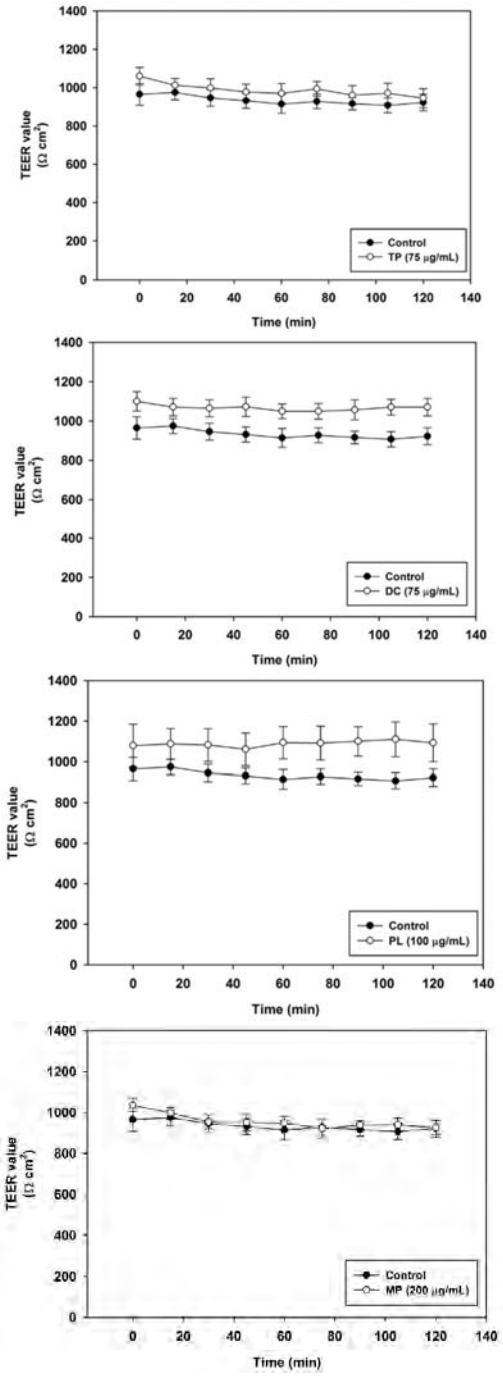
ภาพที่ 1 ค่าการต้านการนำไฟฟ้า (TEER) ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ก่อนและหลังการได้รับสารตัวอย่าง [ในสภาวะที่มี lucifer yellow (LY) เท่านั้นและในสภาวะที่มี LY ร่วมกับสารตัวอย่าง; LY+TP, LY+DC, LY+ PL หรือ LY+MP]

[MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง]



ภาพที่ 2 ค่าการต้านการนำไฟฟ้า (TEER) ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ก่อนและหลังการได้รับสารตัวอย่าง [ในสภาวะที่ไม่มี lucifer yellow]

[MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง]



ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดพืชสมุนไพร TP, DC, PL, และ MP ต่อการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุที่เวลาต่างๆ (n=3)

[MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง]

2.1.2 ผลของสารตัวอย่างต่อการแพร่ของ Lucifer yellow

การทดลองนี้ได้วัดความสามารถในการ transport ของ Lucifer yellow (LY) หลังสิ้นสุดการทดลองที่มีและไม่มีสารตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าร้อยละของ LY transport มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่า 0.06 ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และภาพที่ 4 ซึ่งในทุกการทดลองมีค่าร้อยละของ LY transport น้อยกว่า 1 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารตัวอย่างไม่มีผลต่อการเปิดโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นทำให้ไม่รบกวน monolayer integrity ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

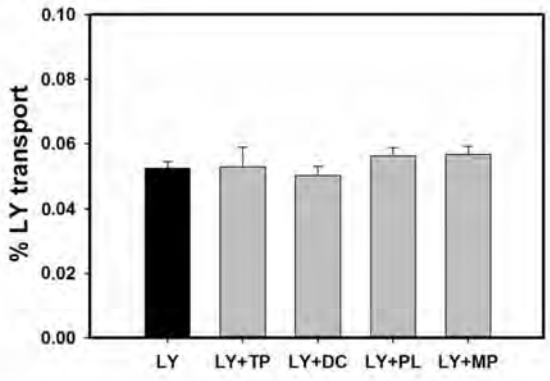
ตารางที่ 3 การแพร่ของ LY ผ่านชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ก่อนและหลังการได้รับสารตัวอย่าง

สารตัวอย่าง (ความเข้มข้น)	**% LY transport***
LY (100 µM)	0.052 ± 0.002
LY (100 µM)+ TP (75 µg/ml)	0.053 ± 0.006
LY (100 µM)+ DC (75 µg/ml)	0.050 ± 0.003
LY (100 µM)+ PL (100 µg/ml)	0.056 ± 0.003
LY (100 µM)+ MP (200 µg/ml)	0.057 ± 0.003

*ผลแสดงเป็นค่า mean ± S.E. จาก 3 – 4 independent experiments

หมายเหตุ (1) LY = Lucifer yellow; MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง

(2) ความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 4 การแพร่ผ่านของ Lucifer yellow (LY transport) ผ่านชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 หลังได้รับสารตัวอย่าง (n=3 – 4 independent experiments)

[MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง]

2.2 ผลของสารตัวอย่างต่อการแพร่ผ่านยาทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular transport pathway) ในชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

การศึกษานี้ได้ทดสอบผลของสารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด (TP DC PL และ MP) ต่อการแพร่ผ่านยาทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular transport pathway) โดยใช้ lucifer yellow (LY) เป็น marker ในการศึกษา ผลการศึกษาพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ผ่าน (apparent permeability coefficients (Papp)) ของ LY มีค่า 0.108 ± 0.012 (ดังแสดงในตารางที่ 4) ซึ่งแสดงว่าสารนี้เป็น low permeability compound ที่จะอาศัย paracellular transport pathway เป็นช่องทางสำคัญในการเข้าสู่เซลล์ (Hellinger et al., 2012)

ในสภาวะที่ใส่สารทดสอบทั้ง 4 สาร ได้แก่ TP DC PL และ MP ร่วมกับ lucifer yellow พบว่า Papp ของ lucifer yellow มีค่าลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบร่วมด้วย (ดังแสดงในตารางที่ 4) ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงอาจสรุปได้ว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแพร่ผ่านของ LY ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular transport pathway) ในชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ผ่านของ LY (Papp) ผ่านชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

สารตัวอย่าง (ความเข้มข้น)	**$P_{app\ (AP \rightarrow BL)}$ of LY (10^{-6} cms^{-1})***
LY (100 µM)	0.108 ± 0.012
LY (100 µM)+ TP (75 µg/ml)	0.074 ± 0.023
LY (100 µM)+ DC (75 µg/ml)	0.066 ± 0.021
LY (100 µM)+ PL (100 µg/ml)	0.078 ± 0.011
LY (100 µM)+ MP (200 µg/ml)	0.079 ± 0.016

*the apparent permeability coefficients across the Caco-2 monolayer from the apical-to-basal direction. Each value represents the mean ± S.E. of 3 – 4 independent experiments.

หมายเหตุ (1) LY = Lucifer yellow; MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง

(2) ความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.3 ทดสอบคุณสมบัติการเรืองแสง (fluorescence) ของสารตัวอย่าง

เนื่องจากสารทดสอบทั้ง 4 สารได้แก่ TP DC PL และ MP เป็นสารผสมซึ่งอาจมีสารประกอบที่มีคุณสมบัติเรืองแสง (fluorescence) ในความยาวคลื่นช่วงเดียวกันกับ LY ได้ ทำให้ผลที่ได้จากการศึกษาแปรปรวนลักษณะ false positive หรือรบกวนการตรวจวัดหาปริมาณของสาร LY ที่ใช้เป็น marker ในการทดลองได้ ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติการเรืองแสง fluorescence ของสารตัวอย่างที่อาจรบกวนการตรวจวัดหาปริมาณสาร LY ด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่น(Ex/Em) 485/535 nm

ผลการศึกษาพบว่าสารทดสอบทั้ง 4 สารได้แก่ TP DC PL และ MP มีค่า relative fluorescence unit (RFU) เมื่อเทียบกับ LY เท่ากับ 0.59%, 0.49%, 2.86%, และ 0.33% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งค่าที่ได้นี้มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับค่า RFU ของ LY นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะที่มี LY ร่วมกันกับสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ก็มีค่า RFU ไม่แตกต่างจากในสภาวะที่ไม่มีสารทดสอบ (ดังแสดงในตารางที่ 4) ดังนั้นจากผลทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่าสารทั้ง 4 ชนิดไม่มีผลรบกวนการตรวจวัดหาปริมาณของสาร LY ที่ใช้เป็น marker ในการทดลอง

ตารางที่ 5 คุณสมบัติการเรืองแสง fluorescence ของสารตัวอย่าง

สารตัวอย่าง	**Relative fluorescence unit (RFU)**	
	Mean ± S.E.[a]	**% of control**
LY (100 µM)	290608.00 ± 16258.00	100.00
LY (100 µM)+ TP (75 µg/ml)	284266.00 ± 7981.61	97.82
LY (100 µM)+ DC (75 µg/ml)	281204.50 ± 4640.46	96.76
LY (100 µM)+ PL (100 µg/ml)	291652.75 ± 4908.92	97.14
LY (100 µM)+ MP (200 µg/ml)	282284.00 ± 5179.81	100.36
TP (75 µg/ml)	1712.00 ± 77.00	0.59
DC (75 µg/ml)	1421.50 ± 695.50	0.49
PL (100 µg/ml)	964.00 ± 664.00	2.86
MP (200 µg/ml)	8314.00 ± 179.00	0.33

[a] Each value represents the mean ± S.E. of 2 – 4 independent experiments.

หมายเหตุ (1) LY = Lucifer yellow; MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง

(2) ความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3. ศึกษาผลกระทบที่มีต่อการแพร่ผ่านของยาหรือสารอื่น

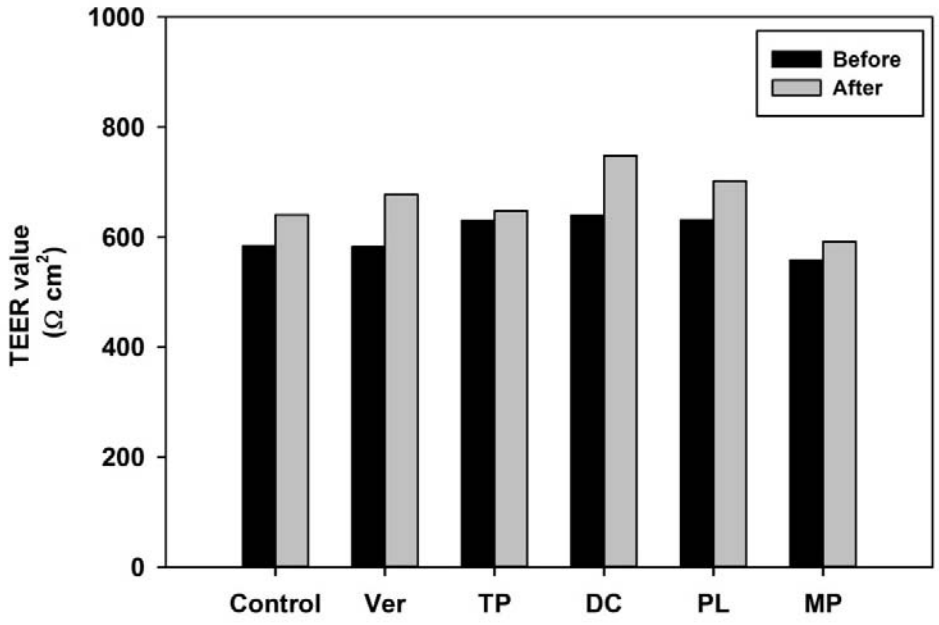
แม้ว่าสารตัวอย่างจะไม่มีผลต่อการแพร่ผ่านยาทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular transport pathway) แต่มีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดพืชสมุนไพรเหล่านี้อาจรบกวนการแพร่ผ่านของยาทาง transcellular transport pathway โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่เป็นสับสเตรทของพี-ไกลโคโปรตีน ซึ่งโปรตีนนี้ทำหน้าที่จำกัดการดูดซึมยาได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการทดสอบผลของสารตัวอย่างที่มีต่อการแพร่ผ่านของสารมาตรฐานที่เป็นสับสเตรทของพี-ไกลโคโปรตีน ซึ่งในการศึกษาผลดังกล่าวจะต้องทำการศึกษาตามขั้นตอนดังนี้

- ตรวจวัดความสมบูรณ์ของแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงคาโค-ทูก่อนการศึกษาการขนส่งยา (transport assay)
- ตรวจวิเคราะห์การทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนในแบบจำลองเซลล์คาโค-ทู

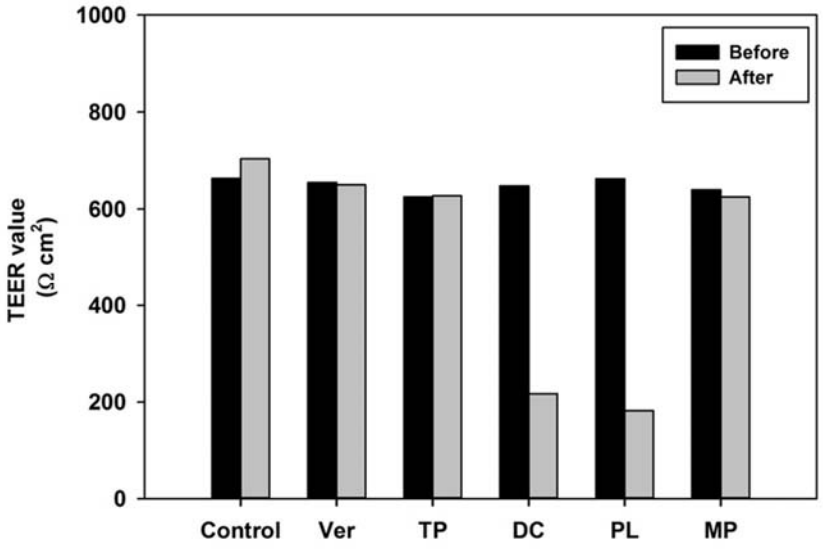
- วัดผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการรบกวนการแพร่ผ่านของสารมาตรฐานที่เป็นสับสเตรทของพี-ไกลโคโปรตีน

ในขณะนี้ได้ดำเนินการในขั้นแรกเสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยได้ตรวจวัดความสมบูรณ์ของแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงคาโค-ทูก่อนด้วยการวัดค่าการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุ (transepithelial electrical resistance หรือ TEER) ในสภาวะที่มีสารตัวอย่างใน apical compartment และ ใน basolateral compartment ซึ่งผลการทดลองพบว่าชั้นเซลล์เยื่อบุคาโค-ทูในทุกกลุ่มมีค่าการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุก่อนที่จะได้รับสารตัวอย่างมากกว่า 300 Ω cm2 และค่า TEER ที่วัดได้หลังจากที่เติมสารตัวอย่างใน apical compartment ไม่มีความแตกต่างจากค่าที่วัดได้ก่อนการเติมสารตัวอย่าง (ภาพที่ 5) แต่เมื่อชั้นเยื่อบุเซลล์คาโค-ทูได้รับสารสกัดพืชสมุนไพรทางฝั่ง basolateral compartment พบว่าค่า TEER ที่วัดได้หลังจากที่เติมสาร DC และ PL มีค่าลดลง โดยมีค่าน้อยกว่า 300 Ω cm2 ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ TP และ MP ไม่พบผลดังกล่าว (ภาพที่ 6) ในการศึกษานี้ได้ใช้ verapamil (Ver) เป็น positive control

สำหรับการดำเนินงานในลำดับถัดไปนั้นจะต้องทำการตรวจวิเคราะห์การทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนก่อนที่จะทำการศึกษาผลสารสกัดพืชสมุนไพรในการรบกวนการแพร่ผ่านของสารมาตรฐานที่เป็นสับสเตรทของพี-ไกลโคโปรตีน ซึ่งจะทำการทดสอบเสร็จสิ้นในปีงบประมาณ 2559



ภาพที่ 5 ค่าการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุคาโค-ทูก่อนและหลังการให้สารตัวอย่างทางฝั่ง apical compartment โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (2 independent experiments)
[MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง]



ภาพที่ 6 ค่าการต้านการนำไฟฟ้าของชั้นเซลล์เยื่อบุคาโค-ทูก่อนและหลังการให้สารตัวอย่างทางฝั่ง basolateral compartment โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (2 independent experiments)
[MP = พลองใบรี; PL=ลำป้าง; TP=โพทะเล; DC=เขลง]

สรุปและวิจารณ์ผล

ปัญหาอันตรกิริยาระหว่างยาเกิดขึ้นได้จากการใช้ยาหรือพืชสมุนไพรหลายชนิดร่วมกัน โดยที่ยาหรือสมุนไพรตัวใดตัวหนึ่งมีผลทำให้การออกฤทธิ์หรือความเป็นพิษของยาอีกตัวเปลี่ยนแปลงไป การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาส่วนหนึ่งเกิดจากการรบกวนการแพร่ผ่านของสารผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ของชั้นเยื่อบุ ซึ่งอาจเกิดได้จากสารมีผลต่อโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นทำให้เกิดการแพร่ผ่านของสาร hydrophilic ได้มากขึ้น ซึ่งในการศึกษานี้ได้มุ่งเน้นการศึกษาผลของสารสกัดพืช 4 ชนิดได้แก่ พลองใบรี ลำป้าง เขลง และ โพทะเลต่อสภาพความสมบูรณ์และการทำงาน (monolayer integrity) ของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 และผลในการรบกวนการแพร่ผ่านของสาร hydrophilic เช่น Lucifer yellow ทั้งนี้พืชทั้ง 4 ชนิดถูกคัดเลือกมาเพื่อศึกษาเนื่องจากได้มีข้อมูลเบื้องเกี่ยวกับคุณสมบัติของพืชเหล่านี้ในการยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ทำให้อาจมีประโยชน์ในการพัฒนาต่อเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

การศึกษาได้เลือกใช้แบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยง Caco2 อายุ 21 วัน ซึ่งเป็นแบบจำลองมาตรฐานที่ได้รับความนิยมในการทดสอบการดูดซึมยาที่ลำไส้เล็ก (Artursson et al., 2001; Wahlang et al., 2009) เนื่องจากเซลล์ชนิดดังกล่าวเป็น epithelial human colon adenocarcinoma cell line ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจะเปลี่ยนแปลงเป็น enterocyte และมีการแสดงออกของตัวขนส่งยาชนิดต่างๆ รวมถึง P-glycoprotein อีกด้วย ซึ่งจากแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยง Caco2 ในการศึกษานี้มีความเหมาะสมมีความสมบูรณ์และการทำงาน

(monolayer integrity) สำหรับการใช้เป็นแบบจำลองเยื่อเลือกผ่านที่มีโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นที่จำกัดการแพร่ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular transport pathway) และ P-glycoprotein ที่จำกัดการแพร่ผ่านเซลล์ของสาร (transcellular transport pathway)

ผลการศึกษาสารสกัดพืช 4 ชนิดพบว่าไม่มีผลต่อสภาพความสมบูรณ์และการทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านของชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยค่าต้านการนำไฟฟ้า (TEER) ของชั้นเยื่อบุไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับสารตัวอย่าง นอกจากนี้สารตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดไม่มีผลต่อ Lucifer yellow ที่เป็นสารมาตรฐานบ่งชี้การแพร่ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular transport) (Bansal et al., 2007; Wahlang et al., 2011; Johannessen et al., 2013) ทั้งนี้ชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่มีคุณสมบัติเป็น restrictive barrier ที่ดี ไม่มีรูรั่วระหว่างเซลล์ มีโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นที่สมบูรณ์ จะมีค่า TEER มากกว่า 300 Ω cm^2 และการแพร่ผ่านของ lucifer yellow น้อยกว่าร้อยละ 1 ต่อชั่วโมง (Bansal et al., 2007; Hunter et al. 1993; Troutman and Thakker, 2003) นอกจากนี้เมื่อให้สารสกัดพืช 4 ชนิดร่วมกับ lucifer yellow ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ผ่าน (Papp) ต่ำ จัดอยู่ในกลุ่ม low permeability compound ก็ไม่พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดจะสามารถเพิ่มการผ่านชั้นเยื่อบุเซลล์เพาะเลี้ยงของ Lucifer yellow ได้แต่อย่างใด

โดยทั่วไปแล้วการให้สารตัวอย่างทางด้าน apical compartment เป็นแบบจำลองการดูดซึมยา ในขณะที่การให้สารตัวอย่างใน basolateral compartment เป็นแบบจำลองการหลั่งยาออกจากร่างกายเข้าสู่ลำไส้เล็ก ซึ่งในการศึกษาการขนส่งยาหรือการดูดซึมยา จำเป็นต้องศึกษาการแพร่ผ่านทั้ง 2 ด้าน คือการแพร่ผ่านจาก apical compartment เข้าสู่ basolateral compartment (ดูดซึม) และการแพร่ผ่านจาก basolateal compartment เข้าสู่ apical compartment (หลั่งยาออก) ทั้งนี้การทำงานของพี-ไกลโคโปรตีนจะมีผลลดการดูดซึมและเพิ่มการหลั่งยาออก ดังนั้นในการศึกษาจึงต้องทดสอบความสมบูรณ์ของแบบจำลองชั้นเยื่อบุเมื่อได้รับสารทั้งจากทาง apical compartment หรือ basolateral compartment ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าการให้สารสกัดเขลงและลำป้างใน basolateral compartment มีผลเพิ่มการนำไฟฟ้าของชั้นเยื่อบุ แสดงถึงผลของสารสกัดเขลงและลำป้างทั้ง 2 ชนิดที่ทำให้ช่องว่างระหว่างเซลล์เปิดออก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดพืชทั้ง 2 ชนิดมีผลกระตุ้นสัญญาณ (signaling) ภายในเซลล์คาโค-ทู จากทางด้าน baso;ateral site และส่งผลให้โครงสร้างไทท์จังก์ชั่นเปิดออกได้ แต่เนื่องจากสารไม่ถูกดูดซึมหรือดูดซึมได้น้อย ทำให้ไม่เห็นผลกระตุ้นการเปิดของโครงสร้างไทท์จังก์ชั่นเมื่อให้สารทาง apical compartment

แม้ว่าสารสกัดพืชมีสารสำคัญหลายชนิดและไม่อาจคำนวณหรือทราบถึงความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ได้อย่างแน่นอน อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ได้ชี้ให้เห็นว่าพืช 4 ชนิดได้แก่ พลองใบรี ลำป้าง เขลง และ โพทะเล ไม่มีผลต่อการดูดซึมยาผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ สำหรับผลกระทบของสารสกัดพืชที่มีต่อการแพร่ผ่านของยาหรือสารอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของสารสกัดพืชสมุนไพรในการรบกวนการแพร่ผ่านของสารมาตรฐานที่เป็นสับสเตรทของพี-ไกลโคโปรตีนจะได้ทำการศึกษาเป็นลำดับถัดไป

เอกสารอ้างอิง

- Amasheh M, Schlichter S, Amasheh S, et al. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco2 cells.J Nutr 2008;138:1067-73.
- Ampasavate C, Sotanaphun U, Phattanawasin P, Piyapolrungroj N. Effects of Curcuma spp. On P-glycoprotein function. Phytomedicine 2009 :1-6.
- Anuchapreeda S, Leechanachai P, Smith MM, Ambudkar SV, Limtrakul PN. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistance human KB cells. Biochemical Pharmacology 2002; 64:573-582.
- Bansal T, Singh M, et al. (2007). "Concurrent determination of topotecan and model permeability markers (atenolol, antipyrine, propranolol and furosemide) by reversed phase liquid chromatography: utility in Caco-2 intestinal absorption studies." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 859(2): 261-266.
- Chuenkitiyanon S, Pengsuparp T, Jianmongkol S. Protective effect of quercetin on hydrogen peroxide-induced tight junction disruption. IntJ Toxicol 2010; 29: 418-24.
- Chuenkitiyanon S, Vardhanabhuti N, Jianmongkol S. A potential benefit of quercetin in preserving tight junction intregrity. Journal of Epithelial Biology and Pharmacology 2012; 5 (Suppl 1-M4): 28-31 (Review).
- Fromm MF. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. Eur J Clin Invest 2003; 33: 6-9.
- Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood - tissue barriers. Trends Pharmacol Sci 2004; 25: 423-429.
- Hellinger, E., M. L. Bakk, et al. (2012). "Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures." Eur J Pharm Sci. 41(1): 96-106.
- Hunter J, Jepson MA, et al. (1993). "Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators." J Biol Chem. 268(20): 14991-14997.
- Johannessen LE, Spilsberg B, et al. (2013). "DNA-fragments are transcytosed across CaCo-2 cells by adsorptive endocytosis and vesicular mediated transport." PLoS One. 8(2).

- Konishi T, Satsu H, Hatsugai Y, Aizawa K, Inakuma T, Nagata S. A bitter melon extract inhibits the P-glycoprotein activity in intestinal Caco - 2 cells: Monoglyceride as an active compound. Biofactors 2004; 22: 71-74.
- Kitagawa S, Nabekura T, Takahashi T, Nakamura Y, Sakamoto H, Tano H, Hirai M, Tsukahara G. Structure–Activity Relationships of the Inhibitory Effects of Flavonoids on P-Glycoprotein-Mediated Transport in KB-C2 Cells. Biol. Pharm. Bull. 2005; 28(12) 2274-8.
- Morris ME and Zhang S. Flavonoid–drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. Life Sciences 2006; 78: 2116-30.
- Nabekura T, Kamiyama S, Kitagawa S. Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 327: 866-870.
- Riley RJ, and Grime K. Metabolic screening in vitro: metabolic stability, CYP inhibition and induction. Drug Discov Today 2004; 1(4):365-372.
- Suzuki T, Hara H. Quercetin enhance intestinal barrier function through the assembly of zonnula occludin-2, occludin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. J Nutr 2009;139:965-74.
- Troutman MD and Thakker DR (2003). "Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells." Pharm Res. 20(8): 1192-1199.
- Wahlang B, Pawar YB, et al. (2011). "Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model." Eur J Pharm Biopharm. 77(2): 275-282.

ประวัติคณะวิจัย

1. นางสาว สุรีย์ เจียรณ์มงคล

ชื่อ (ภาษาไทย) .....นางสาว สุรีย์ เจียรณ์มงคล.....ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Miss Suree Jianmongkol

ภาควิชา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะ/สถาบัน .....คณะเภสัชศาสตร์.....

โทรศัพท์ ....02 2188318..... โทรสาร ...02 2188324..... E-mail sureejmk@yahoo.com.....

ที่อยู่ปัจจุบัน .....ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330 โทรศัพท์ .0851153921.

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย The University of Michigan, Ann Arbor	ภบ. M.S.	เภสัชศาสตร์ Toxicology	2529 2536
The University of Michigan, Ann Arbor	Ph.D.	Toxicology	2541

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

- N Sukhaphirom, N Vardhanabhuti, H Chirdchupunseree, P Pramyothin, S Jianmongkol (2012). Phyllanthin and Hypophyllanthin Inhibit Function of P- gp But not MRP2 in Caco-2 Cells. J of Pharmacy and Pharmacology (manuscript Accepted).
- R Wongwanakul, N Vardhanabhuti, S Jianmongkol (2012). Effects of Rhinacanthin-N on Efflux Drug Transporters in the Caco-2 cells. Thai J. of Pharmacology (manuscript accepted).
- A Suk-aim, N Piyapolrungroj, S Jianmongkol (2012). Inhibitory Effects of Nomilin on the Cytochrome P450 3A4 Activity. Thai J. of Pharmacology (manuscript accepted).
- S Chuenkitiyanon, N Vardhanabhuti, S Jianmongkol (2012). A potential benefit of quercetin in preserving tight junction intregrity. Journal of Epithelial Biology and Pharmacology 5, (Suppl 1-M4): 28-31 (Review).
- M Inchoo, H Chirdchupunseree, P Pramyothin, and S Jianmongkol (2011). Endothelium-independent Effects of Phyllanthin and Hypophyllanthin on Vascular Tension. Fitoterapia 82: 1231-1236.

- S Chuenkitiyanon, T Pengsuparp, and S Jianmongkol (2010). Protective Effect Of Quercetin on Hydrogen Peroxide-Induced Tight Junction Disruption. Int J Toxicol (First published on May 5, 2010, doi:10.1177/1091581810366487)
- N Chaothanaphat, P Dhumma-upakorn, and S Jianmongkol (2010). In Vitro Modulating Effects of Glutathione on Vascular Tension and Involvement of Extracellular Calcium. Drug Discoveries & Therapeutics 4(1): 19-25
- A. Laorpaksa, S Jianmongkol, and W Pothiwong (2008). Antimicrobial Activity of Endophytic Bacteria Isolated from Thai Medicinal Plant. Thai J Pharm Sci 32, 21-32
- W Pothiwong, A Laorpaksa, N Pilarat, S Sirisawadi, J Intarapanya, and S Jianmongkol (2007). Autoxidation of Brain Homogenates from Various Animals as Measured by Thiobarbituric Acid Assay. J Pharmacological and Toxicological Methods. J Pharm Tox Methods 56(3):336-8.
- G J Jenkins, S Jianmongkol, M Nakatsuka, E R Lowe, M Lau, and Y Osawa (2006). Tetrahydrobiopterin Protects Against Guanabenz-Mediated Inhibition of Neuronal NO Synthase in Vitro and in Vivo. Drug Metab Dispos. 34(9): 1448-56
- A J Lee, K R Noon, S Jianmongkol, M Lau, G J Jenkins, and Y Osawa (2005) Metabolism of aminoguanidine, diaminoguanidine, and NG-amino-L-arginine by neuronal NO-synthase and covalent alteration of the heme prosthetic group. Chem. Res. Toxicol. 18, 1927-1933.
- S Charoensomprasong, P Dhumma-upakorn, C Patarapanich, and S Jianmongkol (2004). Effects of new synthetic acyl aniline and acyl aminopyridine derivatives on calcium entry in rat vas deferens. Thai J Pharmacol. 26 (2), 95-103.
- A Khayungarnnawee, P Dhumma-upakorn, C Patarapanich, and S Jianmongkol (2004). Effects of new synthetic acyl aniline and acyl aminopyridine derivatives on contractility of rat aorta. Thai J Pharm Sci. 28 (1-2), 73-82.
- S Jianmongkol, and A Khayungarnnawee (2003). Gene therapy: new options for hypertensive treatment. (Review) Thai J Pharmacol. 25 (3), 219-231.
- P Puechprom, P Dhumma-upakorn, C Patarapanich, and S Jianmongkol (2003). Functional screening for the effects of new acyl aniline and acyl aminopyridine derivatives on calcium entry in rat aortic smooth muscle. Thai J. Pharm. Sci. 26(3-4), 85-95.
- JL Vuletich, ER Lowe, S Jianmongkol, Y Kamada, UM Kent, AT Bender, DR Demady, PF Hollenberg, Y Osawa. (2002). Alteration of the heme prosthetic group of neuronal nitric-oxide synthase during inactivation by N(G)-amino-L-arginine in vitro and in vivo. Mol. Pharmacol. 62(1), 110-8.
- DR Demady, S Jianmongkol, JL Vuletich, AT Bender, and Y Osawa (2001). Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal nitric oxide synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. Mol. Pharmacol. 59, 1-6

- S Jianmongkol, JL Vuletich, AT Bender, DR Demady, and Y Osawa (2000). Aminoguanidine- mediated inactivation and alteration of neuronal nitric oxide synthase. J. Biological Chemistry 275, 13370-13376.
- S Noguchi, S Jianmongkol, Y Kamada, , DR Demady, and Y Osawa (2000). Guanabenz-mediated inactivation and enhanced proteolytic degradation of neuronal nitric oxide synthase. J. Biological Chemistry 275, 2376-2380.
- S Jianmongkol, BR Marable, CE Berkman, CM Thompson, and RJ Richardson (1999). Kinetic evidence for different mechanisms of acetylcholinesterase inhibition by 1S and 1R isomalathion. Toxicology and Applied Pharmacology 155, 43-53.
- S Jianmongkol, CE Berkman, CM Thompson, and RJ Richardson (1996). Relative potencies of the four stereoisomers of isomalathion for inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase. Toxicology and Applied Pharmacology 139, 342-348.

2. นางสาว นนทิมา วรรธนะภูติ

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว นนทิมา วรรธนะภูติ ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Ms. Nontima Vardhanabhuti

ภาควิชา วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะ/สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์

โทรศัพท์ 02-218-8397 โทรสาร .... 02-218-8401..... E-mail nontima.v@chula.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน ภาควิชา วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-2188397

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ภ.บ. (เกียรตินิยม อันดับหนึ่ง)	เภสัชศาสตร์	2524
มหาวิทยาลัยมหิดล	วท.ม.	เภสัชศาสตร์	2526
University of Michigan (Ann Arbor)	M.S.	Pharmaceutics	2536
University of Michigan (Ann Arbor)	Ph.D.	Pharmaceutics	2538

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

- Paupermpoonsiri, V. Lipipun, and N. Vardhanabhuti. Synergistic effect of phospholipids-based liposomes and propylthiouracil on U-937 cell growth. Journal of Liposome Research Vol. 15 (No. 3&4): 1-13, 2005.
- นนทิมา วรรธนะภูติ อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ รัตนา รัตนตรัยภพ และ วิมลมาศ ลิปิพันธ์. “การใช้ลิโพโซมเพื่อนำส่งยาเข้าสู่เซลล์ล์: กรณีศึกษาผลของโพรพิลไธโอยูเรซิลที่บรรจุอยู่ในลิโพโซมต่อการเจริญของเซลล์ล์เพาะเลี้ยง ชนิด BALB/c 3T3 fibroblast และ U-937 histiocyte”. เอกสารประกอบการนำเสนอบทความวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทยสู่เศรษฐกิจยุคโมเลกุล ในการประชุมประจำปี สวทช. 2548 วันที่ 28-30 มีนาคม 2548 ณ ศูนย์ประชุมอุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (Oral presentation)
- Chetaratanont, P., Suwakul, W., and Vardhanabhuti, N. “EFFECTS OF FORMULATION FACTORS ON VESICLE FORMATION AND DRUG ENTRAPMENT OF MINOXIDIL NIOSOMES”. Pharmaceutical Sciences World Congress: The Global Translation of Science into Drug Development in Advancing Therapy. Kyoto, Japan, May 30–June 3, 2004. (Poster presentation)

- Pengsuparp, T., Hutamekalin, P., Eam-ngamsom, W., Suttisri, R., Vardhanabhuti, N., Ongpipattanakul, B., Unchern, S., and Meksuriyen, D. CNS activity of Thai herbal extracts using radioligand receptor binding assays. (P2E-III-003) Pharmaceutical Sciences World Congress: The Global Translation of Science into Drug Development in Advancing Therapy. Kyoto, Japan, May 30 – June 3, 2004. (Poster presentation)
- Rattanptraiphop, R., Lipipun, V., and Vardhanabhuti, N. 2001 Effects of formulation factors on propylthiouracil encapsulation in phospholipids-based liposomal systems. Thai J. Pharm. Sci. Vol. 25 (supplement), p. 13. (Abstract/Poster presentation)
- นนทิมา วรรธนะภูติ รายงานผลการวิจัย เรื่อง การศึกษาความเป็นไปได้และการประเมินการใช้ลิควิดคริสตัลในการนำส่งตัวยาทางผิวหนัง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มิถุนายน 2542 (หัวหน้าโครงการวิจัย)
- Ongpipattanakul, B., and Vardhanabhuti, N. 1998. The preparation of amphotericin B-lipid admixtures for intravenous administration. Thailand-Tropical Diseases Research Programme (T2), National Science and Technology Development Agency (Research report). (ผู้ร่วมวิจัย)
- Vardhanabhuti, N., Ramachandran, C., Schacht, J., and Weiner, N. 1997. Preparation of liposomes with asymmetric distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate across the bilayer. J. Liposome Res. 7:301-314. (ผู้วิจัยหลัก)
- Niyompattamah, O., Vardhanabhuti, N., and Nimmannit, U. 1997. Effect of ion interaction on entrapment of lactic acid in liposomes. 11th International Symposium on Microencapsulation, August 27-29, Bangkok, Thailand. (ผู้ร่วมวิจัย)
- Nimmannit, U., Vardhanabhuti, N., and Niyompattamah, O. 1997. Liposomal encapsulation of lactic acid: Factors affecting lactic acid entrapment. Proceedings of the 16th Pharmaceutical Technology Conference, April 15-17, Athens, Greece. (ผู้ร่วมวิจัย)