บทที่ 4
การทดสอบฤทธิ์ของซิริซินในการลดการดูดซึมโคเลสเตอรอล ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ Caco-2

เลี้ยง Caco-2 cells ใน culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin ใน incubator 37 $^{\circ}C$ และ 5%CO_2 หลังจากเซลล์โตทั่วจานเลี้ยง ทำการ subculture ทุกๆ 3-4 วัน โดย detach เซลล์ด้วย 0.25% trypsin ใน Ca^{2+}-, Mg^{2+}-free phosphate buffer (PBS) ที่มี 0.2 g/L EDTA

2. การทดสอบ cell differentiation

เลี้ยง Caco-2 cells ใน 24 well plate เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3-4 วัน ทำการทดสอบ cell differentiation โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase และ α–glucosidase เก็บเซลล์ที่มีอายุในช่วงต่างๆ ด้วย lysis buffer (137 mM NaCl, 2 μg/ml leupeptin, 2 μg/ml aprotinin, 2 μg/ml pepstatin A, 20 mM tris-HCl (pH. 8) and 1% triton-X 100) แล้วนำ cell lysate ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit สำหรับการวัด alkaline phosphatase ทำโดยใช้ *p*-nitrophenylphosphate เป็น substrate ส่วน α–glucosidase ใช้ *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside เป็น substrate ทั้งสองปฏิกิริยาวัดการปลดปล่อยของ *p*-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง วัดได้โดย spectrophotometer ที่ 405 nm

3. การทดสอบ cell viability

เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นของซิริซินที่เหมาะสม ที่จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอล จึงทำการทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (cell survival) หลังการเลี้ยงด้วยซิริซิน ด้วยวิธี MTT assay [3-(3,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetra-zolium bromide)] โดยเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 96 well microplate และเลี้ยงด้วยอาหารที่มีซิริซินที่ความเข้มข้นและเวลาที่กำหนด จากนั้นเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วใส่ 200 μl DMSO:ethanol (1:1) และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วย ELISA reader

4. การเตรียม Cholesterol micelles

เตรียม cholesterol micelles ที่ประกอบด้วย 2 mM taurocholate, 50 μM phosphatidylcholine, 1 μM cholesterol และ 1 μCi/ml [1,2-^{3}H] cholesterol โดยละลายใน chloroform แล้วนำมาผสมกันใน glass tube จากนั้นนำไประเหยภายใต้ N_2 gas และเก็บไว้ที่ -20 °C เมื่อพร้อมนำมาใช้ ละลายใน DMEM/F12 และนำไป sonicate และกรองผ่าน 0.2 μm filter membrane

5. การนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

เลี้ยง Caco-2 cells ใน 24 well culture plates เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน หลังจากเซลล์ differentiate และมีอายุ 2-3 สัปดาห์ จึงพร้อมที่จะนำมาใช้ โดยเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS (serum free medium) 1 ก่อนวันทำการทดลอง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่ไม่มี FBS ที่มี [1,2-^{3}H] cholesterol micelles และซิริซินที่ความเข้มข้นต่างๆ (โดยเติมซิริซินก่อน [1,2-^{3}H] cholesterol micelles 1 ชม.) และเลี้ยงเซลล์ใน incubator ต่อเป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย 0.1 M NaOH-0.1% tritron X100 ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นแบ่งไปวัดปริมาณโปรตีนและวัดค่า radioactivity

6. การทดสอบฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลอง

6.1 โดยการให้ high-cholesterol diet ต่อเนื่อง 5 เดือน

ทดลองในหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley rat เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 110 – 130 กรัม โดยก่อนทำการทดลองจะให้น้ำและอาหารตามปกติ ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

1. หนูกลุ่ม control ที่ได้รับอาหารปกติจำนวน 6 ตัว
2. หนูกลุ่ม control ที่ได้รับอาหารปกติที่มี 4% ซิริซิน จำนวน 6 ตัว
3. หนูกลุ่ม control ที่ได้รับอาหาร High cholesterol จำนวน 6 ตัว
4. หนูกลุ่มที่ได้รับอาหาร High cholesterol ที่มี 4% ซิริซิน จำนวน 6 ตัว

โดยอาหาร High cholesterol ประกอบด้วย 1% cholesterol การทดลองทั้งหมดใช้ระยะเวลานาน 5 เดือน ทำการเก็บเลือดหนูเป็นระยะ เพื่อนำไปวัดระดับ cholesterol และระดับ HDL (high density lipoprotein) และ triglyceride

6.2 โดยการให้ high-cholesterol diet ด้วยการป้อนเป็นเวลา 14 วัน

ทดลองในหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley rat เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม โดยก่อนทำการทดลองจะให้น้ำและอาหารตามปกติ ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มที่ได้รับอาหาร High cholesterol
2. กลุ่มที่ได้รับอาหาร High cholesterol ร่วมกับซิริซิน 10 mg/kg body weight/day
3. กลุ่มที่ได้รับอาหาร High cholesterol ร่วมกับซิริซิน 100 mg/kg body weight/day
4. กลุ่มที่ได้รับอาหาร High cholesterol ร่วมกับซิริซิน 1000 mg/kg body weight/day

โดยอาหาร high cholesterol ที่ป้อนให้กับหนูทดลองเป็นส่วนผสมของ cholesterol, bile acids, coconut oil และน้ำ โดยคิดเป็นปริมาณที่หนูได้รับ คือ 1.5 g/kg/day cholesterol, 0.75 g/kg/day bile acid และ 0.75 g/kg/day coconut oil ปริมาณโคเลสเตอรอลที่ได้รับคิดเป็นประมาณ 2% ของน้ำหนักอาหารที่หนูกินต่อวัน (total daily diet) การทดลองทั้งหมดใช้ระยะเวลานาน 14 วัน และทำการเก็บเลือดหนูทุกๆ 3 วัน เพื่อนำไปวัดระดับ total cholesterol และระดับ HDL (high density lipoprotein) และ triglyceride

7. การวัดระดับของ lipid levels ในพลาสมาของหนูทดลอง

ระดับของ total cholesterol, HDL cholesterol และ triglyceride วัดด้วย enzymatic assay kits (HUMAN GmbH, Germany) โดยทำตามวิธีที่แนะนำไว้ในชุดวิเคราะห์ ส่วน non-HDL เป็นค่าจากการคำนวณ

[non-HDL cholesterol] = [total cholesterol] – [HDL-cholesterol]

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

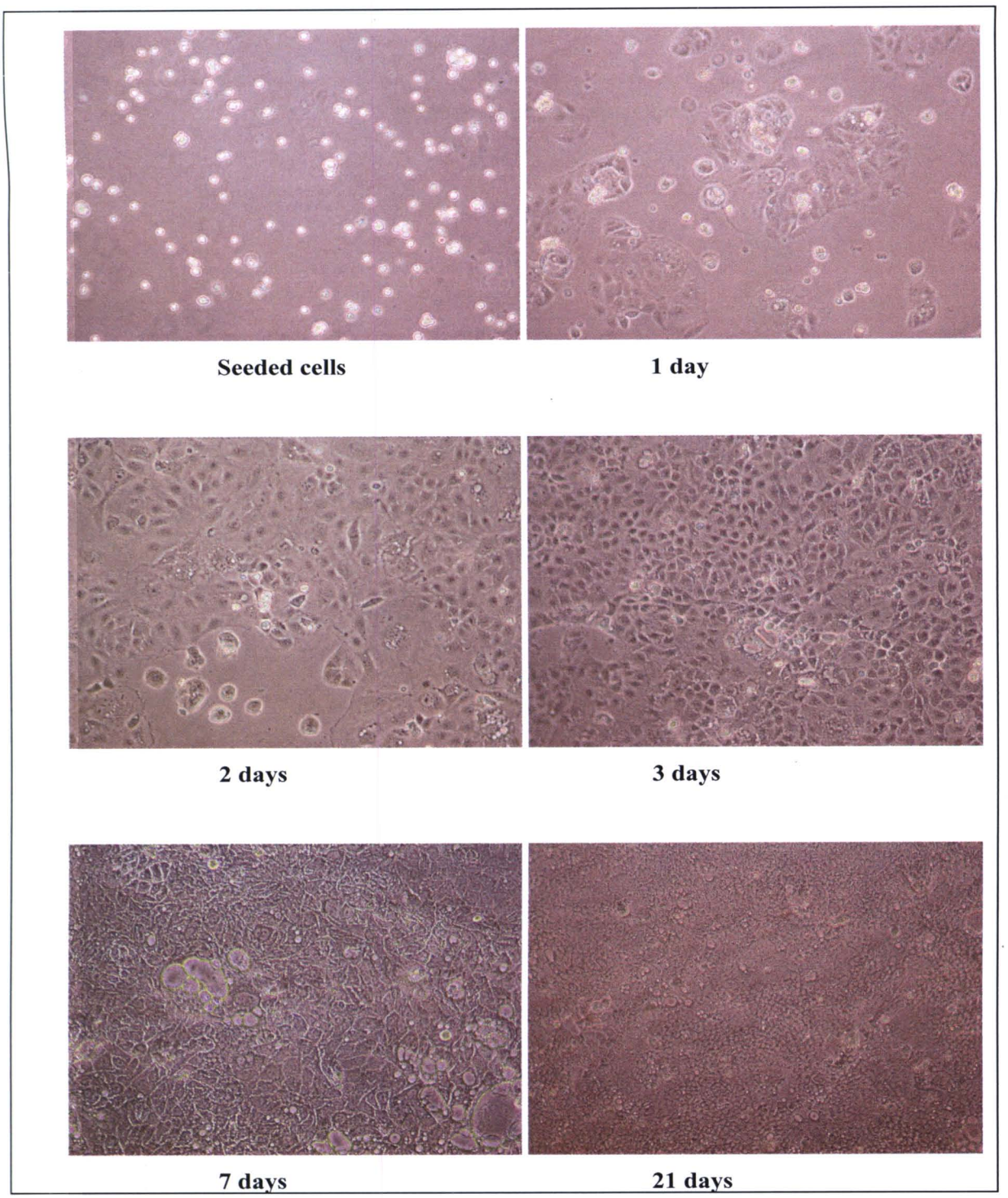
ผลการทดลองที่ได้จากสัตว์ทดลอง นำเสนอค่าเป็น means±standard deviation (SD) ส่วนการทดลองในเซลล์ นำเสนอเป็น Means±standard error of means (SEM) สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล คือ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยค่าความแตกต่างจะมีนัยสำคัญเมื่อ p value ≤ 0.05

ผลการทดลอง

1. ลักษณะและการ differentiation ของเซลล์ Caco-2

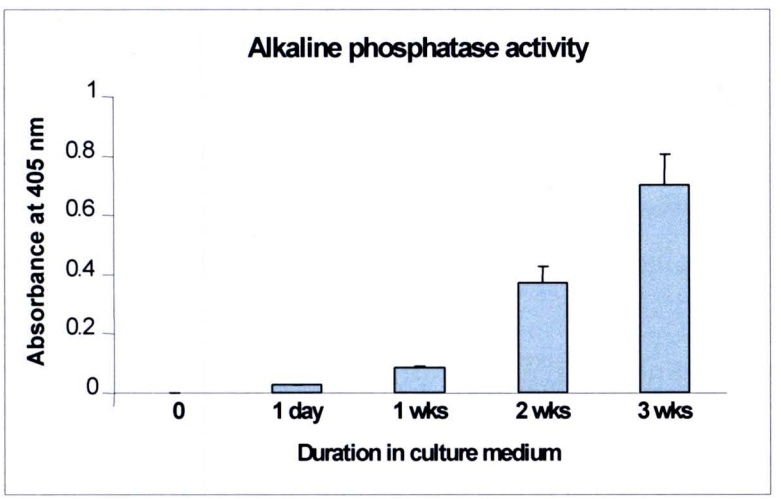
งานวิจัยนี้ มีจุดประสงค์หนึ่งเพื่อศึกษาฤทธิ์ของซิริซินในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงลำไส้ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่นิยมใช้ในการศึกษาการดูดซึมของสารชนิดต่างๆ โดยทำการเลี้ยงเซลล์นาน 2-3 สัปดาห์ เพื่อให้เซลล์เกิดการ differentiation เป็นเซลล์ที่เลียนแบบเซลล์ผนังลำไส้เล็ก ลักษณะเซลล์ที่มีอายุต่างๆ เป็นไปดังรูปที่ 39 โดยเซลล์ที่มีอายุน้อย จะยังสามารถสังเกตเห็นขอบเขตของแต่ละเซลล์ได้ชัดเจน เมื่อมีอายุมากขึ้นเซลล์จะเจริญซ้อนกันและพัฒนาไปเป็นชั้น monolayer เลียนแบบผนังลำไส้ ซึ่งภาพถ่ายจากด้านบนจะไม่สามารถเห็นขอบเขตของแต่ละเซลล์ชัดเจนและไม่สามารถบอกถึงการ differentiation ของเซลล์ได้ โดยทั่วไปการ differentiation ของเซลล์ Caco-2 จะทำได้โดยการวัดการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase และ α–glucosidase

การวัด cell differentiation จากการประเมินการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase และ α–glucosidase ได้ผลดังรูปที่ 40 คือ เมื่อเลี้ยงเซลล์นานขึ้นหรือเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น การทำงานของเอนไซม์ทั้งสองจะเพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ alkaline phosphatase เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงสัปดาห์ที่ 3 (รูปที่ 40A) ขณะที่ α–glucosidase มีการเปลี่ยนแปลงที่น้อยกว่า และค่าเริ่มคงที่หลังจากสัปดาห์ที่ 1 (รูปที่ 40B) จากผลการทดลองผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ที่มีอายุระหว่าง 2-3 สัปดาห์ในการทดสอบการดูดซึมหรือการนำเข้าเซลล์ของโคเลสเตอรอล

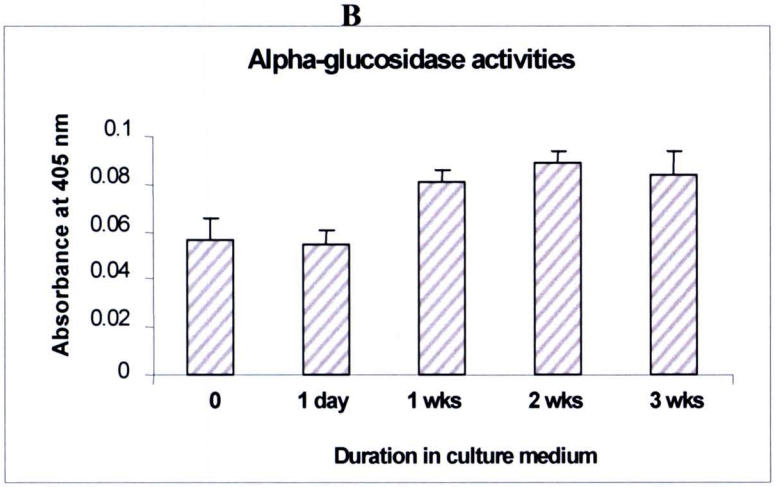


รูปที่ 39 ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 35 mm dish ตั้งแต่เริ่มเลี้ยง (seeded cells) จนมีอายุ 3 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3-4 วัน

A



B



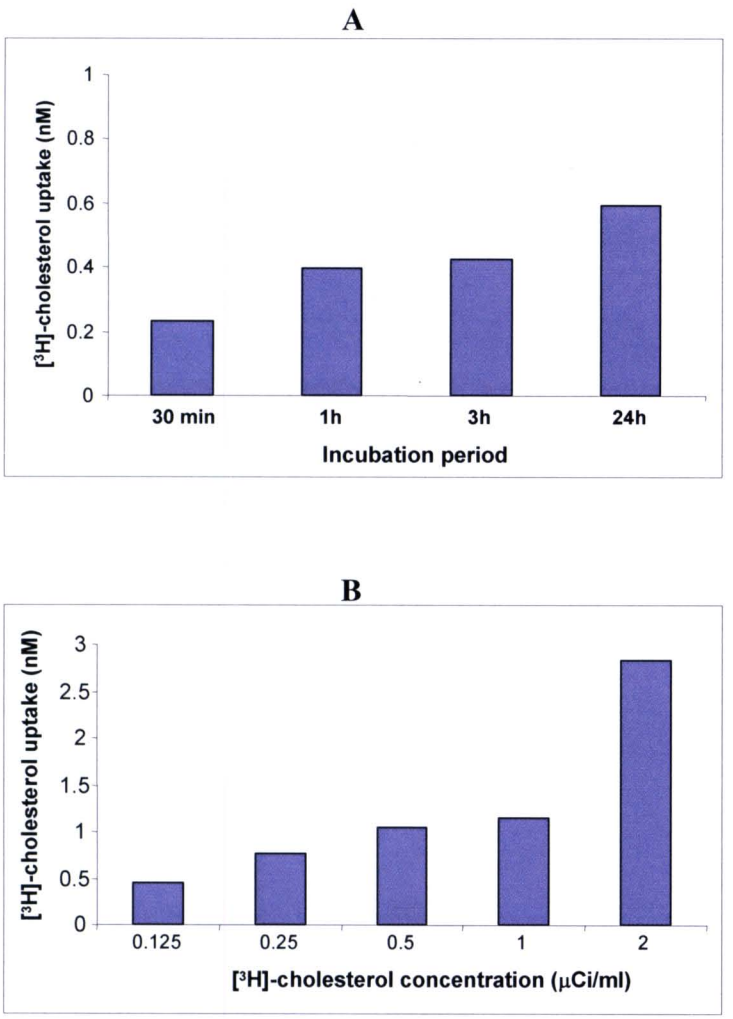
รูปที่ 40 การทดสอบการทำงานของ alkaline phosphatase และ α–glucosidase เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 35 mm culture dish เก็บเซลล์เมื่อได้อายุต่างๆกัน เตรียม cell lysate ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากันไปวัดการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase (A) และ α–glucosidase (B) ค่า absorbance ที่ได้เป็นค่า Mean±SEM จาก 3 การทดลอง

2. การทดลองเบื้องต้น (Preliminary study): การเพาะเลี้ยงเซลล์และหาสภาวะที่เหมาะสม

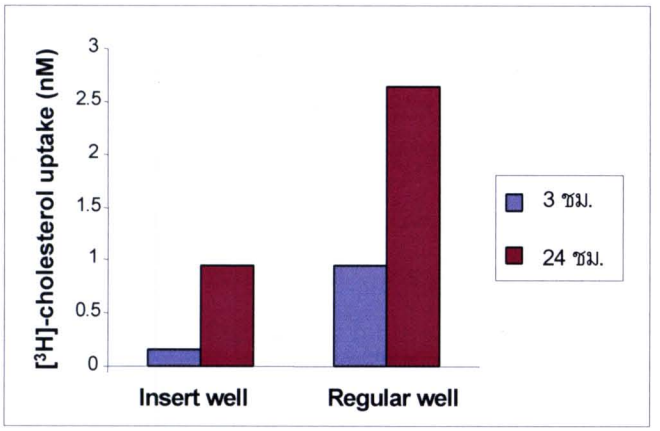
เนื่องจากโคเลสเตอรอลเป็นไขมันชนิดหนึ่ง จึงไม่สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้โดยตรง จึงต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของ cholesterol micelles ซึ่งจะประกอบด้วย taurocholate และ phosphatidylcholine ในเบื้องต้น ได้ทำการทดลองเพื่อหาสูตร micelles ที่เหมาะสมที่สามารถทำให้การนำเข้าโคเลสเตอรอลเกิดได้ดีที่สุด และพบว่า 2 mM taurocholate, 50 μM phosphatidylcholine, 1 μM cholesterol และ 1 μCi/ml [1,2-^{3}H] cholesterol ให้ผลการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ดีที่สุด (ไม่ได้แสดงรายละเอียดการทดลอง) จึงเลือกสูตรดังกล่าว เพื่อทำการทดลองส่วนอื่นๆต่อไป

ในการหาวิธีวัด cholesterol uptake ที่เหมาะสม ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหา conditions ในการทดลอง โดยการปรับความเข้มข้นและเวลาในการเลี้ยงเซลล์ด้วย [1,2-^{3}H] cholesterol milcelles เพื่อศึกษาหารูปแบบของ dose- และ time-dependent cholesterol uptake ซึ่งข้อมูลที่ได้จะประกอบการตัดสินใจในการเลือก condition ที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อๆ ไป จากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ด้วย 1 μCi/ml [1,2-^{3}H] cholesterol milcelles ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 30 นาที ถึง 24 ชม. พบว่าระดับของ [1,2-^{3}H] cholesterol ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 41A) ผู้วิจัยจึงพิจารณาเลือกระยะเวลา 3 ชม. สำหรับการทดลองต่อๆไป เนื่องจากระดับของ cholesterol uptake สูงพอและไม่ต้องใช้ระยะเวลานาน จากนั้นได้ทำการทดสอบ cholesterol uptake เมื่อใช้ [1,2-^{3}H] cholesterol micelles ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อปริมาณ [1,2-^{3}H] cholesterol micelles ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น การนำเข้าก็เพิ่มมากขึ้น เป็นลักษณะของ dose-dependent uptake (รูปที่ 41B) จากผลการทดลอง ผู้วิจัยพิจารณาเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 1 μCi/ml [1,2-^{3}H] cholesterol สำหรับการทดลองต่อๆไป

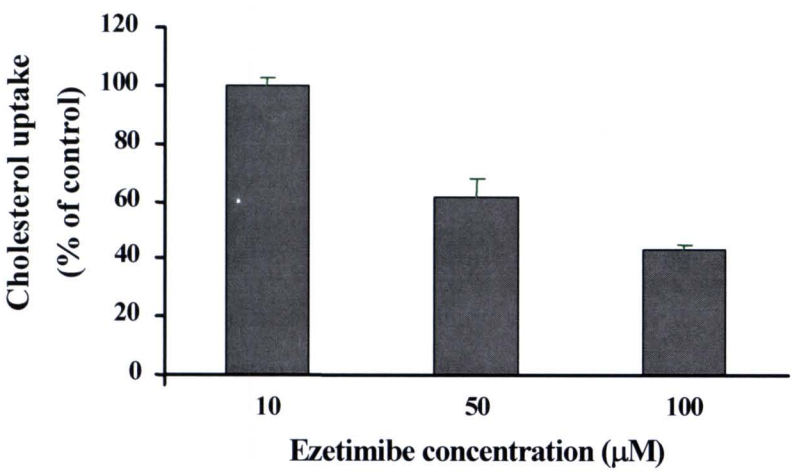
ต่อมา เพื่อทดสอบว่าการวัด cholesterol uptake เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนเดียวกับ cholesterol absorption ผู้วิจัยจึงทดลองเปรียบเทียบการดูดซึมโคเลสเตอรอลเมื่อเลี้ยงเซลล์บน insert well และการนำเข้าโคเลสเตอรอลเมื่อเลี้ยงเซลล์บน regular well ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ [1,2-^{3}H] cholesterol ที่เข้าเซลล์และที่ซึมผ่าน insert well เป็นสัดส่วนเดียวกัน และเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเลี้ยงเซลล์ด้วย [1,2-^{3}H] cholesterol (รูปที่ 42) ดังนั้น การทดลองฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล อาจทำได้โดยการวัดการยับยั้ง [1,2-^{3}H] cholesterol ที่ซึมผ่าน insert well โดยตรง หรืออาจสามารถประเมินโดยการยับยั้งการนำ [1,2-^{3}H] cholesterol เข้าเซลล์ เนื่องจากก่อนโคเลสเตอรอลจะซึมผ่าน ต้องสามารถเข้าเซลล์ได้ก่อน ดังนั้น การที่โคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลดลง จึงเป็นการบอกได้ว่าการดูดซึมผ่านจะลดลงด้วย นอกจากนี้ ระดับของ radioactivity ที่วัดได้ภายในเซลล์จะมีค่าสูงกว่าระดับของ radioactivity ที่ผ่าน insert well มาก ผลการทดลองจึงให้ค่าที่มีความแปรปรวนต่ำกว่าการใช้ insert well ดังนั้น การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของซิริซิน ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบโดยประเมินการยับยั้งการนำเข้าโคเลสเตอรอลเซลล์



รูปที่ 41 การนำเข้าของโคเลสเตอรอล (cholesterol uptake) ในเซลล์ Caco-2 เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 24 well culture plate เมื่อเซลล์อายุ 14 วัน เปลี่ยนเป็นเลี้ยงเซลล์ใน serum-free medium ที่มี cholesterol micelles ที่มี [1,2-^{3}H] cholesterol **A.** ใช้ [1,2-^{3}H] cholesterol ที่ความเข้มข้น 1 μCi/ml เป็นเวลา 30 นาที, 1, 3 และ 24 ชม. **B.** ใช้ [1,2-^{3}H] cholesterol ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 μCi/ml ที่เวลา 3 ชม. หลังจากสิ้นสุดการทดลองนำ cell lysates ไปวัดค่า radioactivity



รูปที่ 42 เปรียบเทียบการนำเข้าของโคเลสเตอรอลใน insert และ regular well เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน serum-free medium ที่มี 1 μCi/ml [1,2-^{3}H] cholesterol micelles ใน insert well และ regular well เป็นเวลา 3 หรือ 24 ชม. จากนั้นวัดระดับขอบ [1,2-^{3}H] cholesterol ใน basolaterol medium สำหรับ insert well และวัดใน cell lysate สำหรับ regular well



รูปที่ 43 ผลของ ezetimibe ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เลี้ยง differentiated Caco-2 cells ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ezetimibe ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μM เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นทดสอบการนำเข้าของ [^{3}H] cholesterol ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SEM จาก 3 การทดลอง

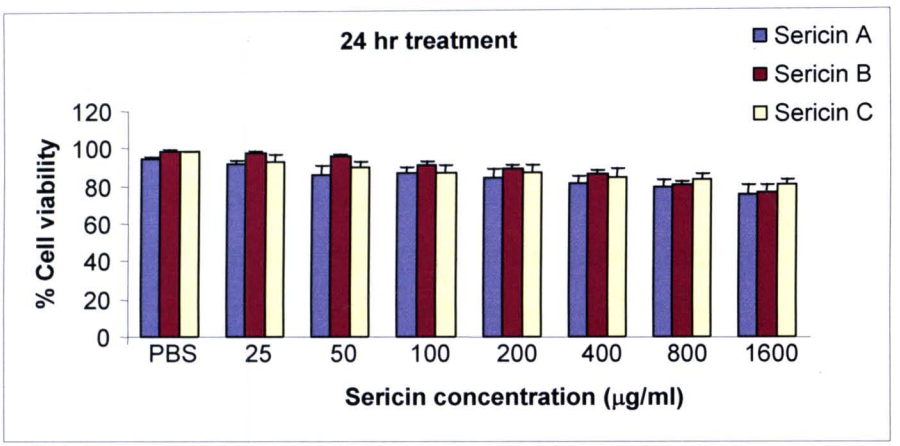
3. ผลของ Ezetimibe ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2

เพื่อยืนยันว่าวิธีการวัด cholesterol uptake นี้ เป็นวิธีที่เหมาะสม ผู้วิจัยได้ทดสอบสารที่มีรายงานยืนยันแล้วว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล ซึ่งได้แก่ยา ezetimibe ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 43 โดยพบว่า ezetimibe มีผลลดการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้ ซึ่งจะขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ โดยที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถยับยั้งการนำเข้าของโคเลสเตอรอลประมาณ 55% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การนำเข้าของ [1,2-^{3}H] cholesterol นี้ถูกยับยั้งได้ด้วย ezetimibe และการยับยั้งเป็นแบบ dose-dependence ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมหรือนำเข้าโคเลสเตอรอลต่อไป ผู้วิจัยจะใช้ ezetimibe เป็น positive control ในการทดลองต่อๆ ไป

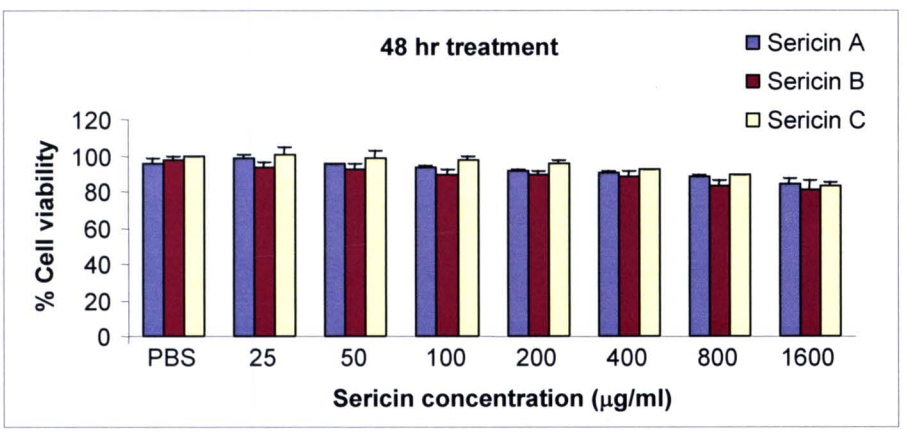
4. ผลของซิริซินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2

ก่อนที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของซิริซิน จำเป็นต้องทดสอบเบื้องต้นถึงผลของซิริซินที่อาจมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 จึงทำการทดลองโดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิริซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-1600 μg/ml เป็นเวลานาน 24, 48 และ 72 ชม. โดยการทดลองนี้ผู้วิจัยทดสอบผลของซิริซิน 3 ชนิด คือ ซิริซิน A, B และ C ซึ่งมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน โดยซิริซิน A (MW 191-339 kDa) ซิริซิน B (MW 76-132 kDa) ซิริซิน C (MW 61-113 kDa) โดยจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (cell viability) หลังจากการเลี้ยงด้วยซิริซินจะถูกวัดด้วยวิธี MTT assay และคำนวณเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (ไม่มีซิริซิน) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 44 โดยซิริซิน A, B และ C ที่ทุกความเข้มข้นไม่ทำให้เซลล์ตายอย่างเด่นชัด แต่ที่ความเข้มข้นสูงๆ (800 และ 1600 μg/ml) มีแนวโน้มทำให้เซลล์ตายได้บางส่วน (ประมาณ 15-20%) สำหรับช่วงระยะเวลาต่างๆ (24, 48 และ 72 ชม.) ที่ใช้ในการทดสอบไม่แสดงผลที่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล จะทำการทดสอบที่ 3 ชม. เป็นหลัก ซึ่งซิริซินไม่มีผลทำให้เซลล์ตายในช่วงระยะเวลาสั้นๆนี้

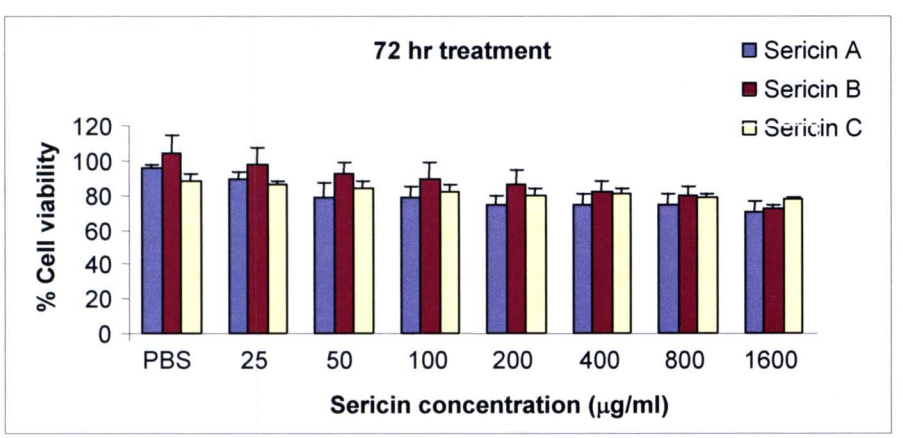
A



B



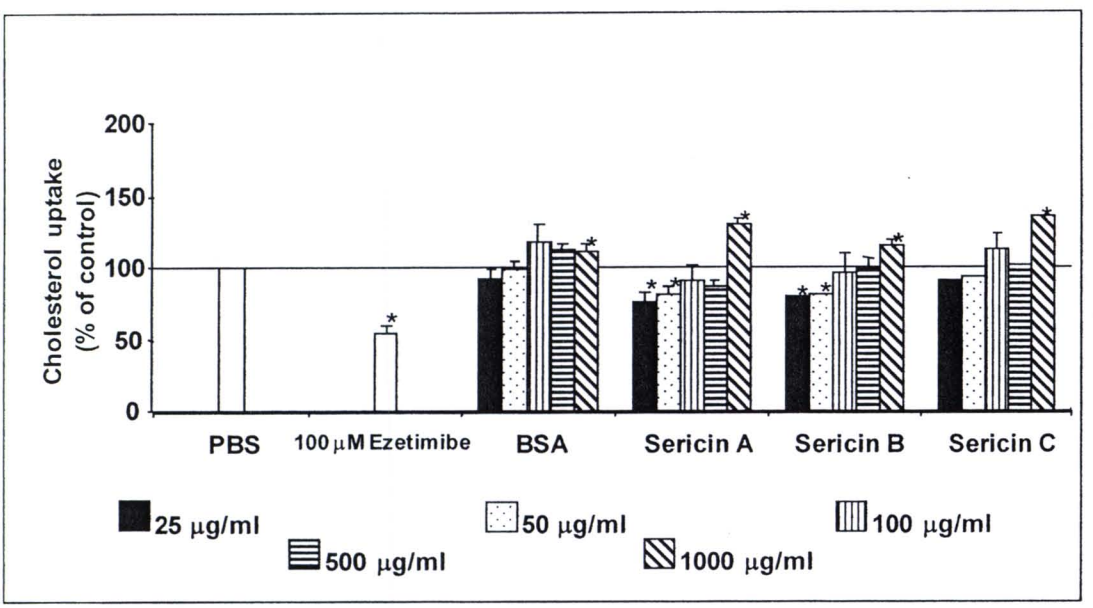
C



รูปที่ 44 ผลของซิริซินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิริซินชนิดต่างๆ คือ A, B และ C ที่ความเข้มข้น 0-1600 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชม. วัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay แสดงค่าเป็น Mean±SEM จากการทดลอง 3 ครั้ง

5. ผลของซิริซินต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2

จากการทดสอบฤทธิ์ของซิริซินในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 ทำโดยทดสอบด้วยซิริซินที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1000 μg/ml และทดสอบซิริซิน 3 ชนิด (A, B และ C) ผลการทดลองพบว่าซิริซินที่ความเข้มข้นต่ำๆ เช่น 25 และ 50 μg/ml มีแนวโน้มที่จะลดการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้ดีกว่าซิริซินที่ความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะซิริซิน A และ B สามารถลดการนำเข้าโคเลสเตอรอลได้ประมาณ 20-30 % (cholesterol uptake ~ 70-80%) และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ซึ่งในที่นี้ใช้ PBS) ดังแสดงในรูปที่ 45 แต่ซิริซิน C เห็นผลลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าแปลกใจที่เมื่อใช้ซิริซินที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดยเฉพาะที่ 1000 μg/ml กลับทำให้การนำเข้าโคเลสเตอรอลมีค่าเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบได้กับซิริซินทั้ง 3 ชนิด ในการทดลองนี้ ได้ทำการเปรียบเทียบกับ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งใช้เป็น control protein ผลการทดลองพบว่า BSA ไม่มีฤทธิ์ลดการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 แต่ที่ความเข้มข้นสูงก็พบแนวโน้มการเพิ่มการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้เช่นเดียวกับซิริซิน



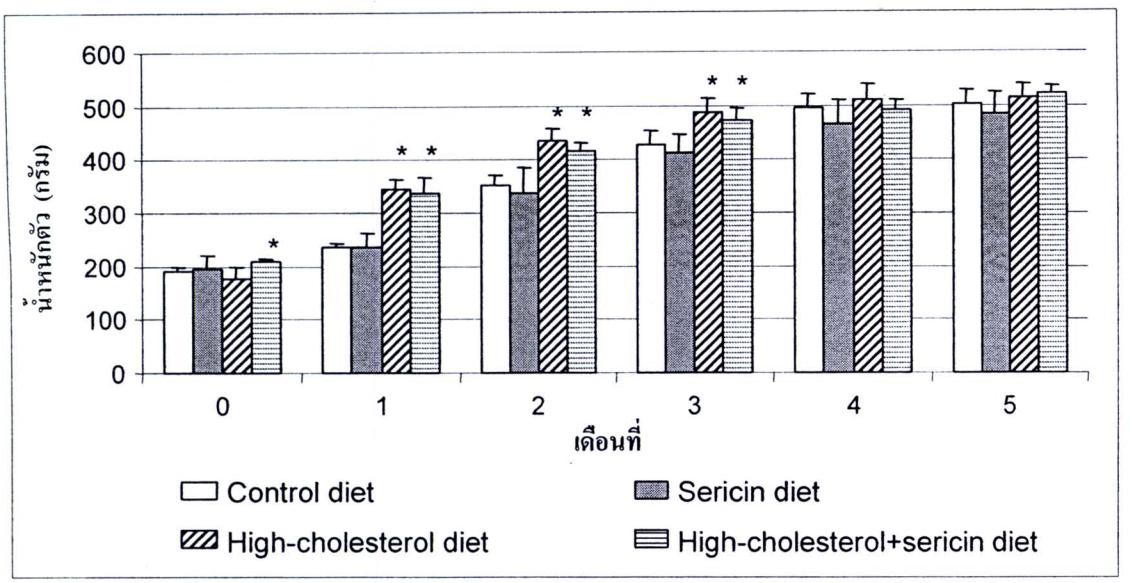
รูปที่ 45 ผลของซิริซินต่อการนำเข้าโคเลสเตอรอลในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เลี้ยง differentiated Caco-2 cells ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี [^{3}H] cholesterol micelles ร่วมกับซิริซิน A, B, C และ BSA ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 500 และ 1000 μg/ml เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นทดสอบการนำเข้าของ [^{3}H] cholesterol ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SEM, * แสดงค่า p-value ≤ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ PBS ในการทดลอง

6. ผลของซิริซินต่อน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินของหนูทดลอง

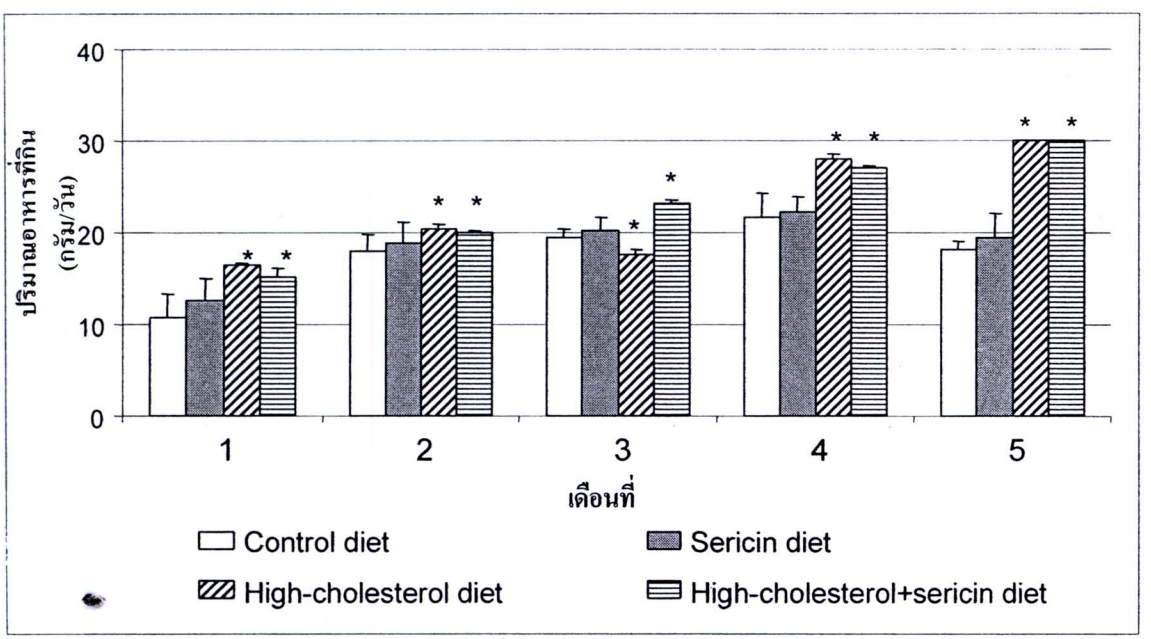
การทดลอง โดยให้หนูทดลองได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง (high cholesterol diet) ร่วมกับซิริซินหรือโปรตีนควบคุม ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ casein ผลการทดลองที่แสดงนี้เป็นผลที่รวบรวมในช่วงระยะเวลา 5 เดือน ที่ได้ปรับลงมาการแผนปฏิบัติการเดิมที่คาดว่าจะต้องใช้ระยะเวลาในการทดลองทั้งหมดนาน 6 เดือน

จากการบันทึกน้ำหนักตัวของหนูทดลองและปริมาณอาหารที่หนูทดลองกินแต่ละกลุ่ม ได้ผลดังรูปที่ 46 และ 47 ผลการทดลอง พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงทั้ง 2 กลุ่ม (กลุ่มที่ 3 และ 4) มีแนวโน้มที่จะมีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติที่ไม่มีโคเลสเตอรอล (กลุ่มที่ 1 และ 2) โดยเฉพาะในช่วง 3 เดือนแรก (รูปที่ 46) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการกินอาหารในปริมาณที่สูงกว่า โดยหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงนี้ (ทั้งกลุ่ม 3 และ 4) มีการกินอาหารในปริมาณที่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (ทั้งกลุ่ม 1 และ 2) อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 47)

จากผลการทดลอง มีข้อสังเกตที่น่าสนใจ โดยเมื่อเปรียบเทียบหนูทดลองที่ได้รับอาหารประเภทเดียวกัน (กลุ่ม 1 กับ 2 และกลุ่ม 3 กับ 4) จะพบว่า กลุ่มที่ได้รับซิริซิน จะมีน้ำหนักที่ต่ำกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อคำนวณเป็นการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักในช่วงตลอดระยะเวลา 5 เดือนจากเมื่อเริ่มต้นทำการทดลอง พบว่า กลุ่มที่ได้รับซิริซินไม่ว่าจะเป็นการให้ร่วมกับอาหารปกติ หรืออาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่า ดังแสดงในตารางที่ 23 โดยทั้งกลุ่มที่ได้รับซิริซินและไม่ได้รับซิริซิน กินอาหารในปริมาณที่เท่าๆกัน คือประมาณ 20 กรัม สำหรับกลุ่มกินอาหารปกติ และ 30 กรัม สำหรับกลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง (ตารางที่ 24) จากข้อสังเกตนี้ แสดงให้เห็นว่า ซิริซิน อาจมีผลลดอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูทดลองได้



รูปที่ 46 น้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับอาหารชนิดต่างๆ ทำการบันทึกน้ำหนักตัวของหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่ม ในช่วงระยะเวลา 5 เดือน ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD, * แสดงค่า p-value ≤ 0.5 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในที่นี้ใช้ casein แทนซิริซินเป็น control diet



รูปที่ 47 ปริมาณอาหารที่หนูทดลองกิน ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่หนูทดลองในแต่ละกลุ่มกินในช่วงระยะเวลา 5 เดือน ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD, * แสดงค่า p-value ≤ 0.5 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในที่นี้ใช้ casein แทนซิริซินเป็น control diet

ตารางที่ 23 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูทดลอง

ชนิดของอาหาร	น้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง (กรัม)				
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5
1. Control diet	47.71±11.19	163.29±9.47	236.21±18.59	307.17±19.99	313.08±23.08
2. Sericin diet	40.50±8.12	142.75±30.60	217.00±17.04	271.50±25.52*#	289.68±19.14
3. High cholesterol diet	170.50±16.65*	258.17±35.70*	312.33±32.64*	335.50±33.36	339.50±31.79
4. High cholesterol					
+ sericin diet	126.50±30.26*#	203.83±14.82*#	263.33±18.12*#	280.67±19.72*#	308.67±16.91

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean±SD

*$p<0.05$ เปรียบเทียบกับ control diet

# $p<0.05$ เปรียบเทียบระหว่างอาหารประเภทเดียวกันที่มี/ไม่มีซิริซิน (1 กับ 2, 3 กับ 4)

บันทึกน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น ในช่วงระยะเวลา 5 เดือน

ตารางที่ 24 ปริมาณอาหารที่หนูทดลองกิน

ชนิดของอาหาร	ปริมาณอาหาร (กรัม)				
	เดือนที่1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่5
1. Control diet	10.73±2.58	17.90±2.00	19.37±0.95	21.59±2.67	18.21±0.92
2. Sericin diet	12.52±2.38	18.88±2.26	20.10±1.61	22.21±1.64	19.37±2.67
3. High cholesterol diet	16.43±0.27*	20.42±0.43*	17.55±0.65*	28.03±0.54*	30.00±0.00*
4. High cholesterol					
+ sericin diet	15.25±0.83*#	19.92±0.20*#	23.09±0.40*#	27.13±0.05*#	30.00±0.00*

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean±SD

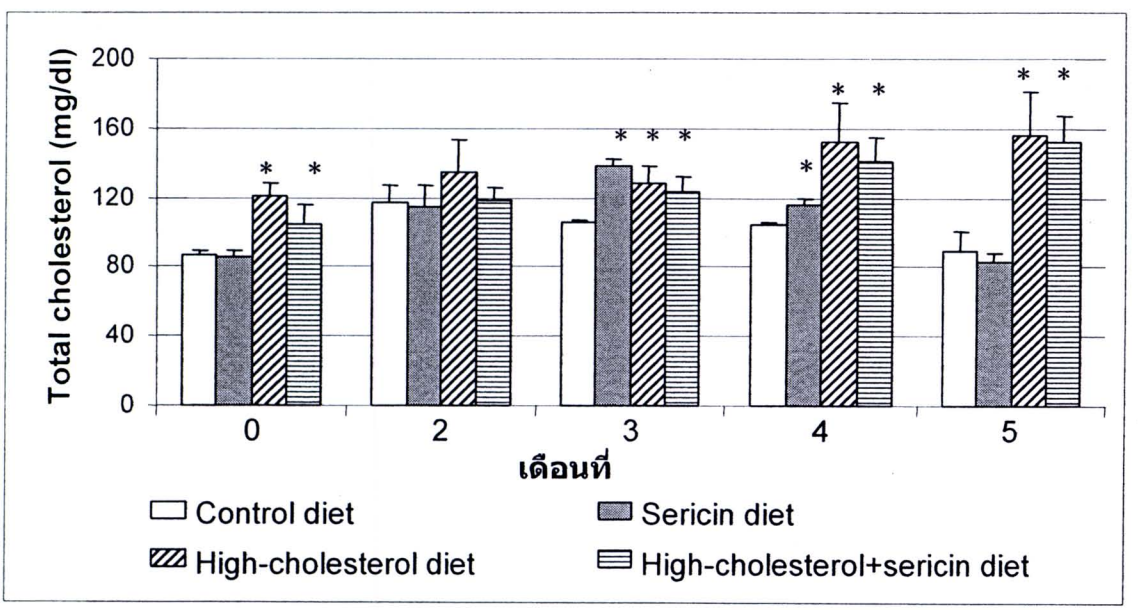
*$p<0.05$ เปรียบเทียบกับ control diet

# $p<0.05$ เปรียบเทียบระหว่างอาหารประเภทเดียวกัน (1 กับ 2, 3 กับ 4)

7. ผลของซิริซินต่อระดับของไขมันในเลือดของหนูทดลอง

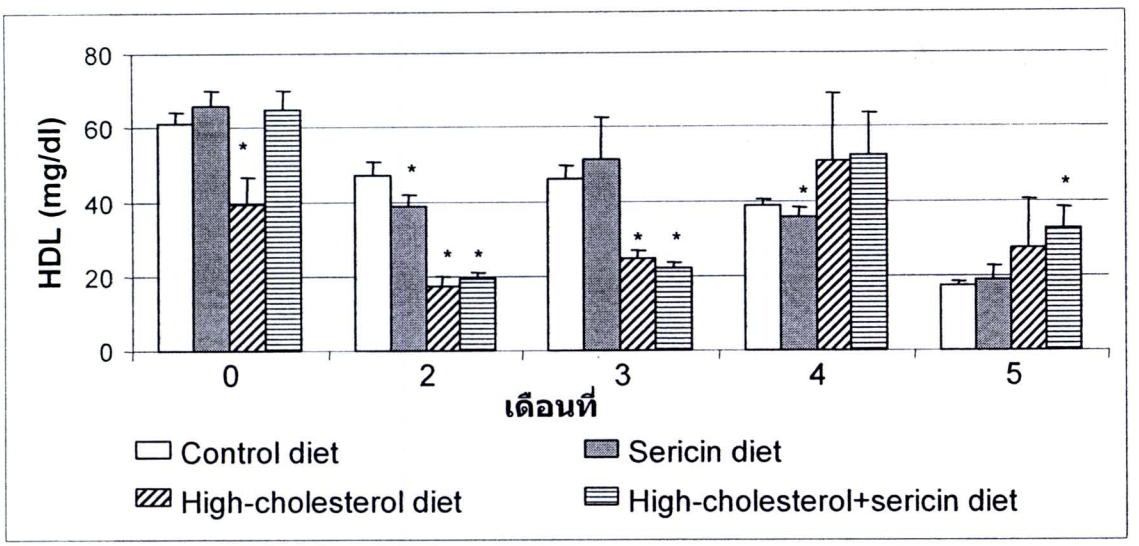
การทดลองนี้ หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับอาหารปกติและอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง (high-cholesterol diet) ตามรายละเอียดที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง โดยใช้อาหารที่มี 1% โคเลสเตอรอล และ 4% ซิริซิน โดยหนูแต่ละตัวจะได้รับโคเลสเตอรอลเฉลี่ยประมาณ 300 mg/day และซิริซินประมาณ 1.2 g/day ทำการเลี้ยงหนูเป็นระยะเวลา 5 เดือน หนูจะได้รับการเจาะเลือดที่หางและวัดระดับของ total cholesterol, HDL และ triglyceride เป็นระยะๆ โดยต้องทำการอดอาหารและน้ำก่อนทำการเจาะเลือด 1 คืน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 48 พบว่า หนูกลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง (high cholesterol diet) จะมีระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูงขึ้นเรื่อยๆ เป็นลำดับ โดยในเดือนที่ 5 จะมีค่าประมาณ 150 mg/dl และเมื่อให้อาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงร่วมกับซิริซิน พบว่า ซิริซินไม่แสดงผลในการเปลี่ยนแปลงค่าของโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูทดลอง

นอกจากระดับโคเลสเตอรอลในเลือดแล้ว ได้ทำการวัดระดับของ HDL และ triglyceride ในเลือดของหนูทดลองทุกกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 49A และ 49B ซึ่งค่าของ triglyceride ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ส่วนค่า HDL พบว่า มีความแปรปรวนสูง และไม่อาจสรุปผลได้ ณ จุดนี้

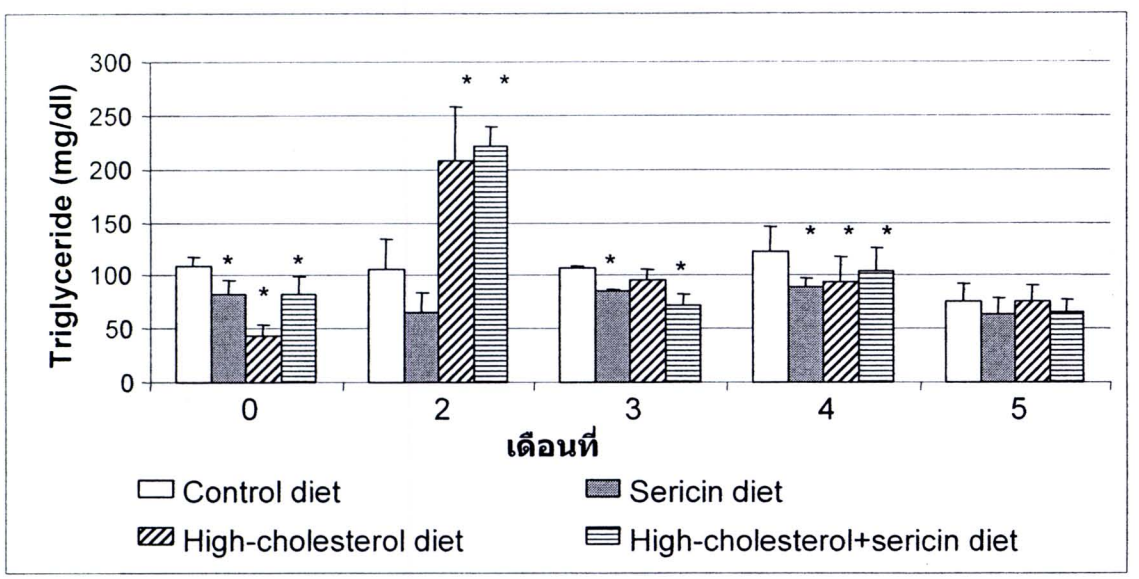


รูปที่ 48 ระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับอาหารประเภทต่างๆ หลังจากให้อาหารประเภทต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 เดือน ได้ทำการวัดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูทดลองเป็นระยะๆ ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD, * แสดงค่า p-value ≤ 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในที่นี้ใช้ casein แทนซิริซินเป็น control diet

A



B



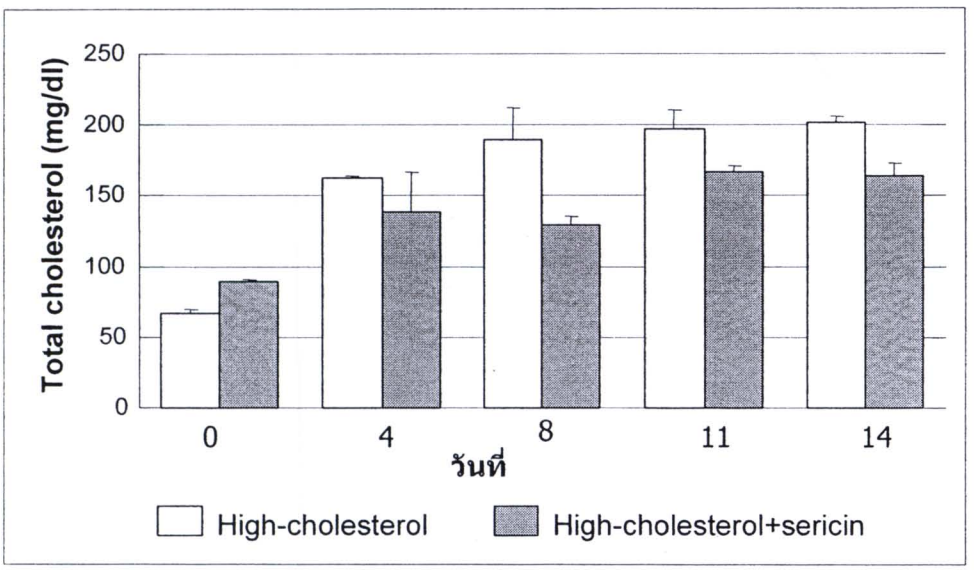
รูปที่ 49 ระดับของ HDL และ triglyceride ในเลือดของหนูทดลอง หลังจากให้อาหารประเภทต่างๆ เป็นระยะเวลา 5 เดือน ได้ทำการวัดระดับ HDL (A) และ triglyceride (B) ในเลือดของหนูทดลองเป็นระยะๆ ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD, * แสดงค่า p-value ≤ 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งในที่นี้ใช้ casein แทนซิริซินเป็น control diet

8. ผลของซิริซินต่อระดับของไขมันในเลือดของหนูทดลอง (โดยการป้อน)

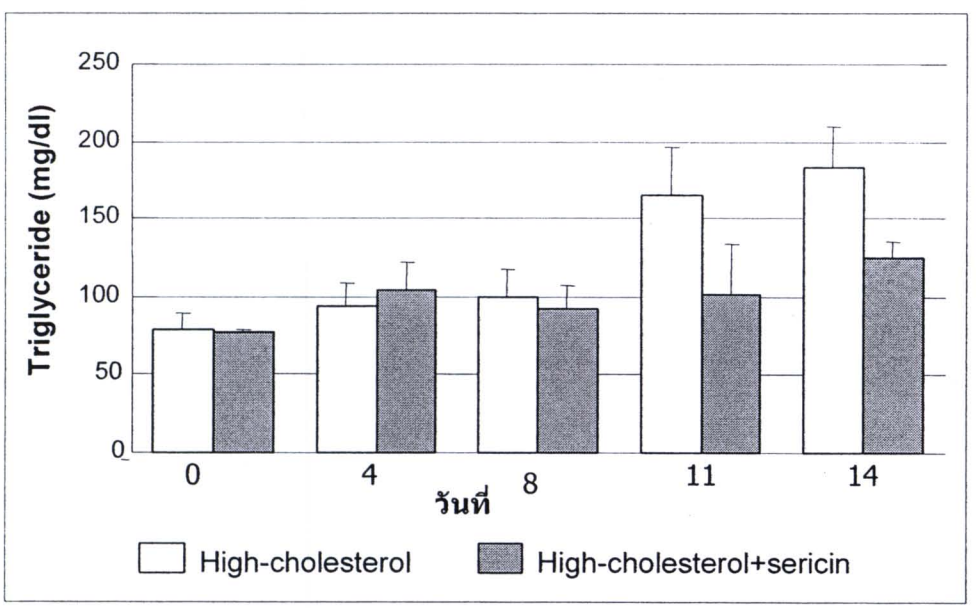
เนื่องจากในการทดลองทำการให้อาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงแก่หนูทดลองที่แสดงผลการทดลองก่อนหน้านี้ ทำได้โดยผสมโคเลสเตอรอลและซิริซินลงในอาหารหนูโดยตรงและทำเป็นอาหารเม็ดเพื่อให้หนูทดลองกินแทนอาหารเม็ดปกติเป็นเวลา 5 เดือน ซึ่งผลการทดลอง ดังแสดงข้างต้น แม้ว่าระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่ในระยะเวลา 5 เดือน ระดับที่เพิ่มขึ้นนี้ยังไม่สูงมากนัก (serum total cholesterol ~ 150 mg/dl) และยังพบว่าค่าของ HDL และ triglyceride มีความแปรปรวนสูง นอกจากนี้ ซิริซินยังไม่เห็นผลในการลดระดับของโคเลสเตอรอล ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความคงตัวของซิริซินที่ผสมอยู่ในอาหารหนูทดลอง หรือความสามารถในการละลายของซิริซินจากอาหารเม็ดเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงได้ปรับการทดลอง โดยการให้โคเลสเตอรอลและซิริซินที่เตรียมอยู่ในรูปของ emulsion โดยการป้อน เพื่อควบคุมให้หนูทดลองได้รับโคเลสเตอรอลและซิริซินในปริมาณที่คงที่ตามต้องการ และทดลองลดระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองเป็น 2 สัปดาห์

ในการทดลองเบื้องต้น (preliminary study) ได้ทำการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่จะใช้ป้อนหนูทดลอง โดยเตรียมโคเลสเตอรอลให้อยู่ในรูปของ emulsion ที่มีส่วนผสมของ coconut oil, bile salts, และน้ำ จนได้สูตรตามที่ระบุในวิธีการทดลอง โดยหนูจะได้รับโคเลสเตอรอลประมาณ 2% ของน้ำหนักอาหารที่ได้รับต่อวัน และทำการป้อนให้กับหนูเป็นระยะเวลา 14 วัน เนื่องจากการทดลองส่วนนี้เป็นการทดลองเบื้องต้น จึงใช้หนูทดลองจำนวนน้อย โดยได้แบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มที่ได้รับโคเลสเตอรอลและโคเลสเตอรอลร่วมกับซิริซิน และทำการเจาะเลือดที่หางและวัดระดับของ total cholesterol และ triglyceride เป็นระยะๆ โดยต้องทำการอดอาหารและน้ำก่อนทำการเจาะเลือด 1 คืน ผลการทดลอง พบว่า สูตรอาหารที่ใช้สามารถเพิ่มระดับโคเลสเตอรอลในเลือดหนูได้ ดังแสดงในรูปที่ 50 ซึ่งหนูกลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง (high cholesterol diet) จะมีระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูงขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลา โดยในวันที่ 14 มีค่า 201.72 mg/dl (ตารางที่ 25) แต่ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงร่วมกับซิริซิน โดยปริมาณของ ซิริซินที่ได้รับต่อวันคิดเป็น 2g/kg/day พบว่ามีระดับโคเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเช่นกัน แต่เพิ่มขึ้นในระดับที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับซิริซิน โดยในวันที่ 14 มีค่า 164.84 mg/dl (ตารางที่ 25) และเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของ triglyceride นั่นคือหนูกลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง (high cholesterol diet) จะมีระดับ triglyceride สูงขึ้นด้วย เนื่องจากหนูได้รับไขมันจาก coconut oil โดยระดับ triglyceride มีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากวันที่ 11 (รูปที่ 50, ตารางที่ 26) แต่ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงร่วมกับซิริซินกลับมีค่าที่ค่อนข้างจะคงที่ แสดงให้เห็นว่าการกินซิริซินขนาด 2g/kg/day มีแนวโน้มที่สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับโคเลสเตอรอลและ triglyceride ที่เกิดจากการให้อาหารไขมันแก่หนูทดลองได้

A



B



รูปที่ 50 ระดับของโคเลสเตอรอล และ triglyceride ในเลือดของหนูทดลอง ทำการป้อนโคเลสเตอรอลในรูป lipid emulsion ที่ไม่มีหรือมีซิริซิน แก่หนู 3 ตัว และทำการวัดระดับของโคเลสเตอรอล (A) และ triglyceride (B) ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD

ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของระดับ Total cholesterol ของหนูทดลอง

ชนิดของอาหาร	Total cholesterol (mg/dl)		
	เริ่มต้น	วันที่ 14	เปลี่ยนแปลง
High cholesterol diet	66.58±2.02	201.72±4.68	135.15±6.7
High cholesterol+sericin diet	88.94±2.09	164.84±7.84	75.89±5.75*

หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean±SD

*$p<0.05$ เปรียบเทียบกับ High-cholesterol diet

ตารางที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของระดับ Triglyceride ของหนูทดลอง

ชนิดของอาหาร	Triglyceride (mg/dl)		
	เริ่มต้น	วันที่ 14	เปลี่ยนแปลง
High cholesterol diet	78.68±11.26	183.24±27.04	104.55±40.40
High cholesterol+sericin diet	77.78±1.63	125.42±10.11	47.64±8.48*

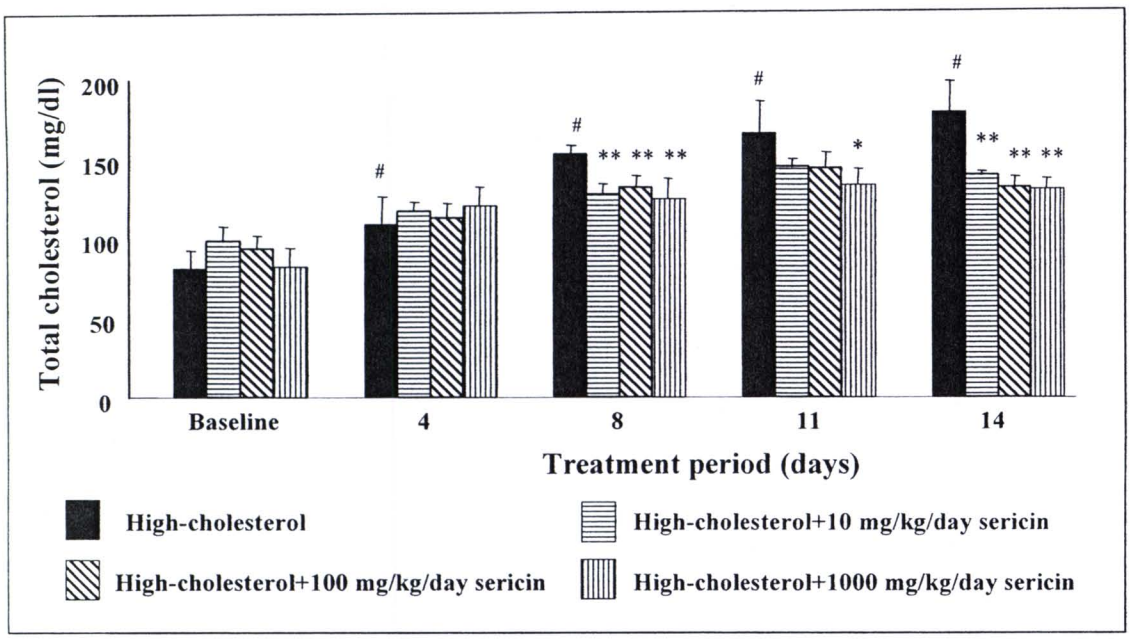
หมายเหตุ แสดงค่าเป็น Mean±SD

*$p<0.05$ เปรียบเทียบกับ High-cholesterol diet

จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่า สูตรอาหาร high cholesterol diet ในรูปของ lipid emulsion สามารถทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดหนูทดลองสูงขึ้นได้ และซิริซินขนาด 2 g/kg/day สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้ ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพิ่มเติม โดยใช้ซิริซินในขนาดที่ต่ำลง เนื่องขนาด 2 g/kg/day เป็นขนาดที่ค่อนข้างสูง โดยจะทดสอบที่ 3 ขนาด (doses) คือ 10, 100 และ 1000 g/kg/day และใช้หนู 5 ตัวต่อกลุ่ม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 51 พบว่า ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดหนูทดลองจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลา โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 4 ของการให้ high-cholesterol diet เมื่อเปรียบเทียบกับระดับเริ่มต้น (วันที่ 0) ในการทดลองนี้ ไม่มีการใช้หนูที่ไม่ได้รับ high-cholesterol diet เป็นกลุ่มควบคุม แต่ใช้ระดับโคเลสเตอรอลของหนู ณ จุดเริ่มต้นเป็นระดับควบคุม เพื่อลดจำนวนการใช้หนูทดลอง เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองระยะสั้น 14 วัน อายุหนูที่เปลี่ยนไปยังจะไม่มีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ดังนั้นจึงใช้ค่าที่ baseline (วันที่ 0) ในการเปรียบเทียบกับ treatment ต่างๆ ได้

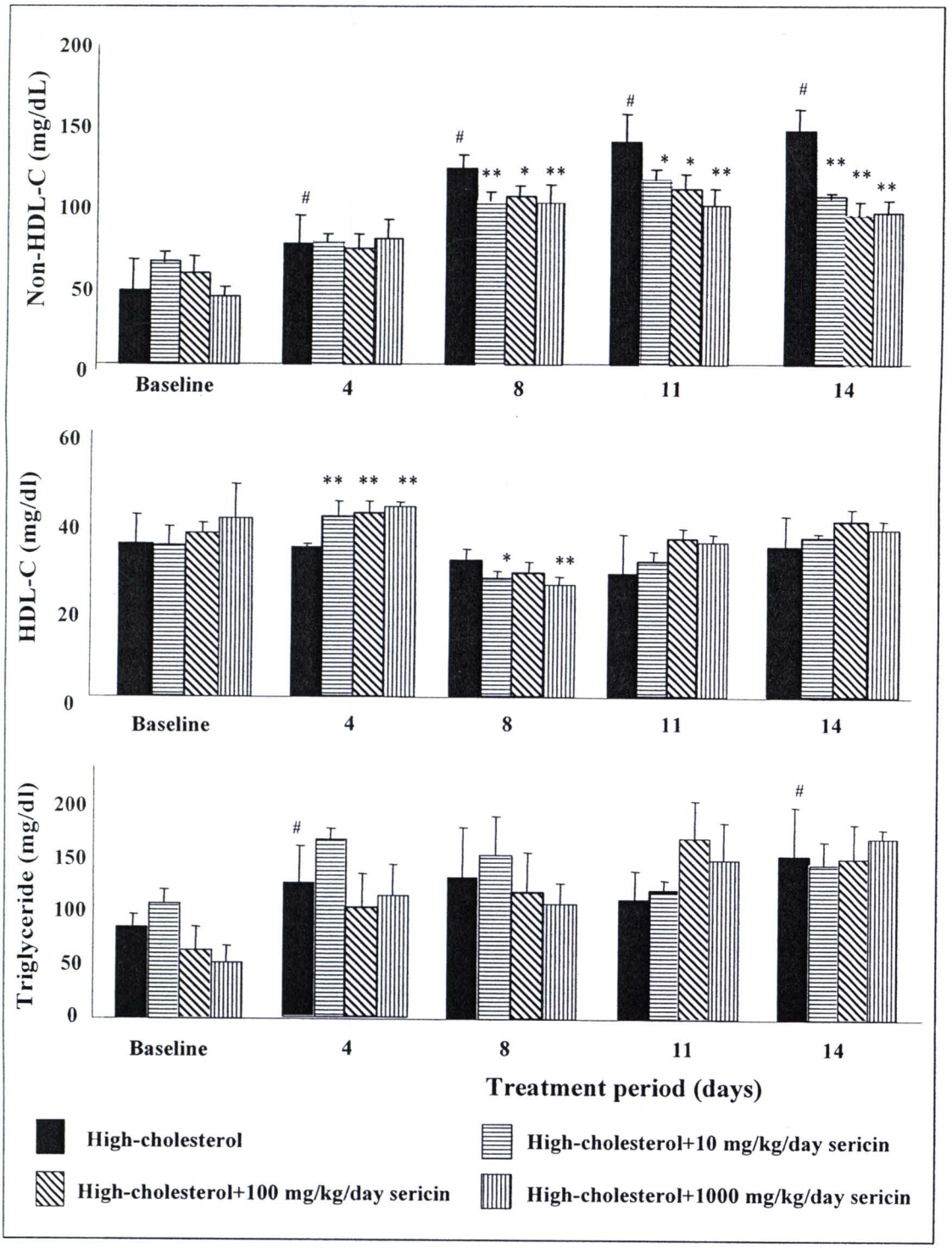
เมื่อเปรียบเทียบระดับ total cholesterol ในเลือดของหนูที่ได้รับ high-cholesterol diet ร่วมกับซิริซิน พบว่าระดับของ total cholesterol มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ high-cholesterol diet อย่างเดียว (รูปที่ 51) โดยซิริซินที่

ให้ทั้ง 3 ขนาด สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับโคเลสเตอรอลได้อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่ 8 ของการทดลอง โดยทั้ง 3 ขนาดมีประสิทธิภาพดีพอๆกัน dose-dependent effect ไม่ปรากฏชัดเจนมากนัก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ซิริซินสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับ total cholesterol ที่เกิดจากการได้รับ high-cholesterol diet ได้



รูปที่ 51 ระดับของ total cholesterol ในเลือดของหนูทดลอง ทำการป้อน high-cholesterol diet โดยเป็นโคเลสเตอรอลในรูป lipid emulsion ร่วมกับซิริซินขนาด 10, 100 และ 1000 g/kg/day ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD (# $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ baseline; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบกับ high-cholesterol, n =5)

การวัดระดับของ high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), non-HDL cholesterols และ triglyceride (TG) แสดงไว้ในรูปที่ 52 พบว่าระดับของ HDL cholesterols ไม่มีความแตกต่างกันมากนักในช่วง 14 วันของการทดลอง แม้ว่าในกลุ่มที่ได้รับซิริซินจะมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 4 ส่วน non-HDL cholesterol ซึ่งในที่นี้จะเป็นตัวแทนของ low density lipoprotein (LDL) เป็นส่วนใหญ่และ very low density lipoprotein (VLDL) บางส่วน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับ non-HDL cholesterol รวมทั้งผลของซิริซินต่อ lipoprotein ชนิดนี้จะสอดคล้องกับผลของ total cholesterol ระดับของ triglyceride ในเลือดของหนูทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก baseline และซิริซินไม่มีผลลดระดับของ triglyceride (รูปที่ 52) จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการให้ซิริซินร่วมกับ high-cholesterol diet จะมีผลลดระดับของ total cholesterol และ non-HDL cholesterol แต่ไม่มีผลต่อระดับของ HDL cholesterols และ triglyceride



รูปที่ 52 ระดับของ non-HDL, HDL cholesterol และ triglyceride ในเลือดของหนูทดลอง ทำการป้อน high-cholesterol diet โดยเป็นโคเลสเตอรอลในรูป lipid emulsion ร่วมกับซิริซินขนาด 10, 100 และ 1000 g/kg/day ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ค่าที่แสดงเป็นค่า Mean±SD (# $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ baseline; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบกับ high-cholesterol, n =5)

จากการทดลองนี้ หนูแต่ละกลุ่มกินอาหารในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 27) ระดับไขมันที่เปลี่ยนแปลงเกิดจากการให้ high-cholesterol diet ในรูป lipid emulsion ไม่ใช่เป็นผลมาจากปริมาณอาหารที่กิน นอกจากนี้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับของไขมันแต่ละชนิดของหนูแต่ละกลุ่ม โดยคิดเป็นค่าที่เปลี่ยนแปลงจากค่า baseline ของกลุ่มเอง ดังแสดงในตารางที่ 27 พบว่าการให้ high-cholesterol diet มีผลเพิ่มระดับ total cholesterol ได้ 97.45±31.52mg/dl ซึ่งค่าที่เพิ่มขึ้นทั้งหมดนี้น่าจะเป็น non-HDL cholesterol การได้รับซิริซินร่วมกับ high-cholesterol diet ส่งผลให้ระดับ total cholesterol และ non-HDL cholesterol ยังคงเพิ่มขึ้นจาก baseline แต่มีการเพิ่มขึ้นต่ำกว่าหรือประมาณ 50% ของการให้ high-cholesterol diet อย่างเดียว

ตารางที่ 27 การเปลี่ยนแปลงระดับของไขมันชนิดต่างๆในพลาสมาและปริมาณอาหารที่หนูกิน

Groups	Changes from day 0 (mg/dl)				Food intake (g/day/100g BW)
	Total cholesterol	HDL-C	Non-HDL-C	Triglyceride	
High cholesterol	97.45±31.52	-0.38±1.49	97.83±31.01	56.05±40.70	6.56±1.34
High cholesterol+ Sericin 10 mg/kg/day	41.06±7.59**	1.80±3.87	39.25±4.26**	30.71±29.00	6.18±0.29
High cholesterol+ Sericin 100 mg/kg/day	38.61±12.45**	2.64±4.80	35.97±16.84**	72.79±43.02	8.43±1.86
High cholesterol+ Sericin 1000 mg/kg/day	49.05±13.02*	-2.70±9.54	51.75±9.84*	97.87±16.61	7.52±0.51

Values are expressed as mean ± SD (n = 5)
Significantly different from high cholesterol group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

9. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity) ของซิริซิน

ผู้วิจัยทำการทดสอบในหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 110 – 130 กรัม โดยก่อนทำการทดลองจะให้น้ำและอาหารตามปกติ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจะทำการทดสอบตาม OECD guideline โดยเริ่มจากหนู 1 ตัว ด้วยการให้ซิริซินขนาดสูง 5 g/kg ของน้ำหนักตัวหนู โดยใช้เข็มป้อนสารทางปาก หลังจากนั้นสังเกตพฤติกรรมและบันทึกการตายของหนูทดลอง ในช่วง 24 ชม.แรก และทำการสังเกตพฤติกรรมต่ออีก 2 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าหนูยังมีชีวิตอยู่และมีพฤติกรรมปกติ จึงทำการทดลองซ้ำกับหนูทดลองอีก 2 ตัว ผลปรากฏว่าหนูทั้งสองตัวไม่มีเสียชีวิตหลังจากให้ซิริซินไป 2 สัปดาห์ (ตาม OECD guideline ถ้าหนูทั้งสามตัวไม่เสียชีวิตจากสารที่ได้รับ ให้สิ้นสุดการทดลองไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบต่อ) แม้ว่าจะใช้เกณฑ์การเสียชีวิตในการประเมินพิษเฉียบพลัน ผู้วิจัยได้ทำการเก็บเลือดหนูและส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบกับหนูปกติ (จำนวน 2 ตัว) ดังแสดงผลในตารางที่ 28 ซึ่งพบว่ามีค่าบางอย่างที่แตกต่างจากหนูปกติ เช่น ค่า ALT ในหนูตัวที่สาม และค่ากลูโคสของหนูตัวที่หนึ่งของกลุ่มที่ได้รับซิริซิน มีค่าสูง และค่า LDL ของหนูตัวที่ 2 และ 3 มีค่าต่ำ

กว่าหนูปกติ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทดสอบพิษเฉียบพลัน เป็นการใช้เกณฑ์การเสียชีวิตเป็นหลัก (หา lethal dose) ซึ่งจากการสังเกตตลอดระยะเวลา 2 สัปดาห์พบว่า หนูทั้งสามตัวที่ได้รับซิริซินขนาดสูงยังมีชีวิตอยู่และมีพฤติกรรมปกติ จึงสรุปได้ว่า ซิริซินมีค่า LD50 (50% lethal dose) มากกว่า 5000 mg/kg จึงจัดว่าซิริซินเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูงเมื่อให้ด้วยการรับประทาน

ตารางที่ 28 ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการหนูทดลองที่ได้รับซิริซิน (ขนาด 5000 mg/kg)

	หนูปกติ		**หนูได้รับซิริซิน**		
	1	**2**	**1**	**2**	**3**
alkaline phosphatase	109	89	120	93	78
SGOT(ALT)	107	169	201	123	*622*
SGPT(AST)	34	53	55	48	116
glucose	127	178	*384*	156	168
total cholesterol	87	68	80	72	73
triglyceride	89	89	101	61	106
HDL	57	63	73	57	50
LDL	12.2	12.8	13.2	*2.8*	*1.8*
BUN	19	19	24	18	22
creatinine	0.2	0.4	0.5	0.3	0.4
uric acid	1	1.7	*6.8*	1.4	2.3

10. การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity) ของซิริซิน

แม้ว่าซิริซินจะมีความปลอดภัยสูง (LD50 > 5000 mg/kg) ซึ่งเป็นการทดสอบการได้รับซิริซินขนาดสูงเพียงครั้งเดียว แต่ข้อมูลดังกล่าวไม่อาจบอกได้ถึงความปลอดภัยหรือผลกระทบของซิริซินที่อาจมีต่อการทำงานของระบบหรืออวัยวะต่างๆของร่างกายเมื่อได้รับในขนาดปกติเป็นเวลานาน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้จะได้จากการศึกษาพิษเรื้อรังของซิริซิน โดยจะทำการประเมินค่าทางห้องปฏิบัติการของตัวอย่างเลือดหนูทดลองที่ได้รับซิริซินเป็นเวลานาน 5 เดือนเปรียบเทียบกับหนูปกติ

หลังจากเลี้ยงหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีซิริซิน (4%) เป็นส่วนประกอบ โดยหนูได้รับปริมาณซิริซินประมาณ 0.8-1.2 g/day ซึ่งคำนวณจากปริมาณอาหารที่หนูกินโดยเฉลี่ย 20-30 g/day ขึ้นกับอายุของหนู โดยให้เลี้ยงหนูเป็นเวลานาน 5 เดือน พบว่า หนูทดลองทุกตัวมีชีวิตอยู่ และมีพฤติกรรมปกติ ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่ม

ควบคุม ซึ่งหลังจาก 5 เดือน ได้ทำเจาะเลือดและตรวจวัดค่าทางห้องปฏิบัติการ (ส่งตรวจที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร) ได้ผลดังตารางที่ 29 ซึ่งพบว่าค่าต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ซิริซินเป็นสารที่ปลอดภัย ไม่มีพิษเรื้อรัง เมื่อทดสอบในหนูทดลองสายพันธ์ Sprague Dawley

ตารางที่ 29 ผลการตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการของเลือดที่ได้จากหนูทดลองที่ได้รับซิริซินนาน 5 เดือน (n = 6)

ค่าที่ทำการตรวจวัด	Control diet	Sericin diet
ALP(u/l)	46±4.80	48±14.20
AST(u/l)	225±114.25	255±132.29
ALT(u/l)	59±24.32	63±22.15
LDH(u/l)	2429±680.99	2140±662.83
Glucose(mg/dl)	142±27.93	136±20.68
Cholesterol(mg/dl)	104±8.66	91±13.16
Triglycerides(mg/dl)	67±31.76	72±14.77
HDL(mg/dl)	86±11.75	78±15.11
LDL(mg/dl)	6.27±3.61	2.87±11.47
BUN(mg/dl)	27±2.80	25±2.19
Creatinine(mg/dl)	0.52±0.12	0.48±0.12
Uric acid(mg/dl)	1.67±0.43	1.83±0.56
White blood cell	2.71±1.05	2.46±0.87
Red blood cell	8.64±0.60	8.22±0.55
Neutrophil	0.34±0.23	0.53±0.18
Lymphocyte	1.96±0.84	1.68±0.67
Monocyte	0.20±0.10	0.14±0.05
Eosinophil	0.05±0.02	0.10±0.11
Basophil	0.02±0.03	0.015±0.02

หมายเหตุ : ALP- Alkaline phosphatase; AST- Aspartate Aminotransferase; ALT- Alanine Aminotransferase; LDH-Lactate dehydrogenase; HDL-High density lipoprotein; LDL-Low density lipoprotein; BUN-Blood urea nitrogen

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การดูดซึมโคเลสเตอรอลผ่านเซลล์ Caco-2 monolayer สามารถประเมินได้ 2 แบบ คือ 1) การวัดการดูดซึมโคเลสเตอรอล (cholesterol absorption) ซึ่งเป็นการใช้ insert well คือ ทำการเลี้ยงเซลล์บน membrane ที่กั้นระหว่างอาหารเลี้ยงเซลล์ด้านบน (apical side) และอาหารเลี้ยงเซลล์ด้านล่าง (basolateral side) ใส่โคเลสเตอรอลด้านบน และติดตามการซึมผ่านเซลล์และ membrane ลงมาด้านล่าง 2) การวัดการนำเข้าโคเลสเตอรอล (cholesterol uptake) โดยเลี้ยงเซลล์บน plate ทั่วไปและติดตามปริมาณโคเลสเตอรอลที่เข้าไปในเซลล์โดยตรง วิธีแรกจะมีความยุ่งยากและใช้ต้นทุนสูง เนื่องจากต้องใช้ insert well เฉพาะ ส่วนวิธีหลังมีความสะดวกมากกว่าต้นทุนต่ำกว่า จึงเหมาะกับงาน screening หรือการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งปริมาณของ cholesterol absorption หรือปริมาณการดูดซึมโคเลสเตอรอลพบว่ามีความสัมพันธ์กับ ปริมาณ cholesterol uptake หรือโคเลสเตอรอลที่เข้าไปสะสมในเซลล์

เนื่องจากโคเลสเตอรอลเป็นไขมันชนิดหนึ่ง จึงไม่สามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้โดยตรง จึงต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของ cholesterol micelles ซึ่งจะประกอบด้วย taurocholate และ phosphatidylcholine ก่อนนำไปใช้ และในการทดลองนี้ใช้เซลล์ differentiated Caco-2 อายุ 2-3 สัปดาห์ในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นชั้นของเซลล์ที่คล้ายกับเซลล์ผนังลำไส้เล็กของมนุษย์ (Cogburn, et al., 1991)

โดยได้ทำการทดสอบ cell differentiation ของ Caco-2 ที่พัฒนาเป็น monolayer ด้วยการวัดการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด (Hidalgo, et al., 1989) ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการวัดการทำงานของ alkaline phosphatase และ α-glucosidase และพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นใน Caco-2 monolayer ที่อายุ 2-3 สัปดาห์ในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการ differentiation ของเซลล์เพาะเลี้ยง และจากการทดสอบเบื้องต้นในการวัดการดูดซึมโคเลสเตอรอล โดยใช้ radioactive-labeled cholesterol พบว่า การดูดซึมโคเลสเตอรอล (cholesterol absorption) ผ่าน insert well มีค่าเป็นสัดส่วนเดียวกับการนำเข้าโคเลสเตอรอล (cholesterol uptake) ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะทดสอบเบื้องต้นโดยการวัดการนำเข้าโคเลสเตอรอล เนื่องจากค่า radioactivity มีค่าที่สูงชัดเจนในเวลา 3 ชม. และมีต้นทุนการดำเนินการน้อยกว่ามาก

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่า การนำเข้าโคเลสเตอรอล มีลักษณะเป็น dose- และ time-dependent uptake และยังพบว่าการนำเข้านี้สามารถยับยั้งได้ด้วย ezetimibe โดย ezetimibe ที่ความเข้มข้น 100 μM มีฤทธิ์ยับยั้งการนำเข้าโคเลสเตอรอลได้ประมาณ 55% ซึ่ง ezetimibe เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลที่ผนังลำไส้เล็ก โดยการยับยั้งการทำงานของ Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) (Weinglass, et al., 2008) ซึ่ง NPC1L1 เป็น membrane receptor ที่ทำหน้าที่ขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ (Altmann, et al., 2004) แต่การยับยั้ง NPC1L1 ด้วย ezetimibe ก็ไม่สามารถยับยั้งการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้อย่างสมบูรณ์ 100% แสดงให้เห็นว่า นอกเหนือจาก NPC1L1 แล้วยังมีกลไกหรือกระบวนการอื่นที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าโคเลสเตอรอลอีก

สำหรับการทดลองนี้ ได้ทำการทดสอบผลของซิริซิน 3 ชนิด ได้แก่ ซิริซิน A, B และ C ต่อการนำเข้าของโคเลสเตอรอล โดยซิริซิน A, B และ C มีความแตกต่างกันที่ขนาดของโมเลกุล ซิริซิน A (MW 191-339 kDa) ซิริซิน B (MW 76-132 kDa) ซิริซิน C (MW 61-113 kDa) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ซิริซินทั้งสามชนิดมีผลในการลดการนำเข้าของโคเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ Caco-2 เมื่อใช้ซิริซินที่ความเข้มข้นต่ำ ในที่นี้ คือ 25 และ 50 μg/ml เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้น 100, 500 และ 1000 μg/ml ฤทธิ์ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์จะลดลง และที่ความเข้มข้นสูงสุด (1000 μg/ml) กลับพบว่ามีผลเพิ่มการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้ เป็นที่น่าแปลกใจที่พบลักษณะของ inverse dose-dependent effect คือ ฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งข้อสังเกตที่พบนี้ยังไม่สามารถหาคำอธิบายได้ อาจต้องมีการศึกษาในระดับลึกต่อไป

สำหรับ ผลการทดสอบฤทธิ์ของซิริซินในการลดโคเลสเตอรอลในหนูทดลอง ที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า ซิริซินไม่แสดงผลในการเปลี่ยนแปลงค่าของโคเลสเตอรอลในเลือด แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูกลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง มีค่าเพิ่มขึ้นในอัตราที่ไม่สูงนัก และต่ำกว่าที่คาดไว้ จากระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองนานถึง 5 เดือน ซึ่งคาดว่าอาจเป็นผลมาจากการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากอาหารที่ให้ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากไม่มีกรดน้ำดี (bile acids) ในสูตรอาหาร ทำให้ระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงเพิ่มขึ้นไม่มากนัก และการที่ไม่เห็นผลลดโคเลสเตอรอลของซิริซินอาจเนื่องมาจากความคงตัวของซิริซินที่ผสมอยู่ในอาหารสัตว์ทดลองนั้น หรือการได้รับซิริซินที่อยู่ในรูปอาหารแห้งอาจส่งผลต่อการละลายหรือการออกฤทธิ์ในระบบทางเดินอาหารได้

จากการบันทึกน้ำหนักและปริมาณอาหารที่หนูทดลองที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า กลุ่มที่กินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะกินอาหารมากกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติ แต่ที่น่าสนใจ คือ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่กินอาหารประเภทเดียวกัน (อาหารปกติหรืออาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง) แต่ถ้ากินซิริซินร่วมด้วย จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่า แม้ว่าจะกินอาหารในปริมาณที่เท่าๆกัน ดังนั้นซิริซินอาจมีผลต่อการควบคุมกระบวนการของร่างกายที่เกี่ยวข้องกับน้ำหนักตัว ซึ่งสมมติฐานนี้ ต้องมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสังเกตนี้และพิสูจน์ผลของซิริซินต่อไป

ผู้วิจัยได้ทำการปรับวิธีการทดลอง โดยการทดสอบการดูดซึมโคเลสเตอรอลเมื่อให้โคเลสเตอรอลร่วมกับกรดน้ำดีและซิริซินโดยตรง ในรูปของ lipid emulsion ด้วยการป้อนหรือให้ทาง gastric tube วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน และทำการวัดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดเป็นระยะๆ ซึ่งผลการทดลองในเบื้องต้นพบว่า ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูที่ได้รับโคเลสเตอรอลอย่างเดียว (ไม่มีซิริซิน) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นที่น่าพอใจในระยะเวลา 14 วัน จากผลการทดลองพบว่าซิริซินที่ขนาด 10, 100 และ 1000 mg/kg/day สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับของ total cholesterol และ non-HDL cholesterol ที่เกิดจากการให้ high-cholesterol diet อย่างมีนัยสำคัญ แต่ซิริซินทั้ง 3 ขนาดไม่มีผลต่อระดับของ triglyceride ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการทดลอง preliminary experiment ที่พบว่าซิริซินสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับของ triglyceride ในเลือด

ของหนูได้ แต่อย่างไรก็ตามขนาดของซิริซินที่ใช้เป็นขนาดสูง คือ 2000 mg/kg/day ดังนั้น การใช้ซิริซินขนาดสูงอาจมีผลต่อระดับของ triglyceride ในเลือดได้ด้วย

ในการศึกษานี้ ได้รายงานในรูปของ non-HDL cholesterol เพื่อเป็นตัวแทนของ LDL และ VLDL cholesterol เนื่องจากมีรายงานว่าการคำนวณค่า LDL cholesterol จากสูตรของ Friedewald equation คือ [LDL-Cholesterol] = [Total-Cholesterol] - [HDL-Cholesterol] - [Triglyceride]/5 (Friedewald, et al., 1972) อาจไม่เหมาะสมในการนำมาใช้คำนวณระดับของ LDL ในเลือดของสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะในภาวะที่มี cholesterol ในเลือดสูง (Francisco and Sara, 2008) ดังนั้น จึงมีการนำเสนอเป็น non-HDL cholesterol ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงระดับของ LDL เป็นส่วนใหญ่และ VLDL บางส่วน

ตารางที่ 30 การวิเคราะห์กรดอะมิโนของซิริซินที่ใช้ในการทดลอง

Amino acid	**% w/w**
Serine	33.40
Aspartate	16.70
Glutamate	4.40
Glycine	13.50
Threonine	9.70
Lysine	3.30
Tyrosine	2.60
Arginine	3.10
Alanine	6.00
Valine	2.80
Histidine	1.30
Luecine	1.10
Isoluecine	0.70
Phenylalanine	0.50
Trytophan	0.20
Proline	0.70
Cystine	0.20
Methionine	0.04

มีการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดที่สูงและการกินอาหารโปรตีนที่มี methionine และ methionine:glycine ratio สูง ดังนั้น ฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลของโปรตีนหลายชนิด เช่น โปรตีนจาก ถั่วเหลือง มันฝรั่ง และข้าว จึงคาดว่าเป็นผลมาจากการที่มีระดับ methionine ต่ำ (Morita, et al., 1997) ความเข้มข้นของ methionine และ glycine ในโปรตีนเหล่านี้มีค่าอยู่ระหว่าง 1-2 และ 3-4.5 % w/w ตามลำดับ (Morita, et al., 1997; Nagaoka, et al., 1999) ซิริซินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มี methionine ต่ำ คือ ต่ำกว่า 0.05 mol % (Zhaorigetu, et al., 2001; Li, et al., 2008) ส่วนซิริซินที่ใช้ในการทดลองนี้มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนตามที่แสดงในตารางที่ 30 ซึ่งมี methionine 0.04% และ glycine 13.5% w/w ทำให้สัดส่วนของ methionine:glycine ratio เป็น 0.003 ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับโปรตีนจากอาหารที่กล่าวมาข้างต้น จะพบว่าซิริซินมี

ปริมาณ methionine ที่ต่ำกว่าและ glycine ที่สูงกว่ามาก ทำให้สัดส่วนของกรดอะมิโนทั้งสองยิ่งต่ำลง แม้ว่าในปัจจุบัน จะยังไม่ทราบแน่ชัดว่า low-methionine protein ส่งผลต่อการลดระดับโคเลสเตอรอลได้อย่างไร แต่จากหลายการศึกษาวิจัย ก็พบความเกี่ยวข้องดังกล่าว และอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ซิริซินมีฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลได้

ซิริซินเป็นโปรตีนที่กินได้ และพบว่าสามารถทนต่อเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารได้ดี คือ มี low digestibility (Sasaki, et al., 2000) ดังนั้น จึงเชื่อว่าซิริซินที่ไม่ถูกย่อยและยังคงอยู่ในระบบทางเดินอาหารมีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Zhaorigetu, et al., 2007) จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นไปได้ที่ซิริซินที่ไม่ถูกย่อยนี้อาจมีผลต่อการดูดซึมสารอาหารในระบบทางเดินอาหารได้ มีรายงานว่าซิริซินเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ เช่น เหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม และแคลเซียม ในหนูทดลองได้ (Sasaki, et al., 2000) การรบกวนการดูดซึมโคเลสเตอรอลในทางเดินอาหารก็อาจเป็นกลไกหนึ่งของซิริซินในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองเป็นไปได้ยาก ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

จากการศึกษานี้ พบว่า การกินซิริซินร่วมกับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง จะช่วยยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับ total cholesterol และ non-HDL cholesterol ได้ ซึ่งกลไกดังกล่าวอาจเกิดมาจากฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากระบบทางเดินอาหาร

ส่วนการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity) และพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity) ของซิริซินนั้น วิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน ได้อ้างอิงจาก OECD test guidelines* เนื่องจากซิริซินเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติที่มีข้อมูลการนำไปศึกษาในสัตว์ทดลอง รวมทั้งมีการผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมแล้ว ความเป็นพิษจึงน่าจะจัดอยู่ในกลุ่มสารที่เป็นพิษต่ำ แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษเฉียบพลันของซิริซินที่สกัดขึ้นและใช้ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบพิษของซิริซินที่ขนาดสูง 5 g/kg ของน้ำหนักตัวหนู (คิดเป็น 48 g ขนาดรับประทานของคนที่มีน้ำหนัก 60 กิโลกรัม) ซึ่งโดยทั่วไปการทดสอบโดยใช้ปริมาณสารมากถึง 5 g/kg จะพิจารณาทดสอบเฉพาะกับสารที่อยู่ในกลุ่มที่มีความปลอดภัยสูง แต่ผลการทดสอบที่ขนาดสูงยังมีความจำเป็นต่อความปลอดภัยของมนุษย์ เนื่องจาก ซิริซินเป็นสารที่คาดว่ามีความปลอดภัยสูง และมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นอาหารเสริมซึ่งขนาดรับประทานที่ปลอดภัยควรมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง ผู้วิจัยจึงพิจารณาแล้วว่าการทดสอบพิษเฉียบพลันในขนาดสูงดังกล่าวจะมีความจำเป็นเพื่อแสดงความปลอดภัยในมนุษย์ เพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

ผู้วิจัยทำการทดสอบในหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ ตาม OECD guideline ด้วยการให้ซิริซินขนาดสูง 5 g/kg ของน้ำหนักตัวหนู และสังเกตพฤติกรรมและบันทึกการตายของหนูทดลอง ในช่วง 24 ชม.แรก และทำการสังเกตพฤติกรรมต่ออีก 2 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าหนูยังมีชีวิตอยู่และมีพฤติกรรมปกติ จึงสรุปได้ว่าซิริซินมีค่า LD50 (50% lethal dose) มากกว่า 5000 mg/kg จึงจัดว่าซิริซินเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูงเมื่อให้ด้วยการรับประทาน

สำหรับการทดสอบพิษเรื้องรังของซิริซิน ในการให้อาหารที่มีซิริซินเป็นส่วนประกอบ (4% w/w) เป็นเวลานาน 5 เดือน ซึ่งปริมาณของซิริซินที่หนูแต่ละตัวได้รับต่อวันนั้นอยู่ระหว่าง 1000-1200 mg/day พบว่า หนูมีความปกติทั้งพฤติกรรมและค่าทางห้องปฏิบัติการ ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม จากผลการทดสอบทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของซิริซิน แสดงให้เห็นว่าซิริซินเป็นสารที่มีความปลอดภัยเมื่อได้รับทั้งในระยะสั้นและระยะยาว เมื่อให้ด้วยการรับประทาน

* www.oecd.org/document/23/0,2340,en_2649_34379_1948503_1_1_1_1,00.html