รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

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

ผศ. ดร. ภญ. สุรีย์ เจียรณ์มงคล ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
ผศ. ดร. ภญ. นนทิมา วรรธนะภูติ ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 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 ต่อการทำหน้าที่ของ P-glycoprotein ในแบบจำลองเซลล์คาโค-2 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 การศึกษาการทำงานของ P-glycoprotein ดังกล่าวจะวัดจากการสะสมของ calcein ในเซลล์คาโค-2 ที่เพาะเลี้ยง 21 วัน ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าพลองใบรี และ ลำป้าง (ในความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถนำมาทดสอบได้) ไม่มีผลรบกวนการทำงานของ P-glycoprotein ในขณะที่โพทะเลและเขลงสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนดังกล่าวได้ประมาณ 2-3 เท่า โดยผลที่เกิดขึ้นแปรตามความเข้มข้นของสารสกัดพืชที่ใช้ในการศึกษา ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการนำโพทะเลและเขลงมาใช้อาจทำให้เกิดปัญหาอันตรกริยาระหว่างยาจากคุณสมบัติในการยับยั้งการทำหน้าที่ของ P- glycoprotein ซึ่งยังคงต้องศึกษาผลกระทบในด้านดังกล่าวต่อไป

คำสำคัญ: พี-ไกลโคโปรตีน อันตรกิริยาระหว่างยา 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 function of P-glycoprotein, 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 function of P-glycoprotein was assessed by measuring the intracellular calcein accumulation in the Caco-2 cells cultured for 21 days. The results demonstrated that extracts of *Mamecylon plebejum* and *Pterospermum littorale* at the highest concentration in this study were unable to affect the activity of P-glycoprotein. On the other hand, extracts of *Dialium cochinchinense* and *Thespesia populnea* inhibited the P-glycoprotein function in comparable potency by 2-3 folds. The inhibitory actions of the two extracts were concentration dependent. Hence, it was possible that *Dialium cochinchinense* and *Thespesia populnea* might be able to cause problems regarding P-glycoprotein-mediated drug interactions through the direct inhibition of this efflux pump. Further studies in this regard are needed.

Keywords: P-glycoprotein, drug interaction, *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	10
เอกสารอ้างอิง	11
ประวัตินักวิจัยและคณะ	13

เลขหมู่
เลขทะเบียน 015909
วัน, เดือน, ปี 17 พ.ค. 56

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	การสะสมของ calcein ในเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารตามปกติเป็นเวลานาน 21 วัน	5
ภาพที่ 2	การสะสมของ calcein ในเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี vinbalstine เป็นส่วนผสม เป็นเวลานาน 21 วัน	5
ภาพที่ 3	ผลของสารต่อการอยู่รอดของเซลล์ Caco2	6
ภาพที่ 4	ผลของพลองใบรีที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein	7
ภาพที่ 5	ผลของลำป้างที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein	8
ภาพที่ 6	ผลของโพทะเลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein	8
ภาพที่ 7	ผลของเขลงที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein	9

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

เบาหวานเป็นโรคเรื้อรังทางเมตาบอลิค ทำให้มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งถ้าปล่อยทิ้งไว้จะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่นไตวาย ตาบอด ปลายประสาทอักเสบ โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น ดังนั้นหลักการรักษาโรคจึงมุ่งเน้นการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเป็นสำคัญ ซึ่งแนวทางการรักษาที่สำคัญได้แก่ การควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย และการใช้ยาลดระดับน้ำตาลในเลือด ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีความตื่นตัวในการใช้สมุนไพรพื้นถิ่นอย่างมากในการรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งโรคเบาหวานด้วย เช่นมะระขี้นก เปลือกอบเชยเป็นต้น ทั้งนี้ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่อาจมีฤทธิ์ต้านเบาหวานในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริฯนั้น มีอย่างน้อย 4 ชนิดได้แก่ 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*) โดยส่วนของพืชทั้ง 4 ชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ได้มากกว่าร้อยละ 95

อย่างไรก็ตามนอกจากการคำนึงถึงประสิทธิผลในการลดน้ำตาลและควบคุมโรคแล้ว ในการนำพืชสมุนไพรมาใช้ต้องคำนึงความปลอดภัยและโอกาสที่พืชดังกล่าวจะรบกวนหรือเกิดอันตรกิริยากับยาอื่นที่ผู้ป่วยจำเป็นต้องใช้ ซึ่งในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานนี้มักจะต้องใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน ทั้งนี้ผลกระทบของพืชสมุนไพรที่มีต่อกระบวนการทางเภสัชจลนศาสตร์ได้แก่ การดูดซึม การกระจายตัว การถูกทำลายโดยเอนไซม์ในร่างกาย การขับยาออกจากร่างกาย เป็นสาเหตุหลักที่สำคัญต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา

(Riley and Grime, 2004) ซึ่งโครงการนี้ได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาปัญหาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยากับพืชสมุนไพรจากการรบกวนการขนส่งยาผ่านเมมเบรนด้วยตัวพา (transporter) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง P-glycoprotein ซึ่งจะทำให้ยานั้นไม่ได้ผลในการรักษาตามที่คาด หรือ เกิดพิษของยาได้

P-glycoprotein เป็นตัวพาที่สำคัญตัวหนึ่ง มีบทบาทในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย การขจัดยาออกจากเซลล์ การป้องกันการแพร่ผ่านของสารแปลกปลอม (xenobiotics) เข้าสู่อวัยวะเช่นสมอง รวมถึงการดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกาย การรบกวนการทำงานของ P-glycoprotein ทำให้เกิดปัญหาอันตรกิริยาระหว่างยาที่พบได้บ่อย เช่นการเกิดพิษของ digoxin จาก verapamil ซึ่งยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ทำให้มีการสะสมของ digoxin จนเกิดพิษขึ้น นอกจากยาแล้วสารสกัดสมุนไพรและส่วนประกอบที่แยกจากสารสกัดสมุนไพรสามารถรบกวนการทำงานของ P-glycoprotein ก่อให้เกิดปัญหาอันตรกิริยาของยาได้เช่นกัน ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่างพืชสมุนไพรเป้าหมายกับ P-glycoprotein จึงเป็นข้อมูลที่จำเป็นต่อการพัฒนาพืชสมุนไพรที่ต้องการให้ออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอันตรกิริยาของพืชสมุนไพรเป้าหมายในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ที่มีต่อหน้าที่การทำงานของ P-glycoprotein

วิธีดำเนินการศึกษา

โครงการนี้เลือกศึกษาตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ได้แก่ใบพลองใบรี เปลือกลำป้าง ผลโพทะเล เปลือกเขลง

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

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

ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ: พลองใบรี (ความเข้มข้น 400*, 300, 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร); ลำป้าง (ความเข้มข้น 200*, 150, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร); โพทะเล (ความเข้มข้น 150*, 100, 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และเขลง (ความเข้มข้น 150*, 100, 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [*ความเข้มข้นสูงสุดที่ละลายได้และเป็นความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบ]

3.2 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง Caco 2

เซลล์ Caco 2 (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS, 1% nonessential amino acid, 1% l-glutamine 1%

penicillin–streptomycin และ vinblastine (10 nM) และเพาะเลี้ยง ในสภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 เซลเซียสและมีความชื้นสัมพัทธ์ 95%) และทำการ subculture ทุก 3-4 วัน

เซลล์ที่จะนำมาใช้ในการคัดกรองเบื้องต้นในด้านความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรจะถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well plates โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในสภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 2 วัน

เซลล์ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบการทำงานของ P-glycoprotein จะถูกแยกมาเพาะเลี้ยงใน 24-well plates โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 1.3×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ทั้งนี้จะต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะมาตรฐานเป็นเวลานาน 21 วัน (เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน) เพื่อให้เซลล์มีการแสดงออกของ P-glycoprotein ที่เหมาะสม ทั้งนี้ก่อนการทดสอบการทำงานของ P-glycoprotein จะต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จากเดิมที่มี vinblastine (10 nM) เป็นส่วนผสมให้เป็นอาหารที่ไม่มี vinblastine ก่อนการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับ P-glycoprotein ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco 2

3.2.1 ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Caco 2

นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาบ่มร่วมกับสารสกัดสมุนไพรที่จะทดสอบทดสอบที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วย PBS (pH 7.4) แล้วเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน DMEM ที่ปราศจาก FBS บ่มที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่จะปรากฏผลึก formazan ขึ้น ซึ่งสามารถวัดปริมาณได้โดยทำการละลายผลึกดังกล่าวด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

3.2.2 การวัดการทำงานของ P-glycoprotein

การวัดการทำงานของ P-glycoprotein สามารถทำได้โดยวัดการเข้าสู่เซลล์ของ calcein-AM ซึ่งเป็น substrate ของมัน (Ampasavate et al., 2009) เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วโมเลกุล calcein-AM จะถูกแตกออกด้วย ได้ calcein ที่มีคุณสมบัติเรืองแสง (fluorescent) และไม่ถูกขับออกจากเซลล์โดย P-glycoprotein ดังนั้นการทำงานของ P- glycoprotein ในเซลล์ Caco-2 จะทำให้ไม่มีการสะสมของ calcein ภายในเซลล์ ในกรณีที่มีตัวยับยั้งการทำงานของ P- glycoprotein ร่วมอยู่ด้วย จะทำให้ปริมาณการสะสมของ calcein ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น

การศึกษาทำโดยนำเซลล์เพาะเลี้ยง Caco2 อายุ 21 วันมาบ่มร่วมกับสารทดสอบจากพืชสมุนไพร (ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการบ่มเซลล์ร่วมกับสารละลายผสมระหว่างสารทดสอบจากพืชสมุนไพรกับ calcein-AM (0.4 μM) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการล้างเซลล์ด้วย ice-cold HBSS เป็นจำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการย่อยเซลล์ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.3 N) ที่มี 1% Triton X-100 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดปริมาณ calcein ด้วยวิธี

fluorescence spectrophotometry (excitation 485 นาโนเมตร และ emission 535 นาโนเมตร) ด้วยเครื่อง microplate reader (Wallac 1420 Perkin-Elmer Victor 3)

ผลการศึกษา

การศึกษานี้แบ่งเป็น 2 ส่วนประกอบด้วย

(1) การทดสอบแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อยืนยันการแสดงออกของ P-glycoprotein ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ใช้ตลอดการศึกษา

(2) การคัดกรองความเข้มข้นของสารสมุนไพรที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

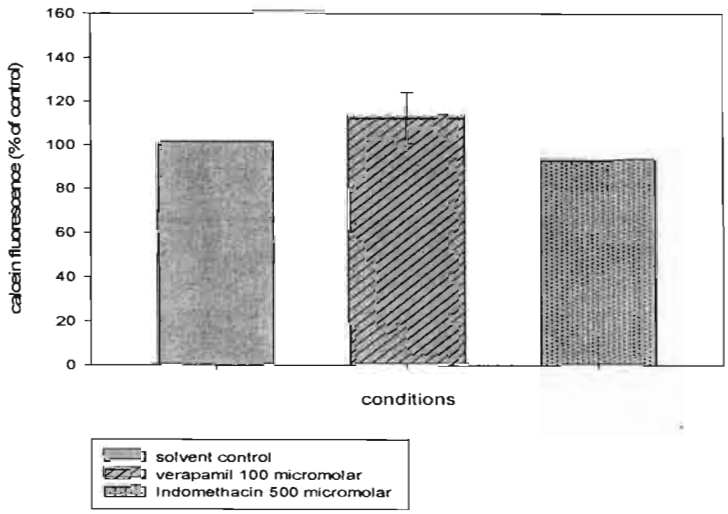
(3) การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการทำงานของ P-glycoprotein

การศึกษาที่ 1. การทดสอบแบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อยืนยันการแสดงออกของ P-glycoprotein ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ใช้ตลอดการศึกษา

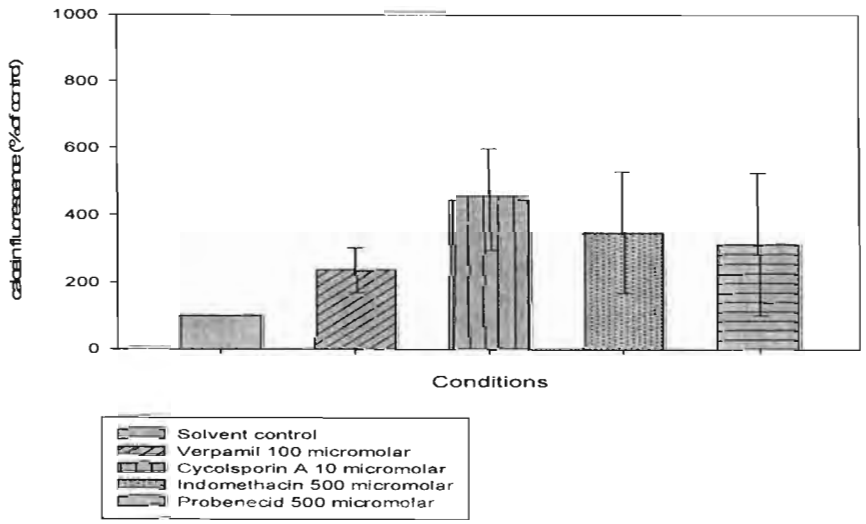
ในการศึกษาจะต้องเชื่อมั่นได้ว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่จะนำมาใช้นั้นเหมาะสม ที่เซลล์จะมีการแสดงออกของ P- glycoprotein ในระดับที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงมีการทดสอบการทำงานของ P-glycoprotein ในแบบจำลองเซลล์ Caco2 ใน 2 สภาวะคือ สภาวะที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ปกติ และสภาวะที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มี vinblastine 10 nM เป็นส่วนผสม (Caco-2-VBL)

ผลการศึกษาในภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่า การสะสมของ calcein ในเซลล์ Caco2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ปกติ ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการบ่มร่วมกับ verapamil (100 μM) หรือ indomethacin (500 μM) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ P- glycoprotein ที่รู้จักกันดี ทั้งนี้ผลดังกล่าวอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุโดยเฉพาะอย่างยิ่งความแปรปรวนของเซลล์เพาะเลี้ยงจากอายุเซลล์ passage number ดังนั้นจึงได้ปรับเปลี่ยนสภาวะการเลี้ยงให้เซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่อาหาร DMEM มี vinblastine (VBL) 10 nM ก่อนที่จะนำมาทำการทดสอบ พบว่าเซลล์มีสะสมของ calcein สูงขึ้นประมาณ 2.3 เท่าเมื่อใช้ verapamil เป็นตัวทดสอบ และการสะสมของ calcein เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ตัวยับยั้งการทำงานของ P-gp อื่นๆ เช่น cyclosporine A, indomethacin, probenecid เป็นต้น (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco2 ในอาหารที่มี vinblastine ทำให้การทำงานของ P- glycoprotein เพิ่มสูงขึ้น

ภาพที่ 1 การสะสมของ calcein ในเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารตามปกติเป็นเวลานาน 21 วัน



ภาพที่ 2 การสะสมของ calcein ในเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี vinbalstine เป็นส่วนผสม เป็นเวลานาน 21 วัน

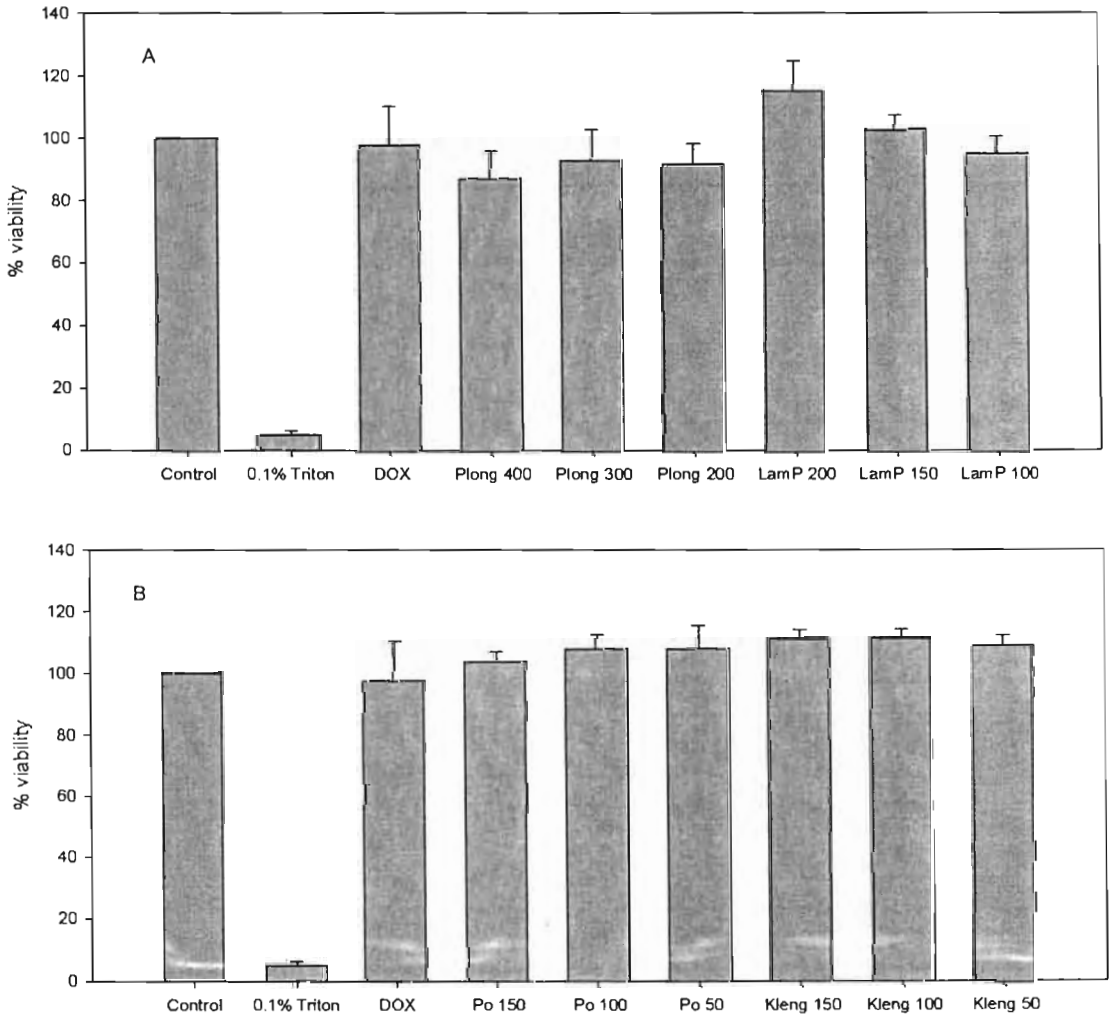


ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบการทำงานของ P-gp ที่แสดงออกใน Caco-2 cells ปกติและ Caco-2 cells ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี 10 nM vinblastine (Caco-2 - VBL cells) พบว่า Caco-2 - VBL cells มีการทำงานของ P- glycoprotein เพิ่มขึ้นในระดับที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแบบจำลองในการประเมินผลของสารต่อการทำงานของ P- glycoprotein ต่อไป

การศึกษาที่ 2. การคัดกรองความเข้มข้นของสารสมุนไพรที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

สารสมุนไพรที่จะนำมาศึกษาผลต่อการทำงานของ P- glycoprotein ในเซลล์ Caco-2 – VBL นั้น จะต้องไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงต้องทำการคัดกรองเบื้องต้นโดยใช้ MTT assay ซึ่งผลการศึกษาพบว่า สารทดสอบทุกตัวในความเข้มข้นสูงสุดที่ละลายได้ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพที่ 3) ในการศึกษานี้ใช้ 0.1% TritonX 100 และ doxorubicin เป็น positive control

ภาพที่ 3 ผลของสารต่อการอยู่รอดของเซลล์ Caco2



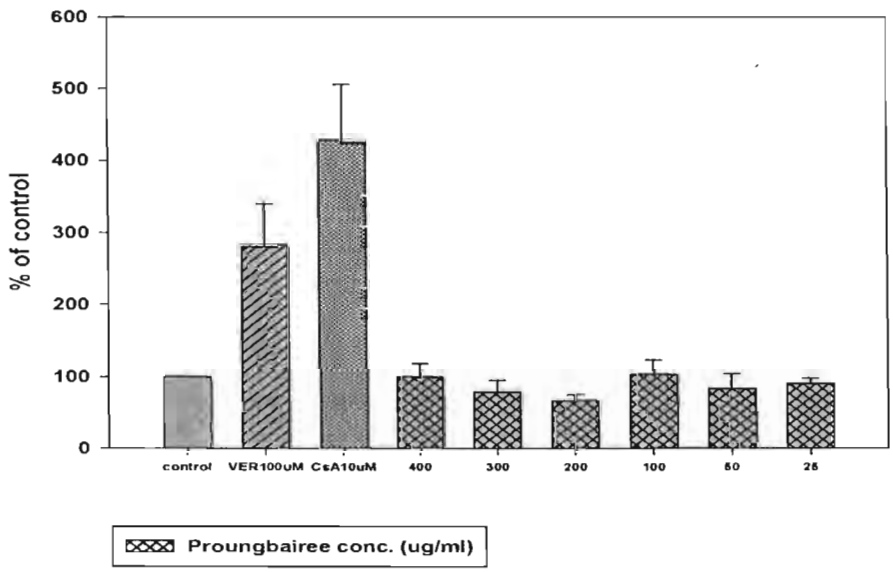
หมายเหตุ (1) Dox = doxorubicin; Plong = พลองใบรี; LamP=ลำป้าง; Po=โพทะเล; Kleng=เขลง

(2) ตัวเลข ระบุความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่น Plong400 หมายถึง พลองใบรีความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การศึกษาที่ 3. ผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการทำงานของ P-glycoprotein

ผลการศึกษาพบว่า พลองใบรี และ ลำป้าง (ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถนำมาทดสอบได้) ไม่มีผลรบกวนการทำงานของ P- glycoprotein (ภาพที่ 4 และ 5) ในขณะที่โพทะเล และเขลง ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา (150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการทำงานของ P- glycoprotein ได้ประมาณ 2-3 เท่า (ภาพที่ 6 และ 7) ทั้งนี้ยังพบว่าผลของพืชทั้ง 2 ชนิดที่มีต่อการทำงานของ P-glycoprotein ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารที่ใช้ทำการทดสอบลดลง ในการศึกษานี้ใช้ verapamil (100 μM) และ/หรือ cyclosporine A (10 μM) เป็น positive control

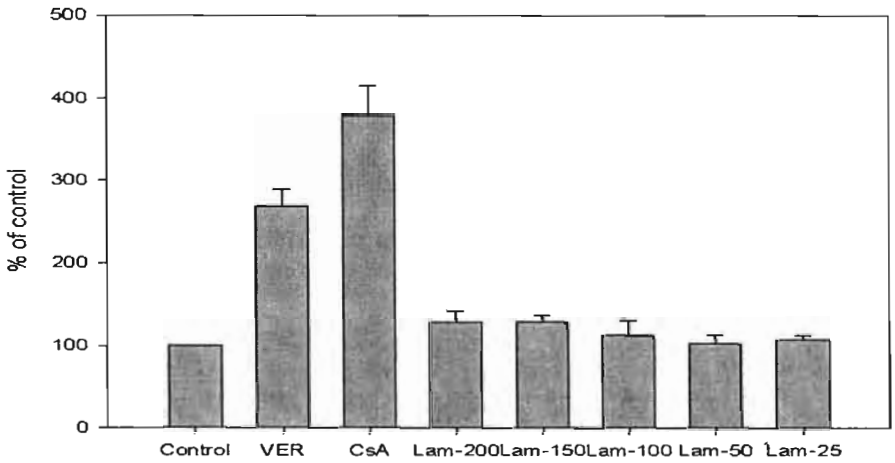
ภาพที่ 4 ผลของพลองใบรีที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein



หมายเหตุ (1) ตัวเลข ระบุความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร

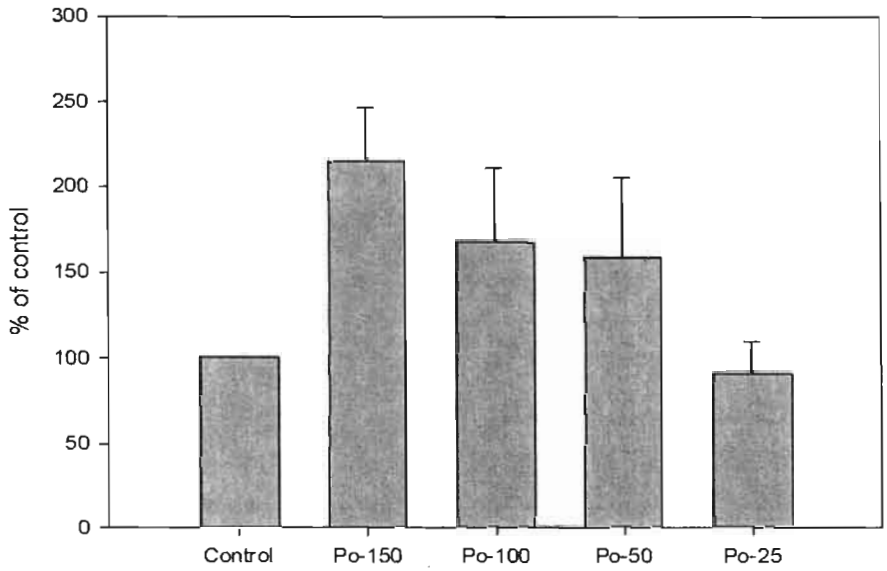
(2) ความเข้มข้นพลองใบรีที่ใช้ 25, 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ภาพที่ 5 ผลของลำป้างที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein



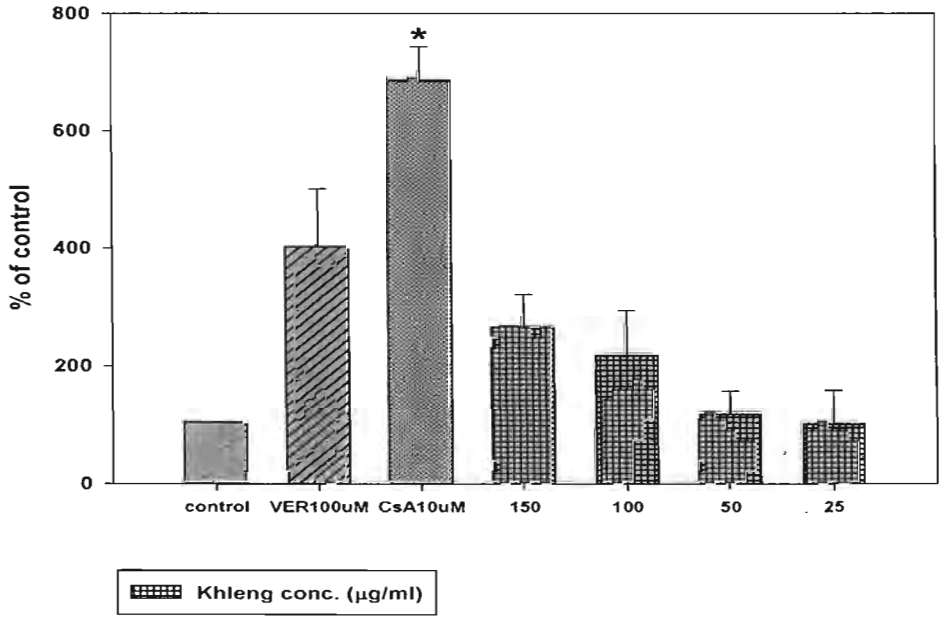
หมายเหตุ (1) ตัวเลข ระบุความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร
(2) ความเข้มข้นลำป้างที่ใช้ 25, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ภาพที่ 6 ผลของโพทะเลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein



หมายเหตุ (1) ตัวเลข ระบุความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร
(2) ความเข้มข้นโพทะเลที่ใช้ 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ภาพที่ 7 ผลของเขลงที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการทำงานของ P-glycoprotein



หมายเหตุ (1) ตัวเลข ระบุความเข้มข้น หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร
(2) ความเข้มข้นเขลงที่ใช้ 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สรุปและวิจารณ์ผล

ปัญหาอันตรกิริยาระหว่างยาเกิดขึ้นได้จากการใช้ยาหรือพืชสมุนไพรหลายชนิดร่วมกัน โดยที่ยาหรือสมุนไพรตัวใดตัวหนึ่งมีผลทำให้การออกฤทธิ์หรือความเป็นพิษของยาอีกตัวเปลี่ยนแปลงไป การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาส่วนหนึ่งเกิดจากการรบกวนการทำงานของตัวขนส่งยาเช่น P-glycoprotein ซึ่งในการศึกษานี้ได้มุ่งเน้นการศึกษาผลของสารสกัดพืช 4 ชนิดได้แก่ พลองใบรี ลำป้าง เขลง และ โพทะเล ต่อการทำงานของ P-glycoprotein ทั้งนี้พืชทั้ง 4 ชนิดถูกคัดเลือกมาเพื่อศึกษาเนื่องจากได้มีข้อมูลเบื้องเกี่ยวกับคุณสมบัติของพืชเหล่านี้ในการยับยั้ง α-glucosidase ทำให้อาจมีประโยชน์ในการพัฒนาต่อเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

การศึกษาได้เลือกใช้แบบจำลองเซลล์เพาะเลี้ยง Caco2 อายุ 21 วัน ซึ่งเป็นแบบจำลองมาตรฐานที่ได้รับความนิยมในการทดสอบการแพร่ผ่านยาและการขนส่งยาโดย P-glycoprotein (Artursson et al., 2001; Wahlang et al., 2009). เนื่องจากเซลล์ชนิดดังกล่าวเป็น epithelial human colon adenocarcinoma cell line ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมจะเปลี่ยนแปลงเป็น enterocyte และมีการแสดงออกของตัวขนส่งยาชนิดต่างๆ รวมถึง P-glycoprotein อีกด้วย ซึ่งในการศึกษานี้ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวให้มีการแสดงออกของ P-glycoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายตามที่มีรายงานการศึกษา รวมทั้งได้ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี vinblastine เป็นส่วนผสม ทำให้แบบจำลองการศึกษาเซลล์ Caco2 ที่ใช้นี้ มีระดับการทำงานของ P-glycoprotein ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ โดยในการศึกษานี้ได้ยืนยันถึงการมีอยู่ของ P-glycoprotein ด้วย positive control เช่น verapamil และ cyclosporine A

ผลการศึกษาสารสกัดพืช 4 ชนิด พบว่าพลองใบรี และ ลำป้างไม่มีผลรบกวนการทำงานของ P-glycoprotein แต่อย่างใด ในขณะที่ โพทะเล และเขลงสามารถยับยั้งการทำงานของ P- glycoprotein ได้ประมาณ 2-3 เท่า ซึ่งน้อยกว่า verapamil และ cyclosporine A (ยาที่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein) อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบผลกับ verapamil และ cyclosporine A ยังไม่เหมาะสมนัก เนื่องจากสารสกัดพืชมีสารสำคัญหลายชนิดและไม่อาจคำนวณหรือทราบถึงความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ได้อย่างแน่นอน

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการนำโพทะเลและเขลงมาใช้อาจทำให้เกิดปัญหาอันตรกิริยาระหว่างยาจากคุณสมบัติในการยับยั้งการทำหน้าที่ของ P- glycoprotein ซึ่งยังคงต้องศึกษาผลกระทบในด้านดังกล่าวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Artursson, P, Palma, K, Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport . Advanced Drug Delivery Reviews 46: 27-43.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. (1987). Expression of a multidrug - resistance gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci USA 84: 265-269.

Foster, BC, Foster, MS, Vandenhoek S, Krantis A, Budzinski JW, Arnason JT, Gallicano KD, Choudri S. (2001). An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. J Pharm Pharmceutic Sci 4(2):176-184.

Fromm MF. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. (2003). Eur J Clin Invest 33: 6-9.

Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood - tissue barriers. (2004). Trends Pharmacol Sci 25: 423-429.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. (2002). Multidrug resistance in cancer: Role of ATP - dependent transporters. Nat Rev Cancer 2: 48-58 .

Konishi T, Satsu H, Hatsugai Y, Aizawa K, Inakuma T, Nagata S. (2004). A bitter melon extract inhibits the P-glycoprotein activity in intestinal Caco - 2 cells: Monoglyceride as an active compound. Biofactors 22: 71-74 .

Leite DFP, Kassuya CAL, Mazzuco TL, Silvestre A, De MLV, Rehder VLG, Rumjanek VM, Calixto JB. (2006). The cytotoxic effect and the Multidrug Resistance Reversing Action of Lignans from Phyllanthus amarus. Planta Med 72: 1353-1358.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. (2005). Multidrug resistance proteins: Role of P - glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol Appl Pharmacol 204: 216-237.

Riley, RJ, and Grime, K. (2004). Metabolic screening in vitro: metabolic stability, CYP inhibition and induction. Drug Discov Today 1(4):365-372.

Rodrigues, AD. (1994). Use of in vitro human metabolism studies in drug development. Biochem Pharmacol. 48(12):2147-2156.

Thuerauf N and Fromm MF. (2006). The role of the transporter P - glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 256: 281-286.

Varma, MV, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R (2003). P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. Pharmacol Res 48:347-359.

Wahlang, B, Patil, SR, Pawar, YB, Bansal, AK. (2009). The Caco-2 Cell Model: A Useful Tool in Drug Discovery and Development. Current Research & Information on Pharmaceuticals Sciences 10: 29-34.

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	ภบ.	เภสัชศาสตร์	2529
The University of Michigan, Ann Arbor	M.S.	Toxicology	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.

I20901758

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)