

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ พิไฟรินควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์
เพาะเลี้ยงคาโก้

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.นันทิทิพ ล้อมเพียรชอบ คณะเภสัชศาสตร์
2. รศ.ดร.กรกนก อิงคินันท์ คณะเภสัชศาสตร์

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

มีรายงานการศึกษาพบว่าพริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.) มีฤทธิ์ลดไขมันในสัตว์ทดลองและสามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ จึงมีการสันนิษฐานว่าสารไพเพอรีน (piperine) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในพริกไทยดำมีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ดังกล่าว ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อค้นหาฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำและไพเพอรีน ต่อการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดที่มีหน้าที่ในการควบคุมการขนส่งโคเลสเตอรอลในเซลล์คาโก้-ทู การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ทำได้ด้วยวิธี immuno-blotting (western blotting) ผลการทดลองพบว่า หลังจากการเลี้ยงเซลล์คาโก้-ทู ด้วยพริกไทยดำและไพเพอรีน ของการแสดงออกของโปรตีน ABCG5, ABCG8 และ ACAT2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์คาโก้-ทูเหล่านี้ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน NPC1L1 ซึ่งมีหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งการลดลงของโปรตีน NPC1L1 นี้จะไม่พบในส่วน of cell lysates การที่โปรตีน NPC1L1 บนเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงนั้น แสดงให้เห็นว่า พริกไทยดำและไพเพอรีน อาจมีฤทธิ์ควบคุมการเคลื่อนที่ของโปรตีน NPC1L1 ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ ผลของการแสดงออกของโปรตีนที่ทำการทดสอบที่เป็นผลมาจากพริกไทยดำและไพเพอรีนในการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้น อาจเป็นไปได้ที่ไพเพอรีนจะเป็นสารสำคัญในพริกไทยดำที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ผ่านการควบคุมการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ (internalization) ของโปรตีน ซึ่งมีหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอล (cholesterol transporter)

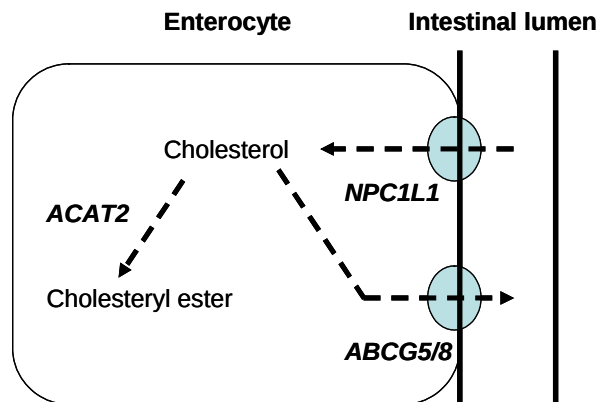
Abstract

Black pepper (*Piper nigrum* L.) exhibited the lipid lowering effect *in vivo* and the cholesterol uptake inhibitory effect *in vitro*. Piperine was hypothesized to play a major role for those effects, therefore the present study was aimed to investigate the effect of black pepper extract and piperine on the expression of certain proteins functioning in the regulation of cholesterol transport in Caco-2 cells. The expression of proteins was evaluated by immunoblotting (western blotting). The results showed that there was no change in the expression of ABCG5, ABCG8 and ACAT2 in differentiated Caco-2 cells treated with black pepper extract and piperine. In the membrane fraction of these treated cells, the expression of cholesterol transporter, NPC1L1, was lower than that of control. This reduction was not observed in whole cell lysates. The disappearance of NPC1L1 in the membrane compartment may indicate that black pepper extract and piperine could regulate the translocation of NPC1L1 between cell membrane and cytoplasmic compartment. Black pepper extract and piperine also provided similar results for the expression of all tested proteins. These data suggest that piperine may be an active compound of black pepper as cholesterol uptake inhibitor acting through promoting the internalization of cholesterol transporter proteins.

บทสรุปย่อ Executive Summary

นอกเหนือจากสารสังเคราะห์ มีการศึกษาพบว่าสารจากธรรมชาติ เช่น พืชหรือสมุนไพร ก็สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาฤทธิ์ของพืชและสมุนไพรหลายชนิด โดยเน้นศึกษาวิจัยพืชและสมุนไพรที่มีรายงานฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลในเลือดของสัตว์ทดลองมาแล้ว ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของพืชและสมุนไพรเหล่านี้ยังไม่ได้ได้รับการศึกษาวิจัยที่ชัดเจน จากการศึกษาเบื้องต้นในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 พบว่าสารสกัดจากพริกไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ใกล้เคียงกับยา ezetimibe แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งเป็น crude extract นั้น เป็นไปได้ยากและอาจไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากสารสกัดประกอบไปด้วยสารจำนวนมากมายหลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติต่างกัน คณะผู้วิจัยจึงสนใจในการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่พบมากในสารสกัดพริกไทย ซึ่งได้แก่ piperine จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย แสดงให้เห็นว่า piperine ก็มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการดูดซึมหรือการนำเข้าสู่ของโคเลสเตอรอลที่เซลล์ลำไส้ได้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล โดยจะศึกษาผลของ piperine ในการแสดงออกของโปรตีนบางชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมหรือการนำเข้าสู่ของโคเลสเตอรอล ได้แก่ NPC1L1, ACAT2, ABCG5 และ ABCG8 ซึ่งทั้งหมดมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการดูดซึมโคเลสเตอรอลที่เซลล์ลำไส้ ดังรูปที่ 1 คณะผู้วิจัยคาดว่า piperine อาจมีผลต่อโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นคำอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ในการลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลได้

รูปที่ 1 การควบคุมการดูดซึมโคเลสเตอรอลที่เซลล์ลำไส้โดยโปรตีนต่างๆ



โครงการวิจัยนี้เป็นการวิจัยในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงจะมีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ลำไส้เล็ก จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาการดูดซึมผ่านของสารต่างๆ ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยใช้เซลล์ Caco-2 ในการทดสอบการดูดซึมโคเลสเตอรอล โดยจะทำการทดสอบผลของสารบริสุทธิ์ piperine เปรียบเทียบกับสารสกัดจากพริกไทย ต่อการดูดซึมโคเลสเตอรอลซึ่งสามารถติดตามการเข้าเซลล์โดยใช้ radio-labeled cholesterol ส่วนการทดสอบผลของ piperine ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cholesterol homeostasis สามารถทำได้ด้วยวิธี western blotting

ผลการทดลองพบว่า หลังจากการเลี้ยงเซลล์คาโก้-ทู ด้วยพริกไทยดำและไฟเพอริน ของการ แสดงออกของโปรตีน ABCG5, ABCG8 และ ACAT2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ คาโก้-ทูเหล่านี้ พบว่าการแสดงออกของโปรตีน NPC1L1 ซึ่งมีหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งการลดลงของโปรตีน NPC1L1 นี้จะไม่พบในส่วน of cell lysates การที่โปรตีน NPC1L1 บนเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงนั้น แสดงให้เห็นว่า พริกไทยดำและไฟเพอริน อาจมี ฤทธิ์ควบคุมการเคลื่อนที่ของโปรตีน NPC1L1 ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ ผลของ การแสดงออกของโปรตีนที่ทำการทดสอบที่เป็นผลมาจากพริกไทยดำและไฟเพอรินในการศึกษานี้มีความ คล้ายคลึงกัน ดังนั้น อาจเป็นไปได้ที่ไฟเพอรินจะเป็นสารสำคัญในพริกไทยดำที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการนำ โคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ผ่านการควบคุมการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ (internalization) ของโปรตีน ซึ่งมีหน้าที่ในการ ขนส่งโคเลสเตอรอล (cholesterol transporter)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	i
Abstract.....	ii
บทสรุปย่อ (Executive Summary)	iii
สารบัญ.....	v
สารบัญรูปภาพ.....	vi
บทที่ 1 บทนำ (Introduction).....	1
วัตถุประสงค์.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย (Material and Methods)	
เครื่องมือและอุปกรณ์.....	5
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	5
บทที่ 3 ผลการทดลอง (Results).....	8
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง (Discussion and conclusion).....	15
เอกสารอ้างอิง (References).....	18
ผลลัพธ์ (Output).....	21
ภาคผนวก (Index).....	22

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การควบคุมการดูดซึมโคเลสเตอรอลที่เซลล์ลำไส้โดยโปรตีนต่างๆ.....	iii
รูปที่ 2 ผลของสารสกัดจากพริกไทยต่อ cholesterol uptake ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง (การทดลองเบื้องต้น).....	3
รูปที่ 3 ผลของสารสกัดพริกไทยและไฟเพอรินต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้า เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง	9
รูปที่ 4 การแสดงออกของโปรตีน NPC1L1 ใน whole cell lysate และ membrane fraction ในเซลล์ Caco-2	12
รูปที่ 5 แสดงออกของโปรตีน ACAT2 ABCG5 และ ABCG8 ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ...	14

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ภาวะโรคหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis) เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเป็นโรคหัวใจขาดเลือด (Ischemic Heart Disease) และโรคหลอดเลือดของสมอง (Cerebrovascular Disease) ภาวะโรคหลอดเลือดแข็ง เกิดขึ้นเนื่องจากการคั่งของไขมันในผนังหลอดเลือด ไขมันที่คั่งนี้ส่วนใหญ่เป็นโคเลสเตอรอล (Cholesterol) การลดระดับของโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง ปัจจุบัน มียาหลายชนิดที่มีฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด นอกเหนือจากการใช้ยาลดระดับโคเลสเตอรอล การควบคุมอาหารหรือการเปลี่ยนพฤติกรรมมารับประทานอาหาร ก็เป็นวิธีการที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะในผู้ที่ระดับโคเลสเตอรอลไม่สูงมากนัก หรือในผู้ที่ไม่มียาปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ ต่อภาวะการเกิดโรคของระบบหลอดเลือดและหัวใจ โดยทานอาหารที่มีโคเลสเตอรอลต่ำร่วมกับผักผลไม้ที่มีเส้นใยสูง

ในปัจจุบัน มียาหลายชนิดที่มีฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด แต่ยาที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน คือ ยาในกลุ่ม statin ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล โดยยับยั้งการทำงานของ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-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 ร่วมกับยาในกลุ่ม statin จะสามารถลดการเกิดภาวะของโรคหลอดเลือดและหัวใจได้ (Sampalis, et al., 2007) นอกจากนี้ ยังมียา avasimibe ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acyl-CoA: cholesterol acyltransferase enzyme (ACAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลให้อยู่ในรูปของ cholesterol ester และสะสมภายในเซลล์ต่างๆ (Llaverías et al., 2003) การใช้ ACAT inhibitor พบว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ และยังสามารถลดการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้ ซึ่งเป็นผลมาจากฤทธิ์ลดการสะสมของ cholesterol ester ภายในเซลล์นั่นเอง (Delsing et.al., 2001; Kitayama et al., 2006) จะเห็นว่า การพัฒนายาลดโคเลสเตอรอลในปัจจุบันมีเป้าหมายของการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย แม้ว่าเป้าหมายหลัก จะเป็นการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด แต่การที่ยามีฤทธิ์ลดการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งด้วย จะทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจลดลงมากยิ่งขึ้น

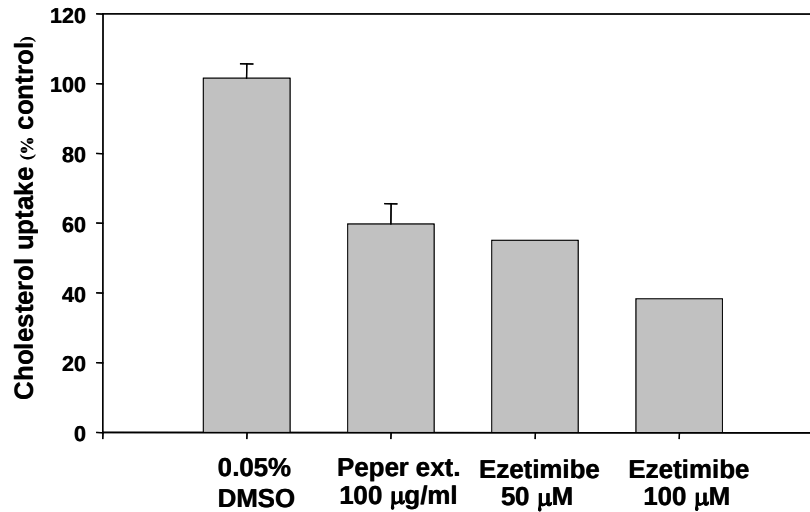
นอกเหนือจากสารสังเคราะห์ มีการศึกษาพบว่าสารจากธรรมชาติ เช่น พืชหรือสมุนไพร ก็สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสารกลุ่ม

phytosterol ซึ่งเป็น sterol จากพืช (plant sterol) โดยแย่งที่กับโคเลสเตอรอลในการดูดซึมที่ brush border membrane จากทางเดินอาหาร (Moghadasian MH, 2000; von Bergmann et al., 2005) คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาฤทธิ์ของพืชและสมุนไพรหลายชนิด โดยเน้นศึกษาวิจัยพืชและสมุนไพรที่มีรายงานฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลในเลือดของสัตว์ทดลองมาแล้ว ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของพืชและสมุนไพรเหล่านี้ ยังไม่ได้รับการศึกษาวิจัยที่ชัดเจน

จากการศึกษาเบื้องต้นในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 พบว่าสารสกัดจากพริกไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ใกล้เคียงกับยา ezetimibe (รูปที่ 2) คณะผู้วิจัยจึงสนใจในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่พบมากในสารสกัดพริกไทย ซึ่งได้แก่ piperine มีการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่า piperine มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACAT ทั้ง ACAT1 และ ACAT2 ซึ่งส่งผลยับยั้งการสร้าง cholesteryl ester ทำให้การสะสมของไขมันภายในเซลล์ macrophage ลดลง (Matsuda et al., 2008) ถ้าผลของการยับยั้ง ACAT นี้เกิดในเซลล์ลำไส้หรือเซลล์ตับ อาจส่งผลให้ระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ นอกจากนี้ มีรายงานว่า ในอวัยวะต่างๆของหนูทดลองที่กินอาหารไขมันสูงมีระดับของ lipid peroxidation ลดลงหลังจากได้รับ piperine และ piperine ยังสามารถรักษาระดับของเอนไซม์ที่มีหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) ได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (Vijayakumar et al., 2004) มีการศึกษาในหนูทดลองที่กินอาหารไขมันสูง พบว่า piperine มีผลลดระดับไขมันและไลโปโปรตีน (lipoprotein) ในเลือดของหนูได้ และยังมีผลเพิ่มระดับของ high density lipoprotein (HDL) อีกด้วย (Vijayakumar and Nalini, 2006) อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอลของ piperine ยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน การศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย แสดงให้เห็นว่า piperine มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการดูดซึมหรือการนำเข้าของโคเลสเตอรอลที่เซลล์ลำไส้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล โดยจะศึกษาผลของ piperine ในการแสดงออกของโปรตีนบางชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมหรือการนำเข้าของโคเลสเตอรอล ได้แก่ NPC1L1 และ ACAT2 รวมทั้งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขับออกของโคเลสเตอรอล ได้แก่ ATP-binding cassette sub-family G member 5 และ 8 (ABCG5 และ ABCG8)

โครงการวิจัยนี้ เน้นศึกษาผลของ piperine ต่อการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 5 ชนิด ซึ่งมีบทบาทต่อ cholesterol homeostasis ที่เกิดขึ้นที่เซลล์ลำไส้ NPC1L1 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ (Davis and Veltri, 2007) ส่วนโปรตีน ACAT แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ACAT1 และ ACAT2 ซึ่งมีความแตกต่างกันที่หน้าที่และการกระจายตัวที่เซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ โดย ACAT1 พบที่เซลล์ทั่วไป แต่มีบทบาทในการสะสมของ cholesteryl ester โดยเฉพาะเซลล์ macrophage และผนังหลอดเลือด ส่วน ACAT2 มีบทบาทสำคัญในการหลั่ง apolipoprotein B-containing lipoprotein ที่ตับและลำไส้ เล็ก รวมทั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากอาหาร (Chang et al., 2001; Leon et al., 2005; Rudel et al., 2001) ABCG5 และ ABCG8 เป็นโปรตีนกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) transporters ทำหน้าที่ร่วมกันในการขับออกของโคเลสเตอรอล (cholesterol efflux) จากเซลล์ลำไส้กลับสู่ intestinal lumen (Wang, 2007) ถ้า piperine มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนต่างๆเหล่านี้ จะมีผลต่อการดูดซึมของ

โคเลสเตอรอลที่เซลล์ลำไส้ได้ ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยนี้จะเป็นคำอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสารสกัดจากพริกไทยได้



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดจากพริกไทยต่อ cholesterol uptake ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง (การทดลองเบื้องต้น) เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 24 well plate เมื่อมีอายุ 2 สัปดาห์ เลี้ยงด้วยอาหารที่ประกอบด้วย [1,2-³H]cholesterol micelle และสารสกัดพริกไทย 100 ug/ml หรือ ezetimibe 50 และ 100 uM เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าของกัมมันตรังสีภายในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อแสดงถึงปริมาณของโคเลสเตอรอลที่เข้าสู่เซลล์

ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า piperine เป็นสารที่มีฤทธิ์หลายอย่าง ทั้งฤทธิ์ยับยั้งภาวะ oxidative stress และยับยั้งการสะสมของโคเลสเตอรอลใน macrophage เมื่อรวมกับผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้ จะเป็นการสนับสนุนศักยภาพของ piperine ที่อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมภาวะโรคหลอดเลือดและหัวใจที่เกิดจากโคเลสเตอรอลในเลือดสูงได้ รวมทั้งเป็นแนวทางต่อการศึกษาต่อยอดในอาสาสมัครหรือผู้ป่วยต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำและไพเพอรีน (piperine) ต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีน NPC1L1, ACAT2, ABCG5 และ ABCG8 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของ piperine ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล
2. ข้อมูลที่ได้จะมีส่วนช่วยแสดงศักยภาพของพริกไทยดำ ในการนำไปพัฒนาให้อยู่ในรูปของยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากทางเดินอาหาร จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรนี้ได้
3. ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเผยแพร่โดยการนำเสนอผลงาน และ/หรือ ตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือระดับชาติ
4. เปิดโอกาสให้นักวิจัยรุ่นใหม่ ซึ่งเป็นนิสิตปริญญาเอก เข้ามามีส่วนร่วมในการวิจัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation)
2. CO₂-incubator (Forma series II, Thermo Fisher Scientific)
3. Laminar air flow (Heal Force[®])
4. Liquid nitrogen tank (Taylor Wharton)
5. Microplate Spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Beckman Coulter)
6. pH meter (Mettler-Teledo)
7. PVDF membrane (Pierce)
8. Vertical gel electrophoresis (Model Mini-Protean Tetra Cell, Biorad laboratory)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดพริกไทยดำ

สารสกัดพริกไทยดำที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ได้รับมาจาก Bio-screening Research Unit คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดย รศ.ดร. กรรณก อิงคินันท์ ขั้นตอนในการเตรียมสารสกัดแบบย่อยๆ คือ ล้างสมุนไพรแล้วนำไปอบให้แห้งในตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ตามด้วยการบดด้วยเครื่อง และอบให้แห้งในตูบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2-3 วัน ขั้นตอนต่อไปนำไปหมักด้วย 95% methanol เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองและนำส่วนของเหลวไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotavapor ที่อุณหภูมิ 55-60 °C สารสกัดสมุนไพรถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยง Caco-2 cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin-streptomycin ในตู้เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ ใน 75 cm³ culture flask สำหรับการ subculture ทำได้โดย detach เซลล์ด้วย 0.25% trypsin ใน Ca²⁺-, Mg²⁺-free phosphate buffer (PBS) ที่มี 0.2 g/L EDTA

3. การเตรียมโคเลสเตอรอลไมเซลล์

สารละลายไมเซลล์ (micelle) ถูกปรับจาก Yamanashi, Y และคณะ โดยเตรียมสารละลาย $[1\alpha,2\alpha(n)-3H]$ โคเลสเตอรอล, โคเลสเตอรอล และฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) ในคลอโรฟอร์ม (chloroform) ส่วนสารละลาย โซเดียมทอโรโคลเลต (sodium taurocholate) ถูกเตรียมในเมทานอล นำสารละลายของไขมันและเกลือน้ำดี (bile salt) รวมให้เข้ากัน และนำไประเหยแห้งภายใต้ N_2 แผ่นฟิล์มที่ได้ ถูกเก็บไว้ภายใต้ N_2 ที่ $-20^\circ C$ จนกระทั่งใช้สารละลายไมเซลล์ ถูกเตรียมใหม่โดยการนำแผ่นฟิล์มมาละลายในอาหารสูตร DMEM/F12 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $1\ \mu M$ โคเลสเตอรอล $2\ mM$ โซเดียม ทอโรโคลเลต $50\ \mu M$ ฟอสฟาติดีลโคลีน และ $1\ \mu Ci/ml$ $[1\alpha,2\alpha(n)-3H]$ โคเลสเตอรอล จากนั้นนำสารละลายไมเซลล์ไป sonicate กรองผ่าน $0.2\text{-}\mu m$ และเก็บที่ $37^\circ C$ ก่อนนำไปใช้กับเซลล์

4. วิธีการทดลองการดูดซึมโคเลสเตอรอลในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ถูกเลี้ยงใน 24-well plate ที่ความหนาแน่น $50,000$ เซลล์/well เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 14-21 วัน เพื่อให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ที่ผนังลำไส้ปกติ ในช่วงนี้ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน หลังจาก 14-21 วัน เซลล์ถูกบ่มด้วย อาหารที่ไม่มี FBS 1 คืน จากนั้นเซลล์ถูกเลี้ยงด้วยสารสกัดพริกไทยดำ ไพเพอริน หรือ ezetimibe เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยให้สารละลายไมเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เก็บเซลล์ โดยล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น 2 ครั้ง และทำให้เซลล์แตกด้วย $0.2\ N$ NaOH และ $0.1\ \%$ Triton-X 100 ได้เป็น cell lysate ซึ่งส่วนหนึ่งนำไปเติม scintillation cocktail (MicroScintTM-20; PerkinElmer) เพื่อวัดระดับของโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีด้วยเครื่อง Packard β -counter และอีกส่วนนำไปวัดหาความเข้มข้นของโปรตีน

5. วิธีการทดลองการแสดงออกโปรตีน (Western blot analysis)

เลี้ยงเซลล์ใน 24 well plates เปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์อายุ 14 วัน เลี้ยงเซลล์ด้วย สารสกัดพริกไทยดำหรือไพเพอริน เป็นเวลา 3 หรือ 24 ชม. แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS เก็บเซลล์ด้วย lysis buffer ($20\ mM$ Tris pH 7.4, $1\ mM$ sodium ortho-vanadate, 0.5% SDS, protease inhibitors) ปั่นแยก cell debris แล้ววัดปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay kit (Pierce®) ทำการแยกโปรตีนด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นถ่ายโปรตีนลงบน PVDF membrane หลังจากป้องกัน non-specific binding ด้วย 5% non-fat milk ที่ membrane ให้ทำปฏิกิริยากับ primary antibody (anti-NPC1L1, anti-ACAT2, Anti-ABCG5 หรือ anti-ABCG8) ที่ $4^\circ C$ เป็นเวลา 1 คืน จากนั้น ล้างด้วย 0.5% tween-PBS ประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนที่ membrane ให้ทำปฏิกิริยากับ secondary antibody (horseradish peroxidase conjugated) 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 0.5% tween-PBS ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้น ตรวจสอบแถบโปรตีนด้วย ECL chemiluminescence kit

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดจะทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้จาก western blot จะนำไปหาความเข้มของแถบโปรตีนแล้วนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ค่าทางสถิติ ANOVA ในการประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ระหว่างกลุ่ม treatment และกลุ่มควบคุม

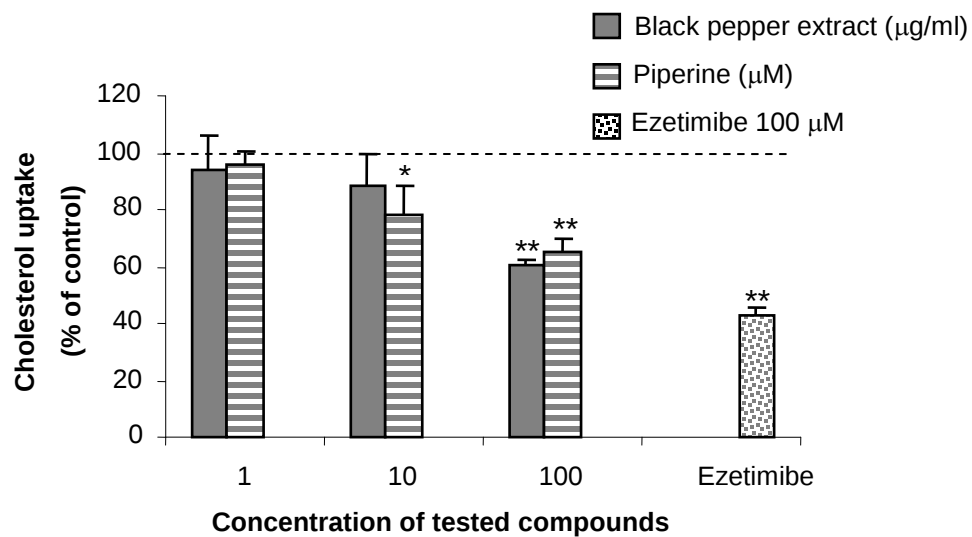
บทที่ 3

ผลการทดลอง (Results)

ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2

การดูดซึมของโคเลสเตอรอล สามารถวัดได้โดยการประเมินระดับของโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วย สารรังสี ($[1\alpha,2\alpha(n)-^3H]$ cholesterol) ที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของ cholesterol micelle และทำการคำนวณปริมาณสารรังสีต่อความเข้มข้นของโปรตีนจาก cell homogenate ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ ezetimibe เป็น positive control ของการทดลอง ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า ezetimibe มีฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดซึมของโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ ซึ่งผลการทดลองนี้ พบว่าการ นำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงมีค่าลดลงประมาณ 60 % หลังจากที่ใช้ ezetimibe ที่ความเข้มข้น 100 μ M (รูปที่ 3) ผู้วิจัยได้ทดสอบ ezetimibe ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่พบว่าความสามารถในการยับยั้ง โคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ไม่เพิ่มขึ้นมากนัก

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μ g/ml พบว่าสารสกัด พริกไทยดำสามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ (รูปที่ 3) โดยยับยั้งได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น สูงขึ้น (dose-dependent activity) การทดสอบนี้ไม่สามารถทำได้ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 μ g/ml เนื่องจากข้อจำกัดของการละลายสารสกัดพริกไทยดำในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับการทดสอบไฟเบอร์ ซึ่งใน ที่นี้ใช้ไฟเบอร์มาตรฐานที่ได้มาจากบริษัท Sigma® โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μ M ซึ่งเป็นความ เข้มข้นที่สอดคล้องกับปริมาณของไฟเบอร์พบอยู่ในสารสกัดพริกไทยดำ (28.19% ไฟเบอร์) เพื่อให้สามารถ เปรียบเทียบกันได้ ผลการทดลองพบว่า ไฟเบอร์สามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 ได้เช่นเดียวกับสารสกัดพริกไทยดำ (รูปที่ 3) และแสดงผลขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ โดยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง ได้ใกล้เคียงกับสารสกัดพริกไทยดำ



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดพริกไทยและไพเพอรีนต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง
 เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ด้วยโคเลสเตอรอลไมเซลล์ ร่วมกับในสถานะที่มีหรือไม่มี สารสกัดพริกไทยที่
 ความเข้มข้น 1, 10, 100 μg/ml หรือไพเพอรีน ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 μM หรือ
 ezetimibe 100 μM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ลินต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ Caco-2

มีโปรตีนหลายชนิดที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการดูดซึมของโคเลสเตอรอลที่ลำไส้เล็ก ซึ่งได้แก่ โปรตีน NPC1L1, ACAT2, ABCG5 และ ABCG8 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ลินมีฤทธิ์ลดการดูดซึมของโคเลสเตอรอลในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง คณะผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่า สารดังกล่าวโดยเฉพาะไฟเบอร์ลินอาจมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการดูดซึมของโคเลสเตอรอล และนำไปสู่การลดลงของการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว ทางผู้วิจัยจึงทดสอบการแสดงออกของโปรตีน NPC1L1, ABCG5, ABCG8 และ ACAT2 ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

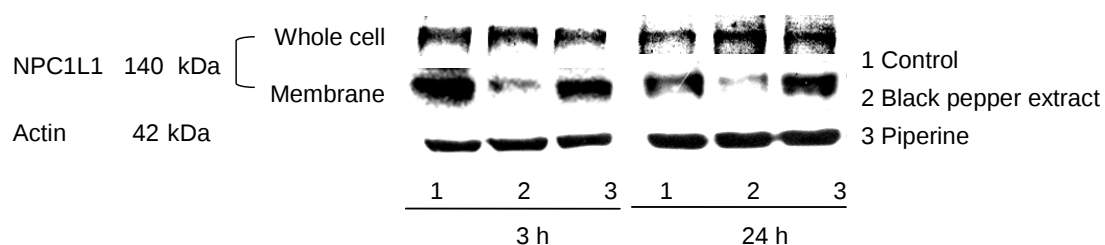
NPC1L1 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ (cholesterol transporter) ในการทดลองช่วงแรก เซลล์ Caco-2 จะถูกเลี้ยงด้วยสารสกัดพริกไทยดำ (100 µg/ml) และไฟเบอร์ลิน (100 µM) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่แสดงผลดีที่สุดในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ และได้ทำการเลี้ยงเซลล์กับสารดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งเป็นเวลาที่คาดว่าเหมาะสมเพียงพอสำหรับการศึกษาระบบการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องการระยะเวลา ในการวัดการแสดงออกของโปรตีน ในที่นี้ใช้วิธี western blotting

การวัดระดับของ NPC1L1 นั้น ในช่วงแรกของโครงการวิจัยได้ทำการทดสอบในส่วน of whole cell lysate ซึ่งผลการทดลองพบว่า การแสดงออกของ NPC1L1 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายใต้อิทธิพลของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ลินเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) ซึ่งผลดังกล่าวนี้ ผู้วิจัยได้ทำซ้ำหลายครั้งและพบผลเช่นเดิม ทำให้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า การแสดงออกของโปรตีน NPC1L1 เมื่อวัดทั้งเซลล์ (whole cell) อาจไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ลินอาจไม่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกผ่านกระบวนการควบคุมการ transcription หรือ translation ของโปรตีน NPC1L1 เนื่องจาก NPC1L1 เป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และมีรายงานว่า NPC1L1 จะเคลื่อนที่จาก cell membrane เข้าสู่ cytoplasm พร้อมกับการขนส่งโคเลสเตอรอล ผู้วิจัยจึงคาดว่าสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ลินอาจมีผลต่อการแสดงออกของ NPC1L1 ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้

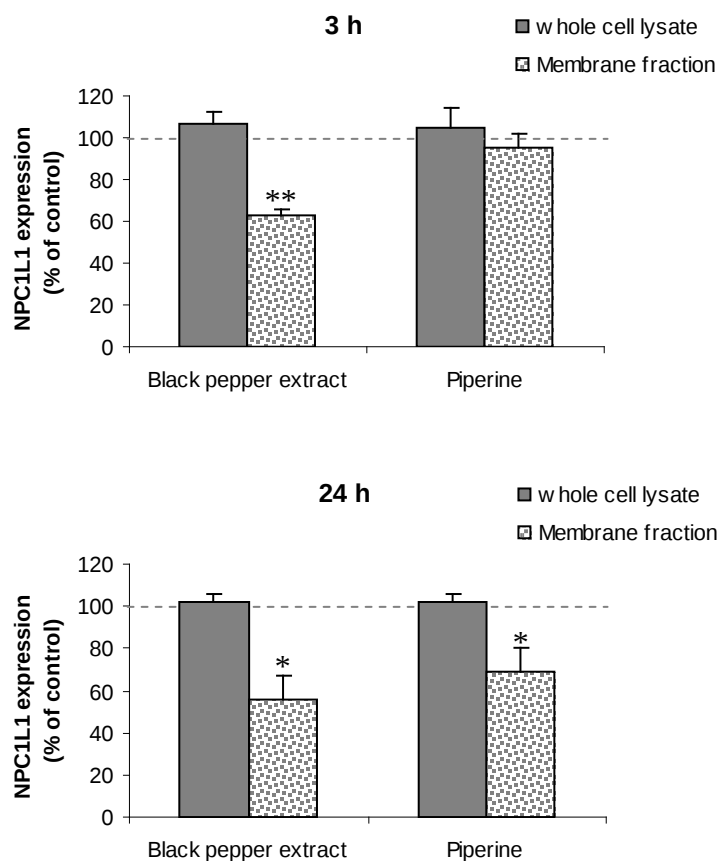
จากข้อสันนิษฐานดังกล่าว ผู้วิจัยจึงทำการแยก cell membrane fraction และวัดการแสดงออกของ NPC1L1 ผลการทดลอง พบว่าระดับของโปรตีน NPC1L1 ในส่วน membrane fraction มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดพริกไทยดำหรือไฟเบอร์ลินนาน 24 ชม. (รูปที่ 4) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงใน whole cell lysate จากผลการทดลองนี้ ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ลินจะมีผลต่อการควบคุมการเคลื่อนที่ของ NPC1L1 ระหว่าง cell membrane และ cytoplasm โดยอาจเพิ่มการ internalization ของ NPC1L1 หรือลดการในระยะเวลาที่สั้นลง คือ 3 ชม. ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ และเป็นช่วงเวลาที่สั้นเกินกว่ากระบวนการการ transcription หรือ translation ของโปรตีน NPC1L1 จะสมบูรณ์ได้ ผลการทดลองพบว่า การแสดงออก

ของโปรตีน NPC1L1 ไม่ได้แตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นไฟเพอรินที่การลดลงของระดับ NPC1L1 ในส่วน membrane fraction ไม่ชัดเจน เหมือนที่พบในสารสกัดพริกไทยดำ (รูปที่ 4) จากผลการทดลองนี้เป็นไปได้ว่าสารสกัดพริกไทยดำ (และไฟเพอริน) อาจส่งเสริมให้มีการเคลื่อนที่ของโปรตีน NPC1L1 จาก cell membrane เข้าไปยังภายในเซลล์ ทำให้จำนวน NPC1L1 บน cell membrane ลดลง ซึ่งส่งผลให้มีการลดลงของการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้

(A)



(B)

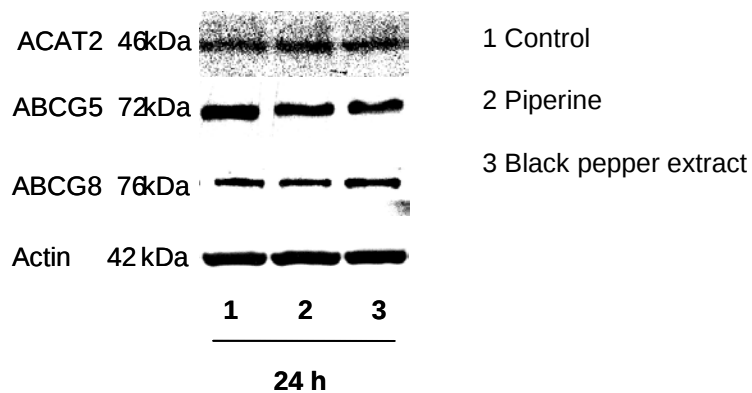


รูปที่ 4 การแสดงออกของโปรตีน NPC1L1 ใน whole cell lysate และ membrane fraction ในเซลล์ Caco-2 เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ด้วยสารสกัดพริกไทยดำ (100 µg/ml) และไพเพอรีน (100 µM) เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง ระดับของ NPC1L1 ใน whole cell lysates และ cell membrane fraction ถูกวิเคราะห์โดย immunoblotting (A) ความเข้มของแถบโปรตีนถูกคำนวณเป็น percentage of control (B) ข้อมูลแสดงในรูปของ mean±SEM อย่างน้อย 3 การทดลอง ค่า * p<0.05 และ ** p<0.001 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

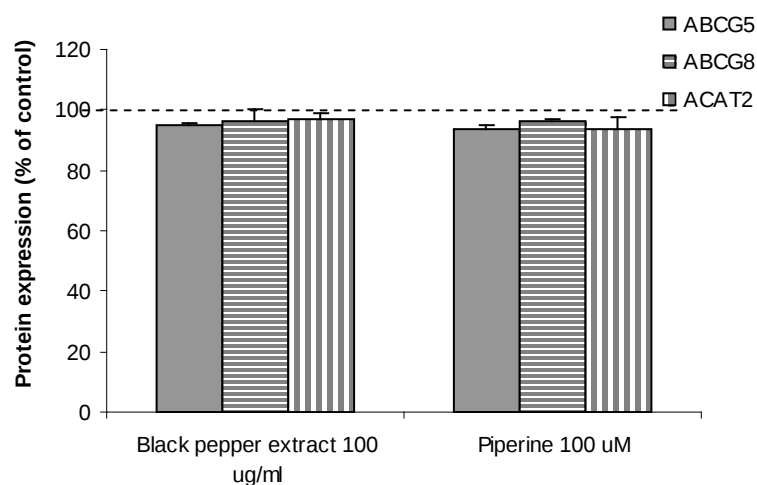
นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังศึกษาผลของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ต่อการแสดงออกของโปรตีน ACAT2, ABCG5 และ ABCG8 ACAT2 เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ ส่วน ABCG5 และ ABCG8 เป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องในการนำโคเลสเตอรอลออกจากเซลล์ลำไส้ (cholesterol efflux) ในการทดลองนี้ศึกษาเฉพาะในส่วน of whole cell lysate ผลการทดลอง ดังแสดง ในรูปที่ 5 พบว่า สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 3 ชนิด เนื่องจาก ABCG5 และ ABCG8 เป็นโปรตีนที่อยู่บน cell membrane เช่นเดียวกับ NPC1L1 การเปลี่ยนแปลงอาจพบที่ cell membrane เช่นกัน ซึ่งอาจต้องทำการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ไม่ได้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ของ ACAT2, ABCG5 และ ABCG8 เช่นเดียวกับผลของ NPC1L1

จากการศึกษานี้นำไปสู่ความเป็นไปได้ที่ สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ไม่ได้มีผลเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ของ NPC1L1, ACAT2, ABCG5 และ ABCG8 เนื่องจากระดับของโปรตีนทุกชนิดใน whole cell lysate ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์อาจมีบทบาทในการควบคุมการเคลื่อนที่ของโปรตีนระหว่าง cell membrane และ cytoplasm โดยมีผลลดจำนวนโปรตีน NPC1L1 (cholesterol transporter) บน cell membrane จึงส่งผลให้เกิดการลดลงของการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ (cholesterol uptake) ได้ ดังนั้นกระบวนการดังกล่าวนี้ อาจเป็นกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ในการลดระดับโคเลสเตอรอล (cholesterol lowering effect) ได้

(A)



(B)



รูปที่ 5 แสดงออกของโปรตีน ACAT2 ABCG5 และ ABCG8 ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง เลี้ยง เซลล์ Caco-2 ด้วยสารสกัดพริกไทยดำ (100 $\mu\text{g/ml}$) และไพเพอรีน (100 μM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนต่างๆใน whole cell lysates ถูกวิเคราะห์โดย immunoblotting (A) ความเข้มของ แถบโปรตีนถูกคำนวณเป็น percentage of control (B) ข้อมูลแสดงในรูปของ mean $\pm$ SEM อย่าง น้อย 3 การทดลอง

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง (Discussion and Conclusion)

ภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงเป็นผลอันเนื่องมาจากความผิดปกติของการรักษาสมดุลของระดับโคเลสเตอรอล ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งตัว และโรคหลอดเลือดหัวใจ การใช้ยาลดระดับโคเลสเตอรอลส่วนใหญ่แนะนำให้ใช้ในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูง สำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงไม่มากหรือมีระดับโคเลสเตอรอลที่ไม่สูงมากนัก มักจะได้รับคำแนะนำให้มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมรับประทานอาหาร รวมทั้งการออกกำลังกายซึ่งจะสามารถช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมดังกล่าวในผู้ป่วยบางรายไม่สามารถทำให้บรรลุเป้าหมายได้ ดังนั้น การใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว

จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานที่พบว่าสารสกัดพริกไทยดำสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูง (high-fat diet) (Vijayakumar et al., 2002) สารสกัดพริกไทยดำยังสามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าไปในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ (Duangjai et al., 2011) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าไฟเพอรินซึ่งเป็นสารสำคัญในพริกไทยดำ มีบทบาทในการยับยั้งการนำเข้าสู่ของโคเลสเตอรอลได้ โดยสามารถลดระดับ cholesterol, low density lipoprotein (LDL) และ very low density lipoprotein (VLDL) ในเลือดของหนูที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงได้ (Vijayakumar et al., 2006) ประกอบกับการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยที่พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเพอริน สามารถลดการนำโคเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ไฟเพอรินอาจจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ เพื่อค้นหากลไกการออกฤทธิ์ที่อาจเชื่อมโยงไปถึงกลไกของสารสกัดจากพริกไทยดำในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงศึกษาผลของไฟเพอรินควบคู่ไปกับสารสกัดพริกไทยดำ ในการศึกษานี้ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ที่อาจเป็นไปได้ของไฟเพอริน และสารสกัดพริกไทยดำ ต่อการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการดูดซึมโคเลสเตอรอล

NPC1L1 เป็น membrane bound protein ซึ่งพบมากในส่วนของลำไส้เล็ก โปรตีนชนิดนี้มีบทบาทในการดูดซึมโคเลสเตอรอล (Altmann et al., 2004; Davis et al., 2004) โดยทำหน้าที่เป็น cholesterol transporter มีการศึกษาพบว่า การดูดซึมโคเลสเตอรอลจากทางเดินอาหารของหนูทดลองที่ไม่มีโปรตีน NPC1L1 (NPC1L1-deficient) จะมีค่าลดลง ผลดังกล่าวนี้คล้ายกับ หนูปกติที่ได้รับยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล ซึ่งได้แก่ ezetimibe (Altmann et al., 2004) ในหนูที่ไม่มีโปรตีน NPC1L1 นั้นจะไม่ตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของยา ezetimibe แสดงให้เห็นว่า NPC1L1 เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ (site of action) ของยา ezetimibe (Davis et al., 2004)

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้ ได้แสดงให้เห็นว่า NPC1L1 อาจจะเป็นเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ิน ที่ส่งผลให้มีการลดการดูดซึมโคเลสเตอรอล โดยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ินทำให้ระดับหรือจำนวนของโปรตีน NPC1L1 ที่อยู่บน cell membrane ของเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงลดลง ซึ่งการลดลงนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งแสดงออกโดยรวมของโปรตีน NPC1L1 เนื่องจากระดับของโปรตีน NPC1L1 ใน whole cell lysate ไม่พบมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ิน อาจทำให้มีการเคลื่อนที่ของโปรตีน NPC1L1 จาก cell membrane ไปสู่ cytoplasmic compartment เพิ่มมากขึ้น มีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า โปรตีน NPC1L1 สามารถพบได้ทั้งในส่วน of brush border membrane ของ enterocytes และ intracellular compartment (Davies et al., 2005) นอกจากนี้ โปรตีน NPC1L1 สามารถเคลื่อนที่ไปยัง cytoplasm ได้ โดยขึ้นอยู่กับระดับหรือความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลภายนอกเซลล์ ซึ่งโคเลสเตอรอลจะถูกนำเข้าไปในเซลล์พร้อมกับ NPC1L1 และกระบวนการนี้สามารถยับยั้งได้ด้วยยา ezetimibe (Ge et al., 2008; Yu et al., 2006) จากข้อมูลและผลการวิจัยของโครงการวิจัยนี้ จึงอาจเป็นไปได้ที่สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ินน่าจะมียุทธวิธีส่งเสริมให้มีการเคลื่อนที่ของโปรตีน NPC1L1 เข้าไปภายในเซลล์ (internalization) จึงทำให้มีจำนวนโปรตีน NPC1L1 บน cell membrane ลดลง ส่งผลให้มีการจำกัดในการนำโคเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์

ACAT2 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา esterification ของโคเลสเตอรอลและกรดไขมันให้อยู่ในรูปของโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesteryl esters) เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการดูดซึมของโคเลสเตอรอลด้วยเช่นกัน ในหนูทดลองที่ไม่มีเอนไซม์ ACAT2 จะมีความสามารถในการดูดซึมของโคเลสเตอรอลจำกัด และหนูเหล่านี้จะต้องการใช้อาหารไขมันสูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง (hypercholesterolemia) (Buhman et al., 2000; Willner et al., 2003) มีรายงานว่าไฟเบอร์ินจากพริกไทยดำมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACAT ทั้งที่ทดสอบใน liver microsomes ของหนูทดลองและในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (HepG2 cells) (Rho et al., 2007) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าไฟเบอร์ินสามารถยับยั้งการสะสมของไขมันใน macrophage ของหนูได้ โดยผ่านทางกลไกการทำงานของ ACAT อีกด้วย (Matsuda et al., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ ACAT-2 จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ิน แม้ว่าผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้ จะแสดงให้เห็นว่า สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์ินไม่ได้มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน ACAT2 ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่า สารดังกล่าวอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ACAT ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป

นอกจากโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์แล้ว โปรตีนที่มีผลต่อการนำโคเลสเตอรอลออกนอกเซลล์ (cholesterol efflux) ก็เป็นอีกตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการดูดซึมโคเลสเตอรอล โปรตีน ABCG5 และ ABCG8 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมให้มีการขับออก (efflux) ของโคเลสเตอรอล และสเตอรอลจากพืช (plant sterol) โดยเหนี่ยวนำให้มีการขับออกจากภายในเซลล์ลำไส้ไปยังส่วนของท่อทางเดินอาหาร (lumen) ซึ่งส่งผลให้มีการจำกัดในการดูดซึมโคเลสเตอรอล (Graf et al., 2002) มีรายงานการศึกษาพบว่า หนูทดลองที่มีการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มาก (overexpression ของ ABCG5 และ ABCG8) จะนำไปสู่การเพิ่มการขับออกของโคเลสเตอรอลในรูปของ

bile มากขึ้น และส่งผลลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลใน Caco-2 cells (Tachibana et al., 2007; Yu et al., 2002) จากการผลการทดลองในโครงการวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดพริกไทยดำและไฟเพอรินไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว ดังนั้น ฤทธิ์ของสกัดพริกไทยดำและไฟเพอรินในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ จึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกของ cholesterol efflux อย่างไรก็ตาม การทดสอบผลต่อการแสดงออกนี้เป็นผลใน whole cell lysate จึงอาจเป็นไม่ได้ในทำนองเดียวกับ NPC1L1 ที่สกัดพริกไทยดำและไฟเพอรินอาจมีผลต่อจำนวนหรือระดับของโปรตีน ABCG5 และ ABCG8 บน cell membrane ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

โดยสรุปผลการทดลองพบว่า หลังจากการเลี้ยงเซลล์คาโก็-ทู ด้วยพริกไทยดำและไฟเพอริน ของการแสดงออกของโปรตีน ABCG5, ABCG8 และ ACAT2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์คาโก็-ทูเหล่านี้ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน NPC1L1 ซึ่งมีหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ซึ่งการลดลงของโปรตีน NPC1L1 นี้จะไม่พบในส่วน of cell lysates การที่โปรตีน NPC1L1 บนเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงนั้น แสดงให้เห็นว่า พริกไทยดำและไฟเพอริน อาจมีฤทธิ์ควบคุมการเคลื่อนที่ของโปรตีน NPC1L1 ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ ผลของการแสดงออกของโปรตีนที่ทำการทดสอบที่เป็นผลมาจากพริกไทยดำและไฟเพอรินในการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้น อาจเป็นไปได้ที่ไฟเพอรินจะเป็นสารสำคัญในพริกไทยดำที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ผ่านการควบคุมการเคลื่อนที่เข้าเซลล์ (internalization) ของโปรตีน ซึ่งมีหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอล (cholesterol transporter)

เอกสารอ้างอิง (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.
- Buhman, K.K., Accad, M., Novak, S., Choi, R.S., Wong, J.S., Hamilton, R.L., et al. 2000. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* 6, 1341-1347.
- 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. *Curr Opin Lipidol* 12, 289-296.
- Davis, H.R., Veltri, E.P., 2007. Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 14, 99-108.
- Davis, H.R., Zhu, L., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., et al. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279, 33586-33592.
- 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. *J Biol Chem* 280, 12710-12720.
- Delsing, D.J., Offerman, E.H., van Duyvenvoorde, W., van Der Boom, H., de Wit, E.C., Gijbels, M.J., van Der Laarse, A., Jukema, J.W., Havekes, L.M., Princen, H.M., 2001. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe reduces atherosclerosis in addition to its cholesterol-lowering effect in ApoE*3-Leiden mice. *Circulation* 103, 1778-1786.
- Duangjai, A., Ingkaninan, K., Limpeanchob, N., 2011. Potential mechanisms of hypocholesterolaemic effect of Thai spices/dietary extracts. *Nat Prod Res* 25,341-352.
- Ge, L., Wang, J., Qi, W., Miao, H.H., Cao, J., Qu, Y.X., et al. 2008. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell metab* 7, 508-519.
- Graf, G.A., Li, W.P., Gerard, R.D., Gelissen, I., White, A., Cohen, J.C., et al. 2002. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* 110, 659-669.
- Kitayama, K., Tanimoto, T., Koga, T., Terasaka, N., Fujioka, T., Inaba, T., 2006. Importance of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1/2 dual inhibition for anti-atherosclerotic potency of pactimibe. *Eur J Pharmacol* 540, 121-130.

- Leon, C., Hill, J.S., Wasan, K.M., 2005. Potential role of acyl-coenzyme A:cholesterol transferase (ACAT) Inhibitors as hypolipidemic and antiatherosclerosis drugs. *Pharm Res* 22, 1578-1588.
- Llaverías, G., Laguna, J.C., Alegret, M., 2003. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). *Cardiovasc Drug Rev* 21, 33-50.
- Matsuda, D., Ohte, S., Ohshiro, T., Jiang, W., Rudel, L., Hong, B., Si, S., Tomoda, H., 2008. Molecular target of piperine in the inhibition of lipid droplet accumulation in macrophages. *Biol Pharm Bull* 31, 1063-1066.
- Moghadasian, M.H., 2000. Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations. *Life Sci* 67, 605-615.
- Rho, M.C., Lee, S.W., Park, H.R., Choi, J.H., Kang, J.Y., Kim, K., et al. 2007. ACAT inhibition of alkaloids identified in the fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 68, 899-903.
- Rudel, L.L., Lee, R.G., Cockman, T.L., 2001. Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 121-127.
- 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. *Ann Pharmacother* 41, 1345-1351.
- Schmitz, G., Schmitz-Madry, A., Ugocsai, P., 2007. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Curr Opin Lipidol* 18, 164-173.
- Tachibana, S., Hirano, M., HiraTa, T., Matsuo, M., Ikeda, I., Ueda, K., et al. 2007. Cholesterol and plant sterol efflux from cultured intestinal epithelial cells is mediated by ATP-Binding Cassette transporters. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1886-1895.
- Vijayakumar, R.S., Nalini, N., 2006. Piperine, an active principle from *Piper nigrum*, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 17, 71-86.
- Vijayakumar, R.S., Surya, D., Nalini, N., 2004. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep* 9, 105-110.
- Vijayakumar, R.S., Surya, D., Senthilkumar, R., Nalini, N., 2002. Hypolipidemic effect of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) in rats fed high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 32, 31-42.
- Vijayakumar, R.S., Nalini, N., 2006. Lipid-lowering efficacy of piperine from *Piper nigrum* L. in high-fat diet and antithyroid drug-induced hypercholesterolemic rats. *J Food Biochem* 30, 405-21.

- von Bergmann, K., Sudhop, T., Lutjohann, D., 2005. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol*, 10D-14D.
- Wang, D.Q., 2007. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* 69, 221-248.
- Willner, E.L., Tow, B., Buhman, K.K., Wilson, M., Sanan, D.A., Rudel, L.L., et al. 2003. Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *PNAS* 100, 1262–1267.
- 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. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 559-564.
- Yu, L., Bharadwaj, S., Brown, J.M., Ma, Y., Du, W., Davis, M.A., et al. 2006. Cholesterol-regulated Translocation of NPC1L1 to the Cell Surface Facilitates Free Cholesterol Uptake. *J Biol Chem* 281, 6616-6624.
- Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R.E., Berge, K.E., Horton, J.D., Cohen, J.C., et al. 2002. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol *J Clin Invest* 110, 671-680.

ผลลัพธ์ (Output)

1. การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมระดับชาติ

รูปแบบ การนำเสนอโปสเตอร์

งานประชุมวิชาการครั้งที่ 33 สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ณ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วันที่ 17-19 มีนาคม 2554
(โปสเตอร์แนบท้ายภาคผนวก)

2. เผยแพร่บทความวิจัยในวารสารระดับชาติ

เรื่อง Regulation of cholesterol transporter protein by black pepper and piperine

วารสาร Thai Journal of Pharmacology Volume 33, Number 1, 2011, page 44-47

ผู้วิจัย Acharaporn Duangjai, Kornkanok Ingkaninan, Sakonwun Praputbut,
Nanteetip Limpeanchob

(บทความวิจัยแนบท้ายภาคผนวก)

ภาคผนวก (Index)

ตารางที่ 1 ข้อมูล-ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อการมีชีวิตของเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

	Cell viability (% of control)				mean	SD
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	ครั้งที่4		
Control	98.95	108.90	103.79	97.40	102.26	5.20
Black pepper extract 10 ug/ml	100.19	117.16	88.27	96.87	100.62	12.11
Black pepper extract 100 ug/ml	102.61	111.64			107.12	6.39
Black pepper extract 200 ug/ml	96.92	107.82			102.37	7.71
Piperine 10 uM	96.56	114.37	100.90	109.78	105.40	8.12
Piperine 100 uM	88.22	103.97	107.75	111.74	102.92	10.30
Ezetimibe 10 uM	90.90	103.82			97.36	9.14
Ezetimibe 100 uM	100.00	102.59	101.22		101.27	1.30
Ezetimibe 200 uM	82.99	86.37	78.90		82.75	3.74

ตารางที่ 2 ข้อมูล-ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

	Cholesterol uptake (% of control)				mean	SE
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4		
Black pepper extract 1 ug/ml	71.39	98.35	112.79		94.18	12.13
Black pepper extract 10 ug/ml	67.14	101.47	97.21		88.60	10.80
Black pepper extract 100 ug/ml	61.89	62.60	62.49	53.07	60.01	2.32
Black pepper extract 200 ug/ml	56.24	48.46	60.96	43.32	52.24	3.93
Piperine 1 uM	86.01	103.85	96.80		95.56	5.19
Piperine 10 uM	98.28	70.96	66.46		78.57	9.94
Piperine 100 uM	69.80	60.20	76.50	55.15	65.41	4.78
Ezetimibe 10 uM	104.723	98.98	96.32		100.00	2.48
Ezetimibe 50 uM	52.25	61.37	71.61		61.74	5.59
Ezetimibe 100 uM	43.31	38.301	47.93	43.08	43.16	1.97

ตารางที่ 3 ข้อมูล-ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อการแสดงออกของโปรตีน NPC1L1 ใน whole cell lysate

		NPC1L1 expression (% of control)					
Incubation time (h)		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	mean	SE
3 h	Pepper 100 ug/ml		117.44	144.81	103.51	121.92	12.13
	Piperine 100 uM		122.43	154.06	100.33	125.61	15.59
	Ezetimibe 100 uM		133.80	175.21	91.25	133.42	24.24
24 h	Pepper 100 ug/ml	101.23	108.85	84.00	110.12	100.99	6.01
	Piperine 100 uM	107.17	93.97	99.29	129.89	107.72	7.92
	Ezetimibe 100 uM	112.77	139.56	95.52	139.27	124.78	10.77

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นของแอมโปรตีน NPC1L1 ในส่วน whole cell lysate และ membrane fraction ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ที่ให้สารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีน เป็นเวลา 3 (A) และ 24 ชั่วโมง (B); Lane 1: control, Lane 2: black pepper extract, Lane 3: piperine

A		3 h					
		Whole cells			Membrane fraction		
		1	2	3	1	2	3
1	NPC1L1 140 kDa						
	β -Actin 42 kDa						
2	NPC1L1 140 kDa						
	β -Actin 42 kDa						
3	NPC1L1 140 kDa						
	β -Actin 42 kDa						

B		24 h					
		Whole cells			Membrane fraction		
		1	2	3	1	2	3
1	NPC1L1 140 kDa						
	β -Actin 42 kDa						
2	NPC1L1 140 kDa						
	β -Actin 42 kDa						
3	NPC1L1 140 kDa						
	β -Actin 42 kDa						

ตารางที่ 5 ข้อมูล-ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อการแสดงออกของโปรตีน ABCG5

		ABCG5 expression (% of control)					
Incubation time (h)		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	mean	SE
3 h	Pepper 100 ug/ml	103.12	101.55	100.31	102.78	102.33	0.64
	Piperine 100 uM	100.66	97.48	108.44	107.24	99.07	2.63
	Ezetimibe 100 uM	104.23	98.95	95.086	104.89	101.59	2.32
24 h	Pepper 100 ug/ml	95.18	95.49	93.19		95.18	0.72
	Piperine 100 uM	93.33	99.38	96.77		93.33	1.75
	Ezetimibe 100 uM	100.30	102.21	98.71		100.30	1.01

ตารางที่ 6 ข้อมูล-ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อการแสดงออกของโปรตีน ABCG8

		ABCG8 expression (% of control)					
Incubation time (h)		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	mean	SE
3 h	Pepper 100 ug/ml	108.04	96.49	101.69	99.87	101.53	2.43
	Piperine 100 uM	107.47	102.71	101.55	99.84	102.89	1.64
	Ezetimibe 100 uM	109.01	111.95	96.48	91.77	102.30	4.86
24 h	Pepper 100 ug/ml	91.167	104.43	93.41		96.34	4.10
	Piperine 100 uM	94.468	98.04	95.33		95.94	1.07
	Ezetimibe 100 uM	96.08	99.66	93.88		96.54	1.68

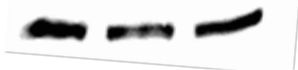
ตารางที่ 7 ข้อมูล-ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อการแสดงออกของโปรตีน ACAT2

		ACAT2 expression (% of control)					
Incubation time (h)		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	mean	SE
3 h	Pepper 100 ug/ml	103.49	97.79	100.73	93.40	98.85	2.16
	Piperine 100 uM	100.89	113.93	101.99	94.46	102.81	4.06
	Ezetimibe 100 uM	107.01	82.23	91.57	99.97	95.19	5.35
24 h	Pepper 100 ug/ml	97.43	96.78	92.16	101.33	96.92	1.88
	Piperine 100 uM	84.53	99.77	96.74		93.68	4.03
	Ezetimibe 100 uM	134.83	79.81	92.13		102.25	14.44

ตารางที่ 8 แสดงความเข้มของแถบโปรตีน ACAT2 ในส่วน whole cell lysate ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง
 ที่ให้สารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; Lane 1: control, Lane 2: black
 pepper extract, Lane 3: piperine

		Whole cells		
		1	2	3
1	ACAT2 46 kDa			
	β -Actin 42 kDa			
2	ACAT2 46 kDa			
	β -Actin 42 kDa			
3	ACAT2 46 kDa			
	β -Actin 42 kDa			

ตารางที่ 9 แสดงความเข้มของแถบโปรตีน ABCG5 ในส่วน whole cell lysate ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง
 ที่ให้สารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; Lane 1: control, Lane 2: black
 pepper extract, Lane 3: piperine

		Whole cells		
		1	2	3
1	ABCG5 72 kDa			
	β -Actin 42 kDa			
2	ABCG5 72 kDa			
	β -Actin 42 kDa			
3	ABCG5 72 kDa			
	β -Actin 42 kDa			

ตารางที่ 10 แสดงความเข้มของแถบโปรตีน ABCG8 ในส่วน whole cell lysate ในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ที่ให้สารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; Lane 1: control, Lane 2: black pepper extract, Lane 3: piperine

		Whole cells		
		1	2	3
1	ABCG8 76 kDa			
	β -Actin 42 kDa			
2	ABCG8 76 kDa			
	β -Actin 42 kDa			
3	ABCG8 76 kDa			
	β -Actin 42 kDa			