อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ RX-AR-032/2552

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสมุนไพรไทย ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 29 ส.ค. 2554
เลขทะเบียน.....
เลขเรียกหนังสือ.....

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ คณะเภสัชศาสตร์
2. รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์ คณะเภสัชศาสตร์

RM
จ 666
.H33
น4315
2551

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

มีพืชในประเทศไทยหลายชนิดทั้งที่เป็นพืชที่ใช้เป็นสมุนไพร อาหารหรือเครื่องเทศ ที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลการศึกษาจากการทดลองในสัตว์ทดลอง โดยกลไกการออกฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลของพืชเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน โครงการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการลดโคเลสเตอรอลของพืชจำนวน 12 ชนิด ซึ่งเป็นกลุ่มพืชที่มีการใช้เป็นสมุนไพร เครื่องเทศ เครื่องดื่ม รวมทั้งพืชที่ใช้เป็นส่วนประกอบในปรุงอาหารไทย โดยทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการดูดซึมของโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงโดยติดตามโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์หลายอย่าง ซึ่งความแรงหรือความสามารถในแต่ละกลไกของสารสกัดนั้นๆมีความแตกต่างกันออกไป สารสกัดจากพริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมของโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่นๆ ส่วนสารสกัดจากข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) และชา (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ดี สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.) ใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) และยอดฟักทอง (*Cucurbita moschata* Duchesne) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้ดี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า พืชไทยเหล่านี้ ซึ่งเป็นพืชที่สามารถใช้รับประทานเป็นอาหารได้ มีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลายหลาย และกลไกเหล่านี้อาจเป็นคำอธิบายถึงการออกฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของสัตว์ทดลองได้ นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จะเป็นหลักฐานที่จะช่วยในการสนับสนุนการรับประทานพืชเหล่านี้เพื่อเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ และในอนาคตอาจมีการต่อยอดพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหรือยาที่ใช้ในการควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้

Abstract

Several Thai spices/dietary plants were previously demonstrated the hypocholesterolemic effects. These studies were mostly conducted in animal models in which the mechanisms of action were not yet well established. Therefore, the present study was aimed to investigate the potential mechanism of hypocholesterolemic action of twelve selected plants wildly used as spices and ingredients in various types of Thai food. The effect on cholesterol absorption was determined by monitoring the uptake of radiolabeled cholesterol into differentiated Caco-2 cells. The effects of plant extracts on lipid digestion and cholesterol biosynthesis were examined by measuring enzymatic inhibitory activities on pancreatic lipase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase), respectively. This study demonstrated that several of the tested plants possessed multiple sites of action that were possibly responsible for their cholesterol lowering effect in the *in vivo* model. The extract of *Piper nigrum* L. was found to be the most effective agent as cholesterol absorption inhibitor by blocking the uptake of radiolabeled cholesterol into differentiated Caco-2 cells. The extract of *Alpinia galanga* (L.) Willd. and *Camellia sinensis* (L.) Kuntze effectively inhibited pancreatic lipase activity whereas those of *Hibiscus sabdariffa* L., *Moringa oleifera* Lam. and *Cucurbita moschata* Duchesne were acting similarly to statins to inhibit HMG-CoA reductase and possibly reduce cholesterol biosynthesis. These potential mechanisms of hypocholesterolemic action of the selected Thai plants could contribute to their use as healthy diets and moreover be developed as dietary supplements, nutraceutical products or therapeutic agents for cholesterol lowering purpose

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ภาวะโรคหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis) เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเป็นโรคหัวใจขาดเลือด (Ischemic Heart Disease) และโรคหลอดเลือดของสมอง (Cerebrovascular Disease) ภาวะโรคหลอดเลือดแข็ง เกิดขึ้นเนื่องจากมีการคั่งของไขมันในผนังหลอดเลือด ไขมันที่คั่งนี้ส่วนใหญ่เป็นโคเลสเตอรอล (Cholesterol) การลดระดับของโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง ปัจจุบัน มียาหลายชนิดที่มีฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด โดยยาที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน คือ ยาในกลุ่ม statin ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลที่ตับ อย่างไรก็ตาม พบว่า มีผู้ป่วยบางส่วนไม่ตอบสนองต่อการใช้ยาเพียงชนิดเดียว การใช้ combination drug therapy พบว่ามีประสิทธิภาพในผู้ที่ monotherapy ใช้ไม่ได้ผลดี ซึ่งพบว่าการใช้ยา statin ร่วมกับยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากทางเดินอาหารและลดการสะสมของโคเลสเตอรอลภายในเซลล์ จะสามารถลดการเกิดภาวะของโรคหลอดเลือดและหัวใจได้ นอกจากนี้ การใช้ยาที่ออกฤทธิ์ต่างกันร่วมกัน ก็เพื่อให้เสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน จึงสามารถลดขนาด (dose) และอาการข้างเคียงของยาแต่ละชนิดได้ นอกเหนือจากการใช้ยาลดระดับโคเลสเตอรอล การควบคุมอาหารหรือการเปลี่ยนพฤติกรรมการรับประทานอาหาร ก็เป็นวิธีการที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะในผู้ที่ระดับโคเลสเตอรอลไม่สูงมากนัก หรือในผู้ที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ ต่อภาวะการเกิดโรคของระบบหลอดเลือดและหัวใจ โดยทานอาหารที่มีโคเลสเตอรอลต่ำร่วมกับผักผลไม้ ซึ่งสารจากธรรมชาติ เช่น สารกลุ่ม phytosterol ที่เป็น sterol จากพืช พบว่าสามารถลดการดูดซึมของโคเลสเตอรอลในทางเดินอาหารได้ โดยออกฤทธิ์แย่งที่กับโคเลสเตอรอลในการดูดซึมที่ผนังของลำไส้ อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการรับประทานอาหารของมนุษย์ ทำได้ไม่ง่ายนัก เพราะต้องปฏิบัติติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง คณะผู้วิจัยจึงต้องการทำการศึกษาเพื่อค้นหาสารจากธรรมชาติ โดยเฉพาะจากพืชสมุนไพรที่พบมากในประเทศไทยที่อาจมีฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล

ในปัจจุบัน มียาหลายชนิดที่มีฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด แต่ยาที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน คือ ยาในกลุ่ม statin ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล โดยยับยั้งการทำงานของ 3-hydroxy-3-methyglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase อย่างไรก็ตาม พบว่า มีผู้ป่วยประมาณหนึ่งในสามไม่ตอบสนองต่อการใช้ยา จึงมีการใช้ยาอื่นร่วมกับ statin เช่น ezetimibe หรือ niacin การใช้ combination drug therapy พบว่ามีประสิทธิภาพในผู้ที่ monotherapy ใช้ไม่ได้ผลดี นอกจากนี้ การใช้ยาที่ออกฤทธิ์ต่างกันร่วมกัน ก็เพื่อให้เสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน จึงสามารถลดขนาด (dose) และอาการข้างเคียงของยาแต่ละชนิดได้ (Sampalis et al., 2007; Schmitz et al., 2007) ยาลดโคเลสเตอรอลกลุ่มใหม่ๆ ที่ค้นพบ เช่น ezetimibe ซึ่งออกฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากทางเดินอาหาร โดยยับยั้งการทำงานของ Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1) ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ (Davis and Veltri, 2007) มีรายงาน พบว่าการใช้ ezetimibe ร่วมกับยากลุ่ม statin จะสามารถลดการเกิดภาวะของโรคหลอดเลือดและหัวใจได้ (Sampalis, et al., 2007)

โครงการวิจัยนี้ ได้ทำการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลของสารสกัดจากพืชโดยเฉพาะพืชที่ใช้เป็นอาหารและเครื่องเทศ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถลดไขมันและ/หรือโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลอง (ตารางที่ 1) แต่กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่มีทราบแน่ชัด โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการทดสอบกลไกต่างๆ ได้แก่ กลไกที่เกี่ยวกับการดูดซึมโคเลสเตอรอล โดยทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ และทำการทดสอบผลของสารสกัดในการยับยั้งการทดงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยไขมันในระบบทางเดินอาหาร ถึงแม้ว่า pancreatic lipase จะทำหน้าที่ย่อยไขมัน triglyceride โดยตรง แต่ก็มีรายงานว่าเอนไซม์นี้มี

ความสำคัญต่อการดูดซึมของโคเลสเตอรอลผ่านเซลล์ของผนังลำไส้เล็กในทางเดินอาหาร (Young & Hui, 1999). โดยมีผลต่อการ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล โดย HMG-CoA reductase จะเปลี่ยน HMG-CoA ไปเป็น mevalonate ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (Grigore et al., 2008) ซึ่งผลของสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ยังมีการรายงานค่อนข้างจำกัด

โครงการวิจัยนี้ในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยเสนอที่จะทำการทดสอบสารสกัดจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ ขิง ดีปลี หม่อน และพรมมิ ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีแนวโน้มที่น่าจะมีฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอล แต่จากการค้นหาข้อมูลเพิ่มเติม พบว่ายังมีพืชอีกหลายชนิดที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาวิจัย จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยรวมเป็นพืชสมุนไพรทั้งหมด 12 ชนิด (ตารางที่ 1) ซึ่งสมุนไพรบางชนิดได้มีการศึกษาและรายงานฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลในเลือดของสัตว์ทดลองมาแล้ว แต่ยังขาดข้อมูลของกลไกการออกฤทธิ์ที่ชัดเจน

วัตถุประสงค์

1 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลโดยทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงลำไส้

2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งการย่อยไขมันโดยวัดผลต่อการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase

3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลโดยวัดผลต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยเสนอที่จะทำการทดสอบสารสกัดจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ ขิง ดีปลี หม่อน และพรมมิ ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีแนวโน้มที่น่าจะมีฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอล ซึ่งสมุนไพรบางชนิดได้มีการศึกษาฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลบ้างแล้ว แต่ยังขาดข้อมูลถึงกลไกการออกฤทธิ์ แต่จากการค้นหาข้อมูลเพิ่มเติม พบว่ายังมีพืชอีกหลายชนิดที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาวิจัย จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยรวมเป็นพืชสมุนไพรทั้งหมด 12 ชนิด

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง (Caco2 cells) จึงสามารถใช้ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรหลากหลายชนิด ฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมของโคเลสเตอรอล เป็นการทดสอบโดยใช้เทคนิคของสารกัมมันตรังสีที่ติดฉลากอยู่กับโมเลกุลของโคเลสเตอรอล

นอกจากนี้ โครงการวิจัยนี้จำเป็นต้องทำการปรับระเบียบวิธีการวิจัย เนื่องจากวิธีการทดลองที่ได้วางแผนไว้ในเบื้องต้นไม่สามารถดำเนินการได้จริง โดยได้เปลี่ยนการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ acyl-CoA: cholesterol acyltransferase enzyme (ACAT) ไปเป็นทดสอบการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และ 3-hydroxy-3-methyglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase เนื่องจาก radioactive substrate ([^{3}H]stearoyl-CoA) สำหรับ ACAT มีราคาสูงมาก (มากกว่า 100,000 บาท) ส่วน substrate อื่นที่อาจนำมาใช้ได้ เป็น [^{14}C] isotope ซึ่งไม่อนุญาตให้ใช้ได้ ณ ห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องทำการปรับเปลี่ยนเป็นการทดสอบ เอนไซม์ pancreatic lipase และ HMG-CoA reductase ซึ่งมีความสำคัญต่อ cholesterol homeostasis เช่นกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ได้แจ้งไว้แล้วในรายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

อุปกรณ์และสารเคมี (Materials)

Pancreatic lipase (type II, from porcine pancreas), orlistat สารเคมีอื่นๆ ซื้อจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) Fetal bovine serum (FBS) ซื้อจาก Gibco, 4-Methylumbelliferyl oleate ซื้อจาก Fluka

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

สารสกัดสมุนไพรบางส่วน เช่น ขิง หม่อน พรมมิ ดีปลี และพริกไทย ได้รับจาก Bioscreening Unit คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดย รศ.ดร. กรกนก อิงคนินันท์ ส่วนสมุนไพร เช่น กระเจี๊ยบ มะรุม ฟักทอง สับปะรด ข่า ขมิ้นอ้อย และชา ได้รับจากสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิตติ์ จังหวัดเชียงใหม่ ในการเตรียมสารสกัด ขั้นตอนแรกล้างสมุนไพรโดยเปิดให้น้ำไหลผ่าน นำไปอบให้แห้งในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และทำการตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ตามด้วยการบดด้วยเครื่อง และอบให้แห้งในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2-3 วัน ขั้นตอนต่อไปนำไปหมักด้วย 95% methanol เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองและนำส่วนของเหลวไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotavapor ที่อุณหภูมิ 55-60 °C สารสกัดสมุนไพรถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ-20 °C

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ Caco-2 cells

เซลล์ Caco-2 cells ได้รับจาก American Type Culture Collection (ATCC) เซลล์ถูกเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ1% penicillin–streptomycin เซลล์ถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่ 95% ความชื้นของอากาศ 5% CO_2 และที่อุณหภูมิ 37 °C เซลล์เจริญใน 75 cm^2 flask และเลี้ยงใน 96-well plates เพื่อทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ หรือเลี้ยงใน 24-well plates เพื่อทดสอบการนำเข้าของโคเลสเตอรอล

2.3 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

การมีชีวิตของเซลล์ถูกวัดโดยใช้วิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide) ในเซลล์ที่มีชีวิต สาร MTT ที่มีสีเหลืองจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร formazan ที่มีสีม่วง โดยเอนไซม์ mitochondria dehydrogenases ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer) ปริมาณของ formazan จะเป็นสัดส่วนเดียวกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ถูกเลี้ยงใน 96-well plates และบ่มกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น100 µg/ml เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สารละลาย MTT ถูกเติมเข้าไปในเซลล์ที่มีอาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนครบเวลาบ่ม หลังจากนั้นเอาอาหารออก และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO:ETOH (1:1 v/v) และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

2.4 การเตรียมโคเลสเตอรอลไมเซลล์ (Cholesterol micelles preparation)

วิธีการเตรียมโคเลสเตอรอลไมเซลล์ (cholesterol micelles) ถูกปรับจาก Yamanashi, Y และคณะ (Yamanashi et al., 2007) โดยเตรียมสารละลาย [1α,2α(n)-^{3}H] cholesterol, cholesterol และ phosphatidylcholine ใน chloroform ส่วนสารละลาย sodium taurocholate ถูกเตรียมใน methanol นำสารละลายของไขมันและเกลือน้ำดีผสมรวมให้เข้ากัน และนำไประเหยแห้งภายใต้ N_2 gas แผ่นฟิล์มที่ได้ จะถูกเก็บไว้ภายใต้ N_2 gas ที่ -20 °C จนกระทั่งใช้ ก่อนใช้ นำแผ่นฟิล์มมาละลายในอาหารสูตร DMEM/F12 จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 µM cholesterol, 2 mM sodium taurocholate, 50 µM phosphatidylcholine และ 1 µCi/ml [1α,2α(n)-

^{3}H]cholesterol จากนั้นนำ cholesterol micelles ไป sonicate แล้วกรองผ่าน 0.2-μm และเก็บที่ 37 °C ก่อนนำไปใช้กับเซลล์

2.5 วิธีการวัดการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 cell ใน 24 well plate ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/well เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 14 วัน จะได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์เยื่อบุลำไส้ ในช่วงนี้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน หลังจาก 14 วัน เซลล์ถูกบ่มด้วย อาหารที่ไม่มี FBS 1 คืน จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร หรือ ezetimibe เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการให้cholesterol micelle เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำอาหารออก ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น 2 ครั้ง และทำให้เซลล์แตกด้วย 0.2 N NaOH และ 0.1 % Triton-X 100 นำ cell lysate ส่วนหนึ่งไปเติม scintillation cocktail (MicroScint™-20, PerkinElmer) เพื่อวัดระดับของโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารรังสี (radio-labeled cholesterol) ด้วยเครื่อง Packard β-counter ส่วน cell lysate อีกส่วนนำไปวัดหาความเข้มข้นของโปรตีน

2.6 วิธีวัดการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase

การทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ถูกวัดโดยใช้ 4-methylumbelliferyl oleate (4-MU oleate) เป็นสารตั้งต้น (Nakai et al., 2005) 25 μl ของสารสกัดสมุนไพร (ละลายใน 1% DMSO) หรือ Oristat (Oristat ใช้เป็น positive control ของการทดลอง) และ10 μl ของ 1 mM 4-MU (ละลายใน DMSO) ถูกนำมารวมกับ 40 μl ของ buffer ที่ประกอบด้วย 13 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, และ 1.3 mM CaCl2 (pH 8.0) ใน 96-well plates และ 25 μl ของ และสารละลายเอนไซม์ lipase (50 U/ml) ถูกเติมเพื่อเริ่มปฏิกิริยา หลังจากนั้นบ่มไว้ที่ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที ปริมาณการหลั่งของ 4-methylumbelliferone ถูกวัดโดย fluorometrical microplate reader ที่ Ex 360 nm และ Em 535 nm

2.7 วิธีวัดการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

การทำงานของเอนไซม์ 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) ถูกวัดโดยใช้ HMG-CoA reductase Assay kit (Sigma) HMG-CoA ถูกใช้เป็นสารตั้งต้น ส่วนการลดลงของ NADPH ถูกประเมิน โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm และอุณหภูมิ 37 °C โดยวัดเป็น kinetic

2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองถูกแสดงในรูป Mean±SEM ข้อมูลการทดลองถูกวิเคราะห์โดยใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p \leq 0.05$ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}) คำนวณโดยใช้ Prism program (GraphPad Software Inc)

บทที่ 3

ผลการทดลอง (Results)

ก่อนที่จะศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรหรือสารใดๆ ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล จำเป็นต้องทดสอบเบื้องต้นถึงผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของ Caco-2 cells โดยทำการทดสอบ cell viability test ก่อน เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ หรือมีผลต่อเซลล์น้อย ในการทดลองนี้ ได้ใช้วิธี MTT assay เพื่อทดสอบ cell viability

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2

ในการทดลองนี้ ได้ใช้วิธี MTT assay เพื่อทดสอบ cell viability โดยโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพร 12 ชนิด การทดสอบ cell viability โดยใช้เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงที่มีอายุ 24 ชั่วโมง และให้สารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มากนัก โดย cell viability มีค่ามากกว่า 80 % ยกเว้นกระเจี๊ยบ (*H. sabdariffa*) และ พรมมิ (*B. monnieri*) ที่มีค่า cell viability 72.23±2.23 และ 78.36±10.58 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ในขณะที่สารสกัดจากหม่อน มีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์เล็กน้อย (cell viability 118.78±2.74 %) จากผลการทดลองนี้ แม้ว่าสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 µg/ml จะ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เล็กน้อย แต่คาดว่าความเข้มข้นนี้จะไม่มีผลต่อเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ เนื่องจากเซลล์ที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ จะใช้เซลล์ที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ ที่มีความหนาแน่นสูงและเปลี่ยนสภาพไปเป็นชั้นของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ของผนังลำไส้ (differentiated Caco-2 cell) ซึ่งชั้นของเซลล์นี้จะมีความคงทนต่อสารต่างๆ มากกว่า แต่ไม่เหมาะสมในการนำมาทดสอบ cell viability เพราะมีความหนาแน่นของเซลล์มาก จึงอาจไม่สามารถบอกความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ในขนาดต่ำๆ ได้ ดังนั้น สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 µg/ml จึงคาดว่าจะไม่มีผลต่อเซลล์ differentiated Caco-2 cell ซึ่งจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็พบว่าสารสกัดของสมุนไพรทุกชนิดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อเซลล์

ตารางที่ 1 รายชื่อสมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษา

Scientific name	Family name	Common name	Model	Part	Effect	References
Hibiscus sabdariffa L.	Malvaceae	Roselle (กระเจี๊ยบ)	Rat	Calyx	↓TC, TG, LDL	(Hirunpanich et al., 2006)
Moringa oleifera Lam.	Moringaceae	Horse radish tree (มะรุม)	Rabbit	Leaves	↓TC	(Chumark et al., 2008)
Cucurbita moschata Duchesne	Cucurbitaceae	Pumpkin(ฟักทอง)	Mice	Stem	↓TC, TG	(Choi et al., 2007)
Ananas comosus (L.) Merr.	Bromeliaceae	Pineapple(สับปะรด)	Mice	Leaves	↓TC	(Xie et al., 2007)
Zingiber officinale	Zingiberaceae	Ginger (ขิง)	Rabbit	Rhizome	↓TC, TG, LDL, VLDL, PL	(Bhandari et al., 1998)
Morus alba L.	Moraceae	Mulberry (หม่อน)	Rabbit	Fruits	↓TC, TG, LDL,	(Chen et al., 2005)
			Rat	Root bark	↓TC, TG, LDL, VLDL	(El-Beshbishy et al., 2006)
Camellia sinensis (L.) Kuntze	Theaceae	Tea (ชา)	Mice	Leaves	↓TC	(Han et al., 2001)
Piper nigrum L.	Piperaceae	Pepper (พริกไทยดำ)	npr	Fruits	npr	
Alpinia galanga (L.) Willd.	Zingiberaceae	Galangal (ข่า)	npr	Rhizome	npr	
Curcuma zedoaria Rose	Zingiberaceae	Zedoary, Luya-Luyahan (ขมิ้นอ้อย)	npr	Rhizome	npr	
Bacopa monnieri (L.) Wettst.	Scrophulariaceae	Brahmi (พรมมิ)	npr	Stem	npr	
Piper retrofractum Vahl.	Piperaceae	Long pepper (ดีปลี)	npr	Fruits	npr	

Note: total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), phospholipids (PL), no published report (npr)

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2

Common name	Cell viability (%)
Control	91.40 ± 1.99
Mulberry	118.78 ± 2.74
Ginger	106.97 ± 1.80
Long pepper	105.13 ± 3.94
Tea	95.01 ± 4.26
Horse radish tree	91.58 ± 6.03
Zedoary, Luya-Luyahan	88.36 ± 14.75
Pepper	86.75 ± 12.47
Pineapple	84.03 ± 1.87
Pumpkin	83.68 ± 2.61
Galangal	82.74 ± 3.15
Brahmi	78.36 ± 10.58
Roselle	72.23 ± 2.23

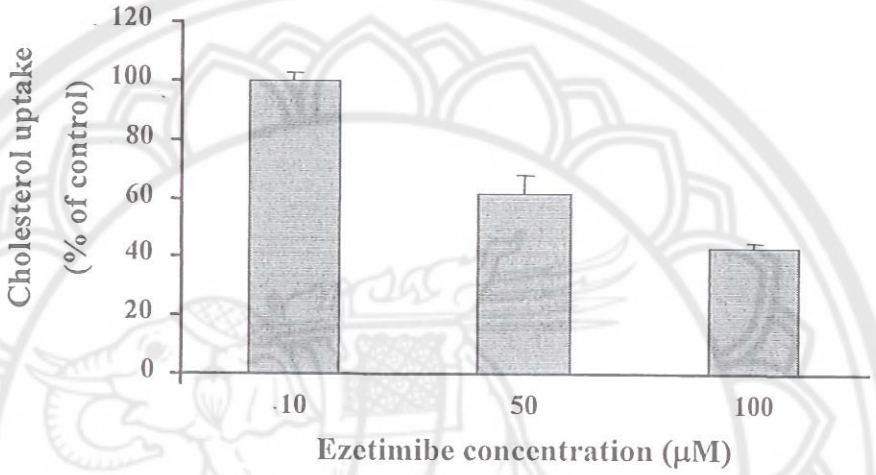
Control คือ เซลล์ที่ให้ 0.1% DMSO ซึ่งใช้ในการละลายสารสกัดสมุนไพร

ผลการทดลองแสดงค่า Mean ± SEM จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2

การดูดซึมของโคเลสเตอรอล ถูกวัดโดยการประเมินระดับของโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารรังสี ([1α2α(n)-^{3}H]cholesterol) ที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของ cholesterol micelle และทำการคำนวณปริมาณสารรังสีต่อความเข้มข้นของโปรตีนจาก cell homogenate ในการศึกษานี้ ใช้ ezetimibe เป็น positive control ของการทดลอง ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า ezetimibe มีฤทธิ์ในการไปยับยั้งการดูดซึมของโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ ซึ่งผลการทดลองนี้ พบว่าการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงมีค่าลดลงประมาณ 60 % หลังจากที่ให้ ezetimibe ที่ความเข้มข้น 100 μM (รูปที่ 1) ผู้วิจัยได้ทดสอบ ezetimibe ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่พบว่าความสามารถในการยับยั้งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ไม่เพิ่มขึ้น

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร พบว่า สารสกัดสมุนไพร 12 ชนิด (100 μg/ml) สามารถยับยั้งการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้ในระดับที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3) ซึ่งสารสกัดพริกไทยแสดงการยับยั้งการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรตัวอื่นๆ จากการศึกษานี้ พบว่าสารสกัดขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*) และ กระเจี๊ยบมีฤทธิ์ในการยับยั้งนำเข้าของโคเลสเตอรอลน้อยมาก การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรหลายชนิดสามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ได้ แม้จะไม่มากนัก จากผลดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าการรับประทานสมุนไพรเหล่านี้ อาจจะมีผลต่อการนำและการดูดซึมโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ได้ด้วย



รูปที่ 1 แสดงฤทธิ์ของ ezetimibe ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 ที่มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ลำไส้เล็ก โดยเลี้ยงเซลล์กับ ezetimibe เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ก่อนวัดระดับของโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารรังสีที่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ ผลการทดลองแสดงค่า Mean ± SEM จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate)

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2

Common name	[^{3}H]-cholesterol uptake (% of control)
Control	98.99 ± 1.83
Pepper	57.76 ± 4.49*
Tea	64.82 ± 4.47*
Galangal	69.15 ± 4.34*
Long pepper	71.12 ± 7.68*
Horse radish tree	75.95 ± 2.11*
Mulberry	76.10 ± 3.98*
Pineapple	79.62 ± 7.90
Pumpkin	80.27 ± 7.83
Brahmi	82.20 ± 0.94
Ginger	84.63 ± 8.98
Zedoary, Luya-Luyahan	91.79 ± 0.48
Roselle	94.11 ± 4.57
Ezetimibe	43.18 ± 2.78

Control คือ เซลล์ที่ให้ 0.1% DMSO ซึ่งใช้ในการละลายสารสกัดสมุนไพร ผลการทดลองแสดงค่า Mean ± SEM จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำ 2 ครั้ง (duplicate)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหารไขมัน เป็นกลไกหนึ่งที่อาจมีผลในการลดระดับของไขมันในเลือด ในการทดลองนี้แสดงถึงผลของสารสกัดสมุนไพร ต่อการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้แบบ dose-dependent ซึ่งสามารถคำนวณค่าในรูปของ 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) หรือ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ 50% ดังแสดงในตารางที่ 4 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากหัวข่า (*A. galangal*) มีความแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด โดย (IC_{50} = 8.99±3.41 µg/ml) ส่วนสารสกัดใบหม่อน (*M. alba*) มีความแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น้อยที่สุด (IC_{50} = 244.94±83.96 µg/ml) อย่างไรก็ตาม สารสกัดสมุนไพรมีความแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น้อยกว่า orlistat มาก ซึ่ง oristat เป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase โดยสามารถยับยั้งการย่อยและดูดซึมอาหารไขมันภายในลำไส้เล็กได้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่ มีแนวโน้มที่จะมีผลรบกวนการย่อยอาหารไขมันในทางเดินอาหาร ซึ่งผลที่ตามมาอาจส่งผลให้มีการลดลงของการดูดซึมโคเลสเตอรอล และเป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase

Common name	IC_{50} values (µg/ml)
Galangal	8.99 ± 3.41
Zedoary, Luya-Luyahan	12.36 ± 1.23
Tea	25.22 ± 6.73
Ginger	35.25 ± 13.18
Brahmi	43.26 ± 12.17
Horse radish tree	56.81 ± 5.95
Pepper	68.27 ± 25.42
Long pepper	95.00 ± 23.72
Roselle	121.44 ± 28.41
Pineapple	122.9 ± 24.23
Pumpkin	189.5 ± 8.89
Mulberry	244.94 ± 83.96
Orlistat	0.32 ± 0.14 ng/ml

IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50% ผลการทดลองแสดงค่า Mean ± SEM จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

นอกจากทดลองผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ผู้วิจัยยังได้ทดสอบผลของสมุนไพรดังกล่าวต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ด้วย ซึ่ง HMG-CoA reductase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล และเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม statins อย่างเช่น pravastatin ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิด (100 µg/ml) สามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ได้ แต่ด้วยความแรงที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) สารสกัดจากใบมะรุม (*M. oleifera*) ยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ได้สมบูรณ์เหมือนกับ pravastatin ซึ่งใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้ แม้ว่าสารสกัดข่ามีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรตัวอื่นๆ แต่ก็ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้พอสมควร (53.08±2.20% inhibition) ถึงแม้ว่าการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายนอกร่างกาย (*in vitro*) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจจะเหมือนหรือแตกต่างจากการทดลองในร่างกายสัตว์ทดลองหรือมนุษย์ แต่อย่างน้อยผลการศึกษานี้ ก็แสดงให้เห็นถึงกลไกที่อาจเป็นไปได้ของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการลดระดับของโคเลสเตอรอล โดยผ่านการยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

Common name	Inhibition of HMG-CoA reductase activities (%)
Horse radish tree	106.46 ± 3.70
Roselle	94.91 ± 11.86
Pumpkin	92.60 ± 10.17
Ginger	77.44 ± 1.80
Pepper	77.12 ± 15.89
Zedoary, Luya-Luyahan	76.59 ± 0.32
Pineapple	74.36 ± 15.26
Brahmi	65.27 ± 7.01
Mulberry	64.57 ± 5.97
Long pepper	59.52 ± 13.57
Tea	53.62 ± 2.74
Galangal	53.09 ± 2.21
Pravastatin	101.92 ± 6.13

ผลการทดลองแสดงค่า Mean ± SEM ของ 2 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate)

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง (Conclusion & Discussion)

อภิปรายผล

ในการศึกษานี้ พบว่าพืชบางชนิด เช่น ข่า ขมิ้นอ้อย ชา และ ขิง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจไม่มากเท่ากับยา orlistat แต่ค่า IC_{50} ก็ต่ำพอสมควร ($\leq$ 30 µg/ml) (ตารางที่ 4) ซึ่งพืชเหล่านี้ใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหารไทยอยู่แล้ว ดังนั้นการกินอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชเหล่านี้ก็น่าจะส่งผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งอาจทำให้ลดการย่อยและดูดซึมไขมันได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารจำพวก polyphenols และ saponins ที่ได้จากชา สามารถ ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ (Han et al., 2001; Nakai et al., 2005) ถึงแม้ว่า pancreatic lipase จะทำหน้าที่ย่อยไขมัน triglyceride โดยตรง แต่ก็มีรายงานว่าเอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อการดูดซึมของโคเลสเตอรอลผ่านเซลล์ของผนังลำไส้เล็กในทางเดินอาหาร (Young and Hui, 1999) หนูทดลองที่สร้าง pancreatic lipase ไม่ได้ พบว่าหนูเหล่านี้มีการดูดซึมของโคเลสเตอรอลจากอาหารลดลง (Huggins et al., 2003) เนื่องด้วยเอนไซม์ pancreatic lipase เป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยไขมัน ดังนั้นสารใดๆ ก็ตามที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ ก็อาจมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดภาวะอ้วน อันเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบในระยะยาวได้ ซึ่งอาหารไทยมีเครื่องเทศที่มีรสเผ็ดร้อนจำนวนมาก ซึ่งคาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ในการขัดขวางการดูดซึมไขมันในลำไส้ได้

พืชสมุนไพรไทยทั้ง 12 ชนิดนี้ นอกจากจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยไขมันแล้ว ยังสามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าไปในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ด้วย ในการศึกษานี้พบว่า สารสกัดพริกไทย มีฤทธิ์ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าไปในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงสูงสุด ส่วนสารสกัดจาก ชา ข่า และ ดีปลี (*P. retrofractum*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการการนำโคเลสเตอรอลเข้าไปในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงปานกลาง ซึ่งกลไกการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ยังไม่ชัดเจน แต่อาจเป็นไปได้หลายกลไก อาทิ การยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์โดยกระบวนการแข่งขัน ซึ่ง sterols หรือ phytosterols ที่มีอยู่ในพืชสมุนไพร จะขัดขวางการจับและขนส่งโคเลสเตอรอลผ่านทางตัวขนส่ง (transpoerter) ที่ชื่อว่า Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) อย่างเฉพาะเจาะจง นอกจากนี้ อาจเป็นเพราะสารสกัดสมุนไพรทำให้การละลายของไขมัน (solubilization) ใน micelle ลดลง จึงลดการนำไขมันเข้าเซลล์ phytosterols จะพบในพืชและน้ำมันพืชหลายชนิด (Brufau et al., 2008) โดยโครงสร้างของ phytosterols มีลักษณะคล้ายคลึงกับโครงสร้างของโคเลสเตอรอล ดังนั้น phytosterol อาจลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลโดยการแย่งกับโคเลสเตอรอล ในการแทนที่โคเลสเตอรอลใน micelle ทำให้โคเลสเตอรอลกระจายใน micelle ได้น้อยลง หรือแย่งจับกับตัวขนส่งหรือยับยั้งการก่อรูปของ chylomicorn โดยรบกวนการทำงานของ acyl-oenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT) ภายในเซลล์ลำไส้ (Brufau et al., 2008; Jesch and Carr, 2006) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานที่บ่งชี้ว่ามีปริมาณของ phytosterols ในพริกไทย ชา ข่า หรือ ดีปลี มีมากน้อยเพียงไรดังนั้น ฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอลอาจจะเป็นผลจากสารประกอบอื่นๆ ที่พบในพืชเหล่านี้ โดยสารประกอบเหล่านี้อาจจะไม่มีผลกระบวนการแข่งขันการดูดซึมของโคเลสเตอรอลโดยตรง แต่อาจผ่านกระบวนการรบกวนการทำงานของตัวขนส่ง เช่น NPC1L1 ตัวขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ หรือรบกวนการทำงานของ ACAT

ตัวขนส่ง NPC1L1 พบมากในลำไส้เล็กและบริเวณ brush border membrane ของ enterocyte (Altmann et al., 2004) หรือภายในเซลล์ (Davies et al., 2005; Sane et al., 2006) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดูดซึมโคเลสเตอรอลที่บริเวณส่วนต้นของลำไส้เล็ก และเป็นเป็นเป้าหมายของยาที่ใช้ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล เช่น ยา ezetimibe (Weinglass et al., 2008) ถึงแม้จะมีความเป็นไปได้ แต่ยังไม่มีรายงานแน่ชัดว่า NPC1L1 เป็นเป้าหมายของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ เพื่อที่จะทดสอบความเป็นไปได้นี้การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประเด็นนี้จึงมีความจำเป็น จากการศึกษานี้พบว่า ezetimibe ไม่ได้ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ทั้งหมด (ยับยั้งประมาณ 60%) ดังนั้นจึงบ่งบอกได้ว่าการขนส่งโคเลสเตอรอลโดยผ่าน NPC1L1 ไม่ใช่เป็นกลไกเดียวที่ทำหน้าที่ในการนำและดูดซึมโคเลสเตอรอล

อีกกลไกหนึ่งที่น่าสนใจเกี่ยวกับการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลคือ ACAT ซึ่งเป็นตัวส่งเสริมให้มีการดูดซึมโคเลสเตอรอลให้ดีขึ้น (Chang et al., 2001) ซึ่งพบว่า alkamide ที่ได้จากผลพริกไทยดำ สามารถยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ ACAT ใน HepG2 cells (Rho et al., 2007) ส่วนพืชอื่นๆ ยังไม่พบว่ามีฤทธิ์ดังกล่าว

การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่า การลดการดูดซึมของโคเลสเตอรอลไม่เกี่ยวข้องกับผลสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการเจริญเติบโตหรือการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) (ตารางที่ 2) เนื่องจากพบว่าสัดส่วนของ การมีชีวิตของเซลล์ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ (ตารางที่ 3) จากที่กล่าวข้างต้นว่า การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ใช้เซลล์ undifferentiated Caco-2 cells ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ซึ่งใช้เซลล์ที่มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายลำไส้เล็ก (differentiated Caco-2 cells) คือเป็นเซลล์ที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ เซลล์จะมีความหนาแน่นของมากกว่า (Hidalgo et al., 1989) จากการสังเกตพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ดังกล่าวเมื่อให้สารสกัดสมุนไพร แสดงให้เห็นว่าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (100 μg/ml) ได้ดี จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ไม่ได้เป็นผลจากการรบกวนการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เป็นไปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรอาจจะไปยับยั้งการนำเข้าของโคเลสเตอรอลโดยกลไกอย่างใดอย่างหนึ่ง

นอกจากทดสอบกลไกที่อาจเป็นไปได้เกี่ยวกับการดูดซึมโคเลสเตอรอล ผู้วิจัยได้ทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล โดย HMG-CoA reductase จะเปลี่ยน HMG-CoA ไปเป็น mevalonate ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (Grigore et al., 2008) HMG-CoA reductase เป็นเป้าหมายหลักของยากลุ่ม statins แต่ผลของสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ยังมีการรายงานค่อนข้างจำกัด มีบางการศึกษาพบว่าสารสกัดจาก *C. zedoaria* สามารถยับยั้งการเจริญของ Vero cell ได้อย่างมีนัยสำคัญซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Liu et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจาก *A. comosus* (0.01–100 μg/ml) สามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ได้ 20-49% อย่างมีนัยสำคัญ (Xie et al., 2007) ในการศึกษานี้ พบว่า สารสกัด *A. comosus* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 70% ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากกระบวนการสกัดสารสมุนไพรและแหล่งของพืชสมุนไพร ซึ่งทำให้มีปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน ในการศึกษานี้ยังพบว่าสารสกัดจากมะรุม (*M. oleifera*) สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase ได้เท่าๆ กับ ยา pravastatin ส่วนสารสกัดจาก กระเจี๊ยบ (*H. sabdariffa*) และใบฟักทอง (*C. moschata*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์

ได้ถึง 90% ซึ่งสารสกัดเหล่านี้อาจจะยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในร่างกายได้ ซึ่งเป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ และอาจจะเป็นประโยชน์ในการรักษาภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงได้ จากพืชทั้ง 12 ชนิดที่นำมาศึกษานี้ สารสกัดจากข่าและชา มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้น้อยที่สุด (ประมาณ 50%) ผลของการลดโคเลสเตอรอลของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการดูดซึมโคเลสเตอรอลมากกว่าการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ ได้แสดงกลไกความเป็นไปได้ในการลดระดับของโคเลสเตอรอลของสารสมุนไพร 12 ชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการประกอบอาหารและใช้เป็นยา โดยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพร (crude extracts) แต่ละชนิดออกฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลที่โดยกลไกหลักที่แตกต่างกัน และบางชนิดออกฤทธิ์ได้หลายกลไก ทั้งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยอาหารและการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล รวมทั้งการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ชาและข่าแสดงถึงความเป็นไปได้ในการเป็นตัวยับยั้งการดูดซึมไขมันและโคเลสเตอรอล ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และขัดขวางการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ ในขณะที่มะรุม กระเจี๊ยบ และฟักทอง ให้ผลคล้ายกับ statin ที่ยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล ผ่านทางการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase พืชสมุนไพรเหล่านี้มีการใช้กันแพร่หลายในการเป็นส่วนประกอบของอาหารไทยหลาย ๆชนิด การรับประทานสมุนไพรเหล่านี้ร่วมกันในสัดส่วนที่เหมาะสม อาจจะสามารถช่วยส่งเสริมให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ และอาจเป็นไปได้ในการพัฒนาสมุนไพรเหล่านี้ให้อยู่ในรูปของอาหารเสริมหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นสารในการลดระดับโคเลสเตอรอล แต่ยังมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม

บรรณานุกรม (Bibliography)

Altmann, S.W., Jr., H.R.D., Zhu, L.j., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. and Graziano, M.P., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. Science 303, 1201-1204.

Bhandari, U., Sharma, J.N. and Zafar, R., 1998. The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. Journal of Ethnopharmacology 61, 167-171.

Bhatnagar, D., Soran, H. and Durrington, P.N., 2008. Hypercholesterolaemia and its management. British Medical Journal 337, 503-508.

Brufau, G., Canela, M.A. and Rafecas, M., 2008. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. Nutrition Research 28, 217-225.

Chang, T.Y., Chang, C.C.Y., Lin, S., Yu, C., Li, B.L. and Miyazaki, A., 2001. Roles of acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase-1 and -2. Current Opinion in Lipidology 12, 289-296

Chen, C.C., Liu, L.K., Hsu, J.D., Huang, H.P., Yang, M.Y. and Wang, C.J., 2005. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Food Chemistry 91, 601-607.

Choi, H., Eo, H., Park, K., Jin, M., Park, E.-J., Kim, S.H., Park, J.E. and Kim, S., 2007. A water-soluble extract from *Cucurbita moschata* shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in a high fat diet-induced obesity mouse model. Biochemical and Biophysical Research Communications 359, 419-425.

Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawat, S. and Pongrapeeporn, K.-u.S., 2008 The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. Journal of Ethnopharmacology 116, 439-446.

Davies, J.P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A. and Ioannou, Y.A., 2005. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. The Journal of Biological Chemistry 280, 12710-12720.

Davis H.R., Veltri E.P., 2007. Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia. Journal of atherosclerosis and thrombosis 14, 99-108.

El-Beshbishy, H.A., Singab, A.N.B., Sinkkonen, J. and Pihlaja, K., 2006. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. Life Sciences 78, 2724 - 2733.

Grigore, L., Norata, G.D. and Catapano, A.L., 2008. Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. Vascular Health and Risk Management 4, 267-278.

Han, L.K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., Zheng, Y.N. and Okuda, H., 2001. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. International Journal of Obesity 25, 1459 - 1464.

Hidalgo, I.J., Raub, T.J. and Borchard, R.T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastoenterology 96, 736-749.

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A. and Suthisisang, C., 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. Journal of Ethnopharmacology 103, 252-260.

Huggins, K.W., Camarota, L.M., Howles, P.N., and Hui, D.Y., 2003. Pancreatic triglyceride lipase deficiency minimally affects dietary fat absorption but dramatically decreases dietary cholesterol absorption in mice. Journal of Biological Chemistry 278, 42899-42905.

Jesch, E.D. and Carr, T.P., 2006 Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. Nutrition Research 26, 579- 584.

Liu, J.C., Chan, P., Hsu, F.L., Chen, Y.J., Hsieh, M.H., Lo, M.Y. and Lin, J.Y., 2002. The in vitro inhibitory effects of crude extracts of traditional chinese herbs on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase on vero cells. American Journal of Clinical Medicine 30, 629-636.

Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F. and Kiso, Y., 2005. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 4593-4598.

Rho, M.C., Lee, S.W., Park, H.R., Choi, J.H., Kang, J.Y., Kim, K., Leea, H.S. and Kim, Y.K., 2007. ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. Phytochemistry 68, 899-903.

Sampalis J.S., Bissonnette S., Habib R., Boukas S., 2007. Reduction in estimated risk for coronary artery disease after use of ezetimibe with a statin. The Annals of pharmacotherapy 41, 1345-1351.

Sané, A.T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Ménard, D., Beaulieu, J.F. and Levy, E., 2006. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. Journal of Lipid Research 47, 2112-2120.

Schmitz G., Schmitz-Madry A., Ugocsai P., 2007. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. Current opinion in lipidology 18, 164-173.

Weinglass, A.B., Kohler, M., Schulte, U., Liu, J., Nketiah, E.O., Thomas, A., Schmalhofer, W., Williams, B., Bildl, W., McMasters, D.R., Dai, K., Beers, L., McCann, M.E., Kaczorowski, G.J. and Garcia, M.L., 2008 Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 11140-11145.

Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Cai, G. and Du, L., 2007. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. Journal of Pharmacological Sciences 103, 267- 274.

Yamanashi, Y., Takada, T. and Suzuki, H., 2007. Niemann-Pick C1-Like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and β-sitosterol uptake in Caco-2 cells. The journal of pharmacology and experimental therapeutics 320, 559-564.

Young, S.C., and Hui, D.Y. 1999. Pancreatic lipase/colipase-mediated triacylglycerol hydrolysis is required for cholesterol transport from lipid emulsions to intestinal cells. Biochemical Journal 339, 615-620.

บทที่ 4

ผลลัพธ์ (Output)

การนำเสนอผลงานทางวิชาการรูปแบบโปสเตอร์

ชื่องานประชุม	นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ นักวิจัยอาวุโส สกว.
วันที่	15-17 ตุลาคม 2552
สถานที่	โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอรท์ รีเจ้นท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ชื่อเรื่อง	Potential mechanisms of hypocholesterolemic effect of Thai spices/dietary extracts
ชื่อวารสาร	Natural Product Research
สถานะภาพ	อยู่ระหว่างรอการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ

Abstract for Poster Presentation

Potential mechanisms of hypocholesterolemic effect of Thai spices/dietary plants

Nanteetip Limpeanchob[1], Acharaporn Duangjai[1], Kornkanok Ingkaninan[2]

[1] *Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000*
[2] *Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000*

Abstract

Several Thai spices/dietary plants were previously demonstrated the hypocholesterolemic effects. These studies were mostly conducted in animal models in which the mechanisms of action were not yet well established. Therefore, the present study was aimed to investigate the potential mechanism of hypocholesterolemic action of twelve selected plants wildly used as spices and ingredients in various types of Thai food. This study demonstrated that several of the tested plants possessed multiple sites of action that were possibly responsible for their cholesterol lowering effect in the *in vivo* model. The extract of *Piper nigrum* L. was found to be the most effective agent as cholesterol absorption inhibitor by blocking the uptake of radiolabeled cholesterol into differentiated Caco-2 cells. The extract of *Alpinia galanga* (L.) Willd. and *Camellia sinensis* (L.) Kuntze effectively inhibited pancreatic lipase activity whereas those of *Hibiscus sabdariffa* L., *Moringa oleifera* Lam. and *Cucurbita moschata* Duchesne were acting similarly to statins to inhibit HMG-CoA reductase and possibly reduce cholesterol biosynthesis. These potential mechanisms of hypocholesterolemic action of the selected Thai plants could contribute to their use as healthy diets and moreover be developed as dietary supplements, nutraceutical products or therapeutic agents for cholesterol lowering purpose.

Keywords: hypercholesterolemia, cholesterol, pancreatic lipase, HMG-CoA reductase, spices, dietary plant

RM
666
.H33
ท 931 ร
2551

สำนักหอสมุด

29 ส.ค. 2554

Poster Presentation

Potential Mechanisms of Hypocholesterolemic Effect of Thai Spices/Dietary Plants

Nanteetip Limpeanchob[1], Acharaporn Duangjai[1], Kornkanok Ingkaninan[2]

1 Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000

2 Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000

Introduction

Several Thai spices/dietary plants were previously demonstrated the hypocholesterolemic effects. These studies were mostly conducted in animal models in which the mechanisms of action were not yet well established.

Objective

To investigate the potential mechanism of hypocholesterolemic action of twelve selected plants wildly used as spices and ingredients in various types of Thai food.

Methods

Cholesterol uptake: [^{3}H]cholesterol uptake in Caco-2 cells

Differentiated Caco-2 cells (14 -21 days) + [^{3}H]-cholesterol micelles + plant extracts → Collected cells → Radioactivity / Protein content

Lipid digestion: Pancreatic lipase assay

Pancreatic lipase

4-methylumbelliferyl oleate → 4-methylumbelliferone

Ex 360 nm/Em 535 nm

Cholesterol synthesis: HMG-CoA reductase assay

HMG-CoA reductase

HMG-CoA + 2NADPH + 2H$^+$ → Mevalorate + 2NADP^{2+} + CoA

Absorbance 340 nm

Results

Table 1 Pancreatic lipase and HMG-CoA reductase inhibitory activity of plant extracts

Plants	Pancreatic lipase inhibition (IC_{50}, µg/ml)	HMG-CoA reductase inhibition (%)
Galangal (ข่า) *[Alpinia galanga]*	8.99 ± 3.41	53.08 ± 2.20
Zedoary (ว่านมหาเมฆ) *[Curcuma zedoaria]*	12.36 ± 1.23	76.58 ± 0.31
Tea (ชา) *[Camellia sinensis]*	25.22 ± 6.73	53.61 ± 2.73
Ginger (ขิง) *[Zingiber officinale]*	35.25 ± 13.18	77.43 ± 1.80
Brahmi (พรมมิ) *[Bacopa monnieri]*	43.26 ± 12.17	65.27 ± 7.00
Horse radish tree (มะรุม) *[Moringa oleifera]*	56.81 ± 5.95	106.46 ± 3.70
Pepper (พริกไทยดำ) *[Piper nigrum]*	68.27 ± 25.42	77.11 ± 15.88
Long pepper (ดีปลี) *[Piper retrofractum]*	95.00 ± 23.72	59.52 ± 13.52
Roselle (กระเจี๊ยบแดง) *[Hibiscus sabdariffa]*	121.44 ± 28.41	94.91 ± 11.86
Pineapple (สับปะรด) *[Ananas comosus]*	122.90 ± 24.23	74.36 ± 15.25
Pumpkin (ฟักทอง) *[Cucurbita moschata]*	189.50 ± 8.89	92.60 ± 10.17
Mulberry (หม่อน) *[Morus alba]*	244.00 ± 83.96	64.57 ± 5.97
Orlistat	0.32 ± 0.14 ng/ml	-
Pravastatin	-	103 .96 ± 4.08

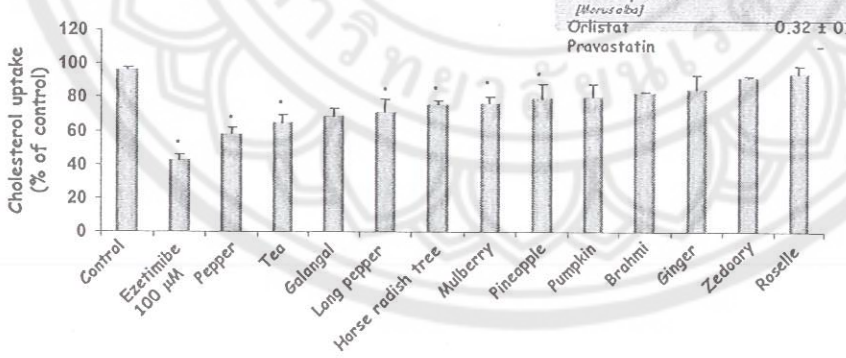


Figure 1 Effect of plant extracts (100 µg/ml) on the uptake of [^{3}H]-cholesterol into differentiated Caco-2 cells

Discussion and Conclusion

Crude extracts isolated from this group of plants show multiple sites of their hypocholesterolemic actions including inhibitions of lipid digestive enzyme, cholesterol uptake into intestinal cells and cholesterol synthetic enzyme.

Several of these plants are wildly used as spices and ingredients in many types of Thai food and have been thought to be good for health. Suitable combinations of these plants could potentiate each other cholesterol lowering activities when used as dietary supplement or nutraceutical food.

Acknowledgements

- National Research Council of Thailand to Naresuan University (RX-AR-032/2552)
- Thailand Research Fund (MRG5180254).
- Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree from the Commission on Higher Education, Thailand
- Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC).

ภาคผนวก (Index)

Manuscript for Natural Product Research

Potential mechanisms of hypocholesterolemic effect of Thai spices/dietary extracts

Acharaporn Duangjai[ac], Kornkanok Ingkaninan[b] and Nanteetip Limpeanchob[a]*

[a]*Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand;* [b]*Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand;* [c]*School of Medical Sciences, Naresuan University Phayao, Phayao 56000, Thailand*

* Corresponding author: Nanteetip Limpeanchob
Tel: +66-81-554-3013; Fax: +66-55-963-731
E-mail: nanteetipl@yahoo.com, nanteetipl@nu.ac.th

Several Thai spices/dietary ingredients were previously demonstrated the hypocholesterolemic effects. These studies were mostly conducted in animal models in which the mechanisms of action were not yet well established. Therefore, the present study was aimed to investigate the potential mechanism of hypocholesterolemic action of twelve selected plants wildly used as spices and ingredients in various types of Thai food. The extract of *Piper nigrum* L. was found to be the most effective agent as cholesterol uptake inhibitor whereas that of *Alpinia galanga* (L.) Willd. and *Camellia sinensis* (L.) Kuntze effectively inhibited pancreatic lipase activity. The extracts from *Hibiscus sabdariffa* L., *Moringa oleifera* Lam. and *Cucurbita moschata* Duchesne were acting similarly to statins to inhibit HMG-CoA reductase and possibly reduce cholesterol biosynthesis. This study also demonstrated that several of the tested plants possessed multiple sites of action that were possibly responsible for their cholesterol lowering effect in the *in vivo* model.

Keywords: Cholesterol; Pancreatic lipase; HMG-CoA reductase; Thai spices; Dietary plant

1. Introduction

Hypercholesterolemia plays a major role in the development of atherosclerosis and coronary heart diseases (Frishman, 1998). The cause of hypercholesterolemia has been thought to be related to the imbalance between cholesterol synthesis and clearance. In addition to disorders of lipid metabolism, lifestyle influences such as diet, exercise, smoking, and alcohol use might affect cholesterol level (Bhatnagar, Soran, & Durrington, 2008; Garg & Simha, 2007) . Lifestyle changes, restriction of dietary cholesterol, and intake of dietary fiber and plant sterols can lower serum cholesterol level (Garg & Simha, 2007). Lifestyle intervention was suggested for certain groups of patients before considering the use of lipid-lowering drugs (Garg & Simha, 2007). Up to date, there are many pharmacological strategies available for hypercholesterolemia management such as mono- and combined-therapy of inhibitors of cholesterol synthesis and absorption (Pollex, Joy, & Hegele, 2008).

The most common drugs used to manage hypercholesterolemia are statins which lower serum cholesterol by reducing endogenous cholesterol biosynthesis (Pahan, 2006). Statins are generally well tolerated and efficacious, but high-dose statin therapy has been associated with increased incidence of hepatotoxicity and myopathy (Bhatnagar, et al., 2008; Garg & Simha, 2007). In recent years, there has been considerable interest in the potential of using natural components from food and/or herbal medicines as health promoting agents including cholesterol lowering products. This alternative therapy could be applied for low to moderate risk patients or patients with marginally high cholesterol level (200-240 mg/dl) in which the management of hypercholesterolemia is recommended to start with lifestyle therapy, not the pharmacological treatment (Garg & Simha, 2007). In addition, this may be useful particularly for some patients who can not tolerate the adverse

effects of cholesterol lowering drugs or as supplements for ones who do not well response to sole drug therapy.

Many of Thai spices/dietary plants have been suggested to have antihyperlipidemic and/or antiatherosclerotic properties. The hypolipidemic or hypocholesterolemic effects of these plants were mostly demonstrated in the *in vivo* experiments but the mechanisms of action of these effects are not thoroughly established. Therefore the aim of this study was to investigate the potential sites of action of the selected twelve Thai plants in which hypocholesterolemic effects of seven plants were previously reported in animal models (table 1) (Bhandari, Sharma, & Zafar, 1998; Chen, et al., 2005; Choi, et al., 2007; Chumark, et al., 2008 ; El-Beshbishy, Singab, Sinkkonen, & Pihlaja, 2006; Han, et al., 2001; Hirunpanich, et al., 2006; Xie, et al., 2007). The rest of selected plants were also thought to have hypolipidimic effects, despite the evidence is unpublished. The effects of these plant extracts on lipid digestion, cholesterol absorption and biosynthesis were examined to assess the potential mechanisms of their cholesterol lowering effects. The present study provides the evidence that most tested plant extracts possess multiple sites of action with different intensity as inhibitors of pancreatic lipase, 3-hydroxy-3-methyglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) and cholesterol uptake. These mechanisms of hypocholesterolemic action may be accounting for their cholesterol lowering effects in animal experiments. This finding may encourage the usage of some of these spices and dietary plants as health promoting products as dietary supplements and nutraceutical products.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Pancreatic lipase (type II, from porcine pancreas), orlistat and all the materials for cell culture were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Fetal bovine serum

(FBS) was purchased from Gibco. 4-Methylumbelliferyl oleate was obtained from Fluka. Some of plant extracts (ginger, mulberry, brahmi, long pepper, and pepper) were obtained from the Bioscreening Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University and identified by Assoc. Prof. Dr. Kornkanok Ingkaninan. The rest of the Thai plants (roselle, horse radish tree, pumpkin, pineapple, galangal, zedoary and tea) were obtained from the Queen Sirikit Botanic Garden (Chiang Mai, Thailand)

2.2 Plants extract preparation

The plant materials were washed thoroughly with tap water and dried at 37 °C in an incubator, diced into small pieces, powdered in a mixer grinder, dried at 60 °C for 2-3 days, and the dried power were macerated with 95% methanol for 3 days. The aqueous extracts were subsequently filtered, evaporated in a rotavapor at 55-60 °C under pressure. The plants extract were kept at -20 °C.

2.3 Cell culture preparation

Caco-2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in CO_2 incubator in a saturated humidity atmosphere containing 95% air and 5% CO_2. All cells were propagated in culture flasks and subsequently plated in 96-well plates for viability test and in 24-well plates for cholesterol uptake experiment.

2.4 Cholesterol micelle preparation

The micelle preparations were modified from Yamanashi (Yamanashi, Takada, & Suzuki, 2007). Briefly, stock solutions of [1α,2α(n)-^{3}H]cholesterol, cholesterol, phosphatidylcholine were dissolved in chloroform. A stock solution of sodium taurocholate was prepared in methanol. The lipid and bile salt solutions were mixed and evaporated under a stream of N_2. The lipid film was stored under N_2 at -20 °C until use.

The micelle solutions were freshly prepared by hydrating the lipid film in serum-free DMEM/F12 so that the final concentrations of the micelle were 1 μM cholesterol, 2 mM sodium taurocholate, 50 μM phosphatidylcholine, and 1 μCi/ml [1α,2α(n)-^{3}H]cholesterol. The micelle solutions were sonicated and passed through 0.2 μm syringe filters and kept at 37 °C before adding to the cells.

2.5 Cholesterol uptake assay

Caco-2 cells were seeded on 24-well plate at a cell density 50,000 cells/well and cultured for 14 days to allow them to differentiate. During this period cells were fed with fresh medium every 2 days. After 14 days, cells were incubated with serum-free medium overnight. Cells were treated with plants extract or ezetimibe for 1 h before adding [1α,2α(n)-^{3}H]cholesterol-micelle containing medium. After 3 h incubation, medium were removed and cells were washed twice with ice-cold PBS. The cells were disrupted with 0.2 N NaOH and 0.1 % Triton-X 100. One part of the aliquot was added to scintillation cocktail (MicroScint™-20; PerkinElmer), the other part was taken for protein determination. The radioactivities of cell lysates were measured in a Packard β-counter.

2.6 Measurement of pancreatic lipase activity

The pancreatic lipase activity was measured using 4-methylumbelliferyl oleate (4-MU oleate) as a substrate (Nakai, et al., 2005). Twenty-five microliters of plant extracts (in 1% DMSO) and 10 μl of 1 mM 4-MU (in DMSO) were mixed with 40 μl of buffer consisting of 13 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1.3 mM $CaCl_2$ (pH 8.0) in 96-well plates, and 25 μl of the lipase solution (50 U/ml) in the above buffer were then added to start the enzyme reaction. Orlistat was used as a positive control of pancreatic lipase inhibitor. After incubation at 25 °C for 30 min, the amount of 4-methylumbelliferone released by lipase was measured with a fluorometrical microplate reader at an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 535 nm.

2.7 HMG-CoA reductase assay

HMG-CoA reductase activity was determined by HMG-CoA reductase assay kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The assay is based on the spectrophotometric measurement of the decrease in absorbance at 340 nm and 37 °C with a kinetic program, which represents the oxidation of NADPH by the catalytic subunit of HMG-CoA reductase in the presence of the substrate HMG-CoA.

2.8 Statistical analysis

Results are expressed as the mean±SEM of n experiments. The data were analyzed by repeated measurements of one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered to be significance when $p \leq 0.05$. 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated using the Prism program (GraphPad Software Inc).

3. Results and discussion

3.1 Effect of plant extracts on cholesterol uptake

To examine the effect of the extracts on cholesterol absorption in the intestinal lumen, differentiated Caco-2 cells were used as an *in vitro* model. The level of [1α2α(n)-^{3}H] cholesterol captured in Caco-2 cells was measured and calculated as the amount of tritium cholesterol per mg protein of cell lysates. In this study, ezetimibe was used as a positive control since it is known to block cholesterol transporter protein leading to the cholesterol uptake inhibition. The uptake of cholesterol into Caco-2 cells was reduced approximately 60% following pre-incubation with 100 μM ezetimibe.

Following pre-incubating cells with plant extracts, the data demonstrated that each plant extract (100 μg/ml) could block the uptake of cholesterol into Caco-2 cells in the different intensity (table 2). Pepper (*P. nigrum*) extract exhibited the strongest inhibitory activity, approximately 40% reduction. From this study, 100 μg/ml zedoary (*C. zedoaria*) and roselle (*H. sabdariffa*) extracts scarcely inhibited cholesterol uptake. This observation

suggests that some of the selected plant extracts could block the uptake of cholesterol into Caco-2 cells and this phenomenon plausibly occurs in the intestinal cells of the animals.

3.2 Pancreatic lipase inhibition

Since one of the mechanisms of lipid lowering agents could be the inhibition of digestive enzymes, the effects of all selected plant extracts on pancreatic lipase activity were determined. Our result showed that each individual plant extract possessed the inhibitory activity against pancreatic lipase in a dose-dependent manner (data not shown). The 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of all plant extracts were calculated and shown in table 3. The extract from galangal (*A. galangal*) rhizome and mulberry (*M. alba*) leave showed the highest and the lowest inhibitory activities with the IC_{50} at 8.99±3.41 and 244.94±83.96 µg/ml, respectively. However, the pancreatic lipase inhibitory activities of all selected plant extracts were much less potent than that of orlistat, a well known pancreatic lipase inhibitor that prevents dietary fat from being absorbed in the intestine. This observation indicated that most plants seem to have potential to disrupt lipid digestion in the intestinal lumen which may consequently reduce cholesterol absorption and eventually result in the lowering of serum cholesterol.

3.3 HMG-CoA reductase inhibition

HMG-CoA reductase is the rate limiting step enzyme of the mevalonate pathway, the metabolic pathway that produces cholesterol. This enzyme is the target of statins, the well known cholesterol lowering drugs such as pravastatin. The results demonstrated that each plant extract (100 µg/ml) could differently inhibit the activity of HMG-CoA reductase (table 4). The extract from horse radish tree (*M. oleifera*) leaves completely inhibited the HMG-CoA reductase to the same extent as pravastatin which was used as a positive control in this experiment. Although galangal extract has the lowest suppression on this enzyme, it showed somewhat inhibitory activity (53.08±2.20% inhibition). Although this experiment was an *in vitro* enzymatic assay which might not appear in the same direction

as the *in vivo* model, these results at least indicated the potential mechanism of action of the cholesterol lowering activities of these plant extracts via the inhibition of cholesterol biosynthesis.

3.4 Discussion

Hypercholesterolemia as the result of abnormalities of cholesterol homeostasis is the risk factor for development of atherosclerosis and coronary heart disease. Using of hypocholesterolemic drugs such as statins was recommended for high risk group of patients. For people with low risk or plasma cholesterol is not risky high, life style changes such as low cholesterol diet as well as regular exercise are likely to be helpful to lower plasma cholesterol level. However, such life style changes are not readily accomplished for most people. Therefore, uses of certain food ingredients, dietary supplements, and nutraceutical products especially ones from natural sources, with hypocholesterolemic activities could be one of the alternatives for cholesterol lowering purpose.

Many Thai plants, particularly ones used as ingredients in Thai food, drink and spices, have been thought to have beneficial effect for human health as cholesterol lowering agent. Some of those plants were demonstrated to be able to lower plasma cholesterol and other types of lipids in animal models. The present study provides evidence suggesting the potential mechanism of hypocholesterolemic action of selected twelve Thai plants on lipid digestion, cholesterol absorption and synthesis.

In this study, several of the selected plant extracts such as galangal, zedoary, tea (*C. sinensis*) and ginger (*Z. officinale*) showed promising inhibitory activities against pancreatic lipase. Although their potencies are not as strong as orlistat, their IC_{50} values are quite low ($\leq$ 30 μg/ml). Since they are regularly used in Thai food and drink, daily intake of these plants might provide the sufficient amount to inhibit pancreatic lipase and consequently reduce lipid digestion and absorption. Polyphenols and saponins from tea

were found to be responsible for pancreatic lipase inhibition (Han, et al., 2001; Nakai, et al., 2005). Although pancreatic lipase is responsible for the triacylglycerol hydrolysis, it was suggested to play an important role in dietary cholesterol absorption. Pancreatic lipase-mediated hydrolysis of the triacylglycerols was necessary for cholesterol transport from lipid emulsion to the intestinal cells (Young & Hui, 1999). Transgenic mice lacking pancreatic lipase exhibited significant reduction of dietary cholesterol absorption (Huggins, Camarota, Howles, & Hui, 2003). Inhibition of pancreatic lipase may somewhat decreases dietary lipid digestion as well as absorption and consequently prevents obesity and/or hyperlipidemia from long-term high-fat diet consumption. A number of Thai spices-containing foods therefore are anticipated to play a key role to counteract lipid absorption from the intestinal lumen by inhibiting pancreatic lipase.

All twelve spices/dietary plant extracts showed the inhibitory effect not only on the digestive enzyme, but also the cholesterol uptake into differentiated Caco-2 cells. Caco-2 cells at 2-3 weeks in culture were used in this study as they were proliferated and differentiated to become the monolayer intestinal epithelium (Hidalgo, Raub, & Borchard, 1989). The present study demonstrated that the extract from pepper possessed the highest cholesterol uptake inhibition (about 40% inhibition). Tea, galangal and long pepper (*P. retrofractum*) extracts moderately blocked cholesterol uptake into Caco-2 cells (30-35% inhibition). This reduction of cholesterol uptake was not due to the influences of plant extracts on cell viability since the cell viability was not significantly affected by most extracts at tested concentration (data not shown). The cellular mechanism of this cholesterol uptake inhibitory effect is still unclear. There are several possible mechanisms, including competitive inhibition by plant sterol or phytosterols, blocking at a specific cholesterol transporter called Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1), and reduction of cholesterol solubilization in micelles. Phytosterols have been found in various plant materials and vegetable oils (Brufau, Canela, & Rafecas, 2008). The structure of

phytosterols resembles to that of cholesterol, therefore their ability to reduce cholesterol absorption is mainly owing to the competitive inhibitory actions such as displacing cholesterol to reduce cholesterol solubilization in micelles, being competitive in binding at cholesterol transporters and inhibiting chylomicron formation by interfering with the activity of acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT) within the enterocyte (Brufau, et al., 2008; Jesch & Carr, 2006). However, there is no report indicating significant amount of phytosterol content in the extracts from pepper, tea, galangal and long pepper, thus their cholesterol lowering effect may be the result of other plant components. These compounds possibly affect the cholesterol absorption through non-competitive pathway via specific proteins including NPC1L1 cholesterol transporter and ACAT cholesterol esterification enzyme.

Cholesterol transporter NPC1L1 is highly expressed in small intestine and localized along the brush border membrane of enterocyte (Altmann, et al., 2004) or in intracellular compartment (Davies, Scott, Oishi, Liapis, & Ioannou, 2005; Sane, et al., 2006). It plays an important role in the absorption of dietary cholesterol in the proximal region of the intestine and it is known to be the drug target of cholesterol absorption inhibitor such as ezetimibe (Weinglass, et al., 2008). At this point, although it is possible, there is no evidence demonstrating that NPC1L1 is a target site of the cholesterol uptake inhibitory activity of tested plant extracts. To test this possibility, further investigation is required.

Another interesting site of cholesterol absorption inhibition is ACAT which mediates cholesterol esterification and consequently promotes cholesterol absorption (Chang, et al., 2001). It was found that alkamides from the extract of *P. nigrum* fruits could inhibit ACAT tested in *in vitro* enzymatic assay and also inhibit cholesterol esterification in HepG2 cells (Rho, et al., 2007). The effects of other plants on ACAT activity have not been established.

In addition to testing the potential mechanism at site of cholesterol absorption, the effects of plant extracts on cholesterol synthesis enzyme HMG-CoA reductase were also tested. HMG-CoA reductase catalyzes the reduction of HMG-CoA to mevalonate which is the rate-limiting step of cholesterol biosynthesis (Grigore, Norata, & Catapano, 2008). HMG-CoA reductase is the major target of statins, the well-known cholesterol lowering drugs. At this point, there is limited number of study evaluating the HMG-CoA reductase inhibitory activity of this group of plants. The extract from *C. zedoaria* showed significant growth inhibition of Vero cell model indicating effective HMG Co-A reductase inhibitory activity (Liu, et al., 2002). The extract from *A. comosus* (0.01-100 µg/ml) significantly inhibited HMG Co-A reductase activity by 20-49% in *in vitro* assay (Xie, et al., 2007). In the present study, the *A. comosus* extract showed approximately 70% inhibition. The differences in extract protocol and sources of plant could lead to the differences in the composition of active ingredients in the extract. Interestingly, in this study, the extract from horse radish tree inhibited the HMG-CoA reductase activity as effectively as pravastatin. The extracts from roselle and pumpkin (*C. moschata*) leave could effectively inhibit this enzyme by 90%. These extracts might inhibit cholesterol biosynthesis in the body which was responsible for their cholesterol lowering activity and thus showed the beneficial treatment for hypercholesterolemia. The extract from galangal and tea showed the lowest (approximately 50% inhibition) among all tested plants. The cholesterol lowering effect of these two plants is likely associated with cholesterol absorption rather than cholesterol synthesis.

In conclusion, the present study demonstrates the potential mechanisms of cholesterol lowering effect of twelve plants that have been wildly used in Thai cooking. The crude extracts isolated from this group of plants display different and some show multiple sites of their hypocholesterolemic actions including inhibitions at lipid digestive enzyme, cholesterol uptake into intestinal cells and cholesterol synthetic enzyme. Tea and

galangal seem to be the potential candidates as inhibitors of lipid and cholesterol absorption since they inhibit pancreatic lipase and block the cholesterol uptake into intestinal cells. Perhaps, site of action of roselle calyx, horse radish tree and pumpkin leaves appear to be similar to that of statins that inhibit cholesterol synthesis through the suppression of HMG-CoA reductase. Several of these plants are wildly used as spices and ingredients in many types of Thai food and have been thought to be good for health. Suitable combinations of these plants could potentiate each other cholesterol lowering activities when used as dietary supplement or nutraceutical food.

Acknowledgements

The authors would like to thank Asst. Prof. Dr. Arom Jedsadayanmata for his suggestions in preparing the manuscript and Mr.Wittaya Pongamornkul, from Queen Sirikit Botanic Garden Chiang Mai, Thailand, for providing plant materials. This study was financial supported by National Research Council of Thailand to Naresuan University (RX-AR-032/2552) and the Thailand Research Fund (MRG5180254). The graduate student was supported by the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree from the Commission on Higher Education, Thailand, and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC).

References

Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science, 303*, 1201-1204.

Bhandari, U., Sharma, J.N., & Zafar, R. (1998). The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. *Journal of Ethnopharmacology, 61*, 167-171.

Bhatnagar, D., Soran, H., & Durrington, P.N. (2008). Hypercholesterolaemia and its management. *British Medical Journal, 337*, 503-508.

Brufau, G., Canela, M.A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research, 28*, 217-225.

Chang, T.Y., Chang, C.C., Lin, S., Yu, C., Li, B.L., & Miyazaki, A. (2001). Roles of acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Current Opinion in Lipidology, 12*, 289-296

Chen, C.C., Liu, L.K., Hsu, J.D., Huang, H.P., Yang, M.Y., & Wang, C.J. (2005). Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chemistry, 91*, 601-607.

Choi, H., Eo, H., Park, K., Jin, M., Park, E.J., Kim, S.H., et al. (2007). A water-soluble extract from *Cucurbita moschata* shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in a high fat diet-induced obesity mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 359*, 419-425.

Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., et al. (2008). The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology, 116*, 439-446

Davies, J.P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A., & Ioannou, Y.A. (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *Journal of Biological Chemistry, 280*, 12710-12720.

El-Beshbishy, H.A., Singab, A.N.B., Sinkkonen, J., & Pihlaja, K. (2006). Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life Sciences, 78*, 2724-2733.

Frishman, W. (1998). Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. *American Journal of Medicine, 104*, 18S-27S.

Garg, A., & Simha, V. (2007). Update on dyslipidemia. *The journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 92*, 1581-1589.

Grigore, L., Norata, G.D., & Catapano, A.L. (2008). Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. *Vascular Health and Risk Management, 4*, 267-278. .

Han, L. K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., et al. (2001). Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders, 25*, 1459 - 1464.

Hidalgo, I.J., Raub, T.J., & Borchard, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastoenterology, 96*, 736-749.

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., et al. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology, 103*, 252-260.

Huggins, K.W., Camarota, L.M., Howles, P.N., & Hui, D.Y. (2003). Pancreatic triglyceride lipase deficiency minimally affects dietary fat absorption but dramatically decreases dietary cholesterol absorption in mice. *Journal of Biological Chemistry, 278*, 42899-42905.

Jesch, E.D., & Carr, T.P. (2006). Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutrition Research, 26*, 579- 584.

Liu, J.C., Chan, P., Hsu, F.L., Chen, Y.J., Hsieh, M.H., Lo, M.Y., et al. (2002). The *in vitro* inhibitory effects of crude extracts of traditional chinese herbs on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase on vero cells. *American Journal of Clinical Medicine, 30*, 629-636.

Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., et al. (2005). Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*, 4593-4598.

Pahan, K. (2006). Lipid-lowering drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences, 63*, 1165-1178.

Pollex, R.L., Joy, T.R., & Hegele, R.A. (2008). Emerging antidyslipidemic drugs. *Expert Opinion on Emerging Drugs, 13*, 363-381.

Rho, M.C., Lee, S.W., Park, H.R., Choi, J.H., Kang, J.Y., Kim, K., et al. (2007). ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum Phytochemistry, 68*, 899-903.

Sane, A.T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Menard, D., et al. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *Journal of Lipid Research, 47*, 2112-2120.

Weinglass, A.B., Kohler, M., Schulte, U., Liu, J., Nketiah, E.O., Thomas, A., et al. (2008). Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105*, 11140-11145.

Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Cai, G., & Du, L. (2007). Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. *Journal of Pharmacological Sciences, 103*, 267- 274.

Yamanashi, Y., Takada, T., & Suzuki, H. (2007). Niemann-Pick C1-Like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and β-sitosterol uptake in Caco-2 cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 320*, 559-564.

Young, S.C., & Hui, D.Y. (1999). Pancreatic lipase/colipase-mediated triacylglycerol hydrolysis is required for cholesterol transport from lipid emulsions to intestinal cells. *Biochemical Journal, 339*, 615-620.

Table 1. List of Thai spices/dietary plants used in this study

Scientific name	Family name	Common name	Model	Part	Effect	References
Hibiscus sabdariffa L.	Malvaceae	Roselle	Rat	Calyx	↓TC, TG, LDL	(Hirunpanich, et al., 2006)
Moringa oleifera Lam.	Moringaceae	Horse radish tree	Rabbit	Leaves	↓TC	(Chumark, et al., 2008)
Cucurbita moschata Duchesne	Cucurbitaceae	Pumpkin	Mice	Stem	↓TC, TG	(Choi, et al., 2007)
Ananas comosus (L.) Merr.	Bromeliaceae	Pineapple	Mice	Leaves	↓TC	(Xie, et al., 2007)
Zingiber officinale	Zingiberaceae	Ginger	Rabbit	Rhizome	↓TC, TG, LDL, VLDL, PL	(Bhandari, et al., 1998)
Morus alba L.	Moraceae	Mulberry	Rabbit	Fruits	↓TC, TG, LDL,	(Chen, et al., 2005)
			Rat	Root bark	↓TC, TG, LDL, VLDL	(El-Beshbishy, et al., 2006)
Camellia sinensis (L.) Kuntze	Theaceae	Tea	Mice	Leaves	↓TC	(Han, et al., 2001)
Piper nigrum L.	Piperaceae	Pepper	npr	Fruits	npr	
Alpinia galanga (L.) Willd.	Zingiberaceae	Galangal	npr	Rhizome	npr	
Curcuma zedoaria Rose	Zingiberaceae	Zedoary, Luya-Luyahan	npr	Rhizome	npr	
Bacopa monnieri (L.) Wettst.	Scrophulariaceae	Brahmi	npr	Stem	npr	
Piper retrofractum Vahl.	Piperaceae	Long pepper	npr	Fruits	npr	

Note: total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), phospholipids (PL), no published report (npr)

Table 2. Effect of plant extracts (100 μg/ml) on [^{3}H]-cholesterol uptake into Caco-2 cells

Common name	[^{3}H]-cholesterol uptake (% of control)
Ezetimibe	43.18 ± 2.78
Pepper	57.76 ± 4.49*
Tea	64.82 ± 4.47*
Galangal	69.15 ± 4.34*
Long pepper	71.12 ± 7.68*
Horse radish tree	75.95 ± 2.11*
Mulberry	76.10 ± 3.98*
Pineapple	79.62 ± 7.90
Pumpkin	80.27 ± 7.83
Brahmi	82.20 ± 0.94
Ginger	84.63 ± 8.98
Zedoary, Luya-Luyahan	91.79 ± 0.48
Roselle	94.11 ± 4.57

Data are expressed as Mean±SEM of three different experiments in which each was performed in duplicate.
* = $p \leq 0.05$ comparing to control

Table 3. Inhibitory effects of plant extracts on pancreatic lipase

Common name	IC_{50} values (µg/ml)[a]
Orlistat	0.32 ± 0.14 ng/ml
Galangal	8.99 ± 3.41
Zedoary, Luya-Luyahan	12.36 ± 1.23
Tea	25.22 ± 6.73
Ginger	35.25 ± 13.18
Brahmi	43.26 ± 12.17
Horse radish tree	56.81 ± 5.95
Pepper	68.27 ± 25.42
Long pepper	95.00 ± 23.72
Roselle	121.44 ± 28.41
Pineapple	122.9 ± 24.23
Pumpkin	189.5 ± 8.89
Mulberry	244.94 ± 83.96

[a] IC_{50} = the half maximal (50%) inhibitory concentration.
Data are expressed as Mean±SEM of three different experiments in which each was performed in triplicate.

Table 4. Effect of plant extracts on HMG-CoA reductase activity

Common name	Inhibition of HMG-CoA reductase activities (%)
Pravastatin	103.96 ± 4.08
Horse radish tree	106.46 ± 3.70
Roselle	94.91 ± 11.86
Pumpkin	92.60 ± 10.17
Ginger	77.43 ± 1.80
Pepper	77.11 ± 15.88
Zedoary, Luya-Luyahan	76.58 ± 0.31
Pineapple	74.36 ± 15.25
Brahmi	65.27 ± 7.00
Mulberry	64.57 ± 5.97
Long pepper	59.52 ± 13.56
Tea	53.61 ± 2.73
Galangal	53.08 ± 2.20

Data are expressed as Mean±SEM of three different experiments in which each was performed in duplicate.

เลขทะเบียน.....

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการบนเว็บไซต์
ฐานข้อมูล NU Digital Repository (http://obj.lib.nu.ac.th/media/)
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ข้าพเจ้า ผศ.ดร.นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ (ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์) ได้ส่งผลงานทางวิชาการการรายงานการวิจัย (เรื่อง) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสมุนไพรไทยในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

ปีที่พิมพ์ 2552

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานทางวิชาการเป็นลิขสิทธิ์ของข้าพเจ้า ผศ.ดร.นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ (ผู้วิจัยร่วม) รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์ เป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ร่วม และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน จึงอนุญาตให้เผยแพร่ผลงาน ดังนี้

☑ อนุญาตให้เผยแพร่

☐ ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ เนื่องจาก.....

.....

.....

ลงชื่อ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ)

วันที่ 5 ต.ค. 58

หมายเหตุ ลิขสิทธิ์ใดๆ ที่ปรากฏอยู่ในผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของเจ้าของผลงาน ไม่ใช่ของสำนักหอสมุด