



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสมุนไพรไทยในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

โดย ผศ.ดร.นันทิทิพ ลิ้มเพียรชอบ และคณะ

15 พฤษภาคม พ.ศ.2553

Project Code : MRG5180254

Project Title : Cholesterol absorption inhibitory effect of Thai plants in intestinal cell cultures

Investigator : Asst. Prof. Dr. Nanteetip Limpeanchob

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok

E-mail Address : nanteetipl@nu.ac.th

Project Period : 2 years

Abstract:

Several Thai spices/dietary ingredients were previously demonstrated the hypocholesterolemic effects. These studies were mostly conducted in animal models in which the mechanisms of action were not yet well established. Therefore, the present study was aimed to investigate the potential mechanism of hypocholesterolemic action of twelve selected plants (*Hibiscus sabdariffa* L., *Moringa oleifera* Lam., *Cucurbita moschata* Duchesne, *Ananas comosus* (L.) Merr., *Zingiber officinale*, *Morus alba* L., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Piper nigrum* L., *Alpinia galanga* (L.) Willd., *Curcuma zedoaria* Rose, *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., and *Piper retrofractum* Vahl.) widely used as spices and ingredients in various types of Thai food. The extract of *P. nigrum* at 100 µg/ml was found to be the most effective agent as cholesterol uptake inhibitor whereas that of *A. galanga* and *C. zedoaria* effectively inhibited pancreatic lipase activity with IC₅₀ 8.99±3.41 and 12.36±1.23 µg/ml, respectively. The potency of extracts from *M. oleifera*, *H. sabdariffa*, and *C. moschata* at 100 µg/ml were similarly to 0.4 µg/ml pravastatin to inhibit HMG-CoA reductase and possibly reduce cholesterol biosynthesis. This study also demonstrated that several of the tested plants possessed multiple sites of action that were possibly responsible for their cholesterol lowering effect in the *in vivo* model. Black pepper extract was selected to further investigate in the comparison with its standard compound, piperine. The result showed that piperine was likely to be the active substance of black pepper extract as an inhibitor of cholesterol uptake. The extract and piperine did not affect the physicochemical properties of lipid micelles but might share the same site of action as ezetimibe. They could enhance the inhibitory activity of ezetimibe against cholesterol uptake. Thus, their consumption could lower therapeutic dose of ezetimibe.

Keywords: cholesterol; pancreatic lipase; HMG-CoA reductase; Thai spices; herb

รหัสโครงการ: MRG5180254

ชื่อโครงการ: ฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสมุนไพรไทยในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร.นันทิทิพย์ ลิ้มเพียรชอบ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

E-mail Address : nanteetipl@nu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

มีพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด โดยเฉพาะพืชที่มีการใช้เป็นอาหารหรือเครื่องเทศ ที่มีรายงานพบว่ามีฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ โดยข้อมูลส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของพืชเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาค้นคว้า ดังนั้น โครงการงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย 12 ชนิด ได้แก่ กระเจี๊ยบ ขิง ข่า ขมิ้นอ้อย หม่อน สับปะรด พริกไทยดำ ดีปลี ชา พักทอง มะรุม และพรมมิ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ส่วนสารสกัดจากข่า และขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatic lipase) ได้ โดยมีค่า IC_{50} เป็น 8.99 ± 3.41 และ 12.36 ± 1.23 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สารสกัดจากใบมะรุม ดอกกระเจี๊ยบและลำต้นพักทอง ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ในการยับยั้ง HMG-CoA reductase ได้ดีใกล้เคียงกับยา pravastatin ที่ 0.4 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งฤทธิ์นี้อาจส่งผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลได้ ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าพืชหลายชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ได้หลายทาง ซึ่งอาจเป็นคำอธิบายที่ส่งผลในการลดระดับโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองได้ การศึกษาต่อมา ได้ทำการทดสอบสารสกัดจากพริกไทยดำเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน piperine ผลการทดลองพบว่า piperine อาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ของพริกไทยดำในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ และสารนี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ lipid micelles แต่อาจออกฤทธิ์ที่ๆเดียวกับยา ezetimibe และการใช้สารสกัดพริกไทยดำและ piperine สามารถเสริมฤทธิ์กับ ezetimibe ได้ ถ้ามีการใช้ร่วมกับ ezetimibe จึงอาจช่วยลดขนาดความต้องการการใช้ยาได้

คำหลัก โคเลสเตอรอล เอนไซม์จากตับอ่อน เครื่องเทศไทย สมุนไพร

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการ ฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสมุนไพรไทยในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

Cholesterol absorption inhibitory effect of Thai plants in intestinal cell cultures

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ ผู้ร่วมโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ email

ผศ.ดร.นันท์ทิพ ลิ้มเพียรชอบ

ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-961-822 โทรสาร 055-963-731 email: nanteetipl@nu.ac.th

รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์

ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-961-860 โทรสาร 055-963-731 email: k_ingkaninan@yahoo.com

3. สาขาที่ทำการวิจัย เภสัชวิทยา

4. ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล โดยฤทธิ์ดังกล่าวนี้สามารถทำได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยการวัดระดับของ radio-labeled cholesterol ที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษากลไกอื่นๆ ที่อาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด เช่น ฤทธิ์ยับยั้งการย่อยไขมันในระบบทางเดินอาหาร โดยทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล โดยทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase โดยในเบื้องต้น โครงการวิจัยนี้ได้เสนอที่จะศึกษาสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ขิง พริกไทย หม่อน และพรมมิ ซึ่งต่อมา ระหว่างดำเนินงานวิจัยผู้วิจัยได้ทำการทดสอบสมุนไพรชนิดอื่นๆ อีกเป็นทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ ข่า ขา กระเจี๊ยบ ตีปาลี สับปะรด พักทอง ขมิ้นอ้อย และมะรุม ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้บางชนิดมีรายงานถึงฤทธิ์ลดไขมันและ/หรือโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองแล้ว จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

จากการดำเนินการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร 12 ชนิด ในการยับยั้งการดูดซึมหรือการนำโคเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นการศึกษาโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 cells โดยการติดตามสารกัมมันตรังสีของโคเลสเตอรอล ส่วนฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และ HMG-CoA reductase เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* enzymatic assay) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด

มีความแรงที่แตกต่างกันในการทดสอบฤทธิ์ที่กล่าวข้างต้น เช่น สารสกัดพริกไทย มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ สารสกัดขามีฤทธิ์ดีในการยับยั้ง pancreatic lipase ส่วนสารสกัดกระเจียบแดงและผักทองมีฤทธิ์ยับยั้ง HMG-CoA reductase ดี นอกจากนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรแต่ละชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายกลไก ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์เหล่านี้อาจเป็นกลไกที่อธิบายถึงฤทธิ์ลดไขมันหรือโคเลสเตอรอลที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองได้ ซึ่งในระยะเวลาประมาณ 1 ปี ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลองข้างต้นเสร็จสิ้นตามที่เสนอไว้ และขณะนี้ผลงานวิจัยได้ถูกเตรียมในรูป manuscript ที่ได้รับการตอบรับจากวารสาร Natural Product Research เรียบร้อยแล้ว และอยู่ระหว่างดำเนินการตีพิมพ์ โดยเป็นผลงานร่วมกับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาเอก) และนักวิจัยที่ปรึกษา

ในปีที่ 2 ผู้วิจัยจะได้คัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดี ได้แก่ พริกไทยดำ ซึ่งพบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำมีความสามารถในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติม ถึงกลไกการออกฤทธิ์โดยได้ทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน piperine ซึ่งเป็นสารที่พบมากในสารสกัดพริกไทยดำ และคาดว่าจะอาจเป็นสารออกฤทธิ์ (active compound) ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine ขึ้น โคเลสเตอรอลจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง โดยแสดงลักษณะของ dose-dependent จากผลการทดลองสารสกัดพริกไทยดำที่มี piperine ในความเข้มข้นเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน พบว่ามีความสามารถใกล้เคียงกันในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารสำคัญในสารสกัดพริกไทยดำที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ อาจจะเป็น piperine เพื่อจะทดสอบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine กับ ezetimibe โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine ที่ให้ร่วมกับ ezetimibe ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งที่ความเข้มข้นสูง (maximal concentration) ของสาร 2 ชนิด จะไม่พบการเสริมฤทธิ์กัน แต่ถ้าทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำจะพบการเสริมฤทธิ์กัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดพริกไทยดำ และ piperine มี site of action ที่เดียวกับ ezetimibe จึงไม่เกิดการเสริมฤทธิ์กันเมื่อใช้ความเข้มข้นสูง และการที่สารสกัดพริกไทยดำและ piperine สามารถเสริมฤทธิ์กับ ezetimibe ได้ ถ้ามีการใช้ร่วมกับ ezetimibe จึงอาจช่วยลดขนาดความต้องการการใช้ยาได้ ในการค้นหากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine พบว่าสารทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ (physicochemical properties) ของ cholesterol micelles ได้แก่ ขนาดของ micelles และการละลายของโคเลสเตอรอลใน micelles ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติที่กล่าวถึงนี้ อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ ดังนั้น กลไกการออกฤทธิ์อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น เช่น การควบคุมการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมหรือการเปลี่ยนแปลง (metabolism) ของ cholesterol ซึ่งต้องกับการศึกษาต่อไป

สารบัญ

	หน้า
Abstract	1
บทคัดย่อ	2
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	3
สารบัญ	5
สารบัญรูปภาพ	6
สารบัญตาราง	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์	10
วิธีการทดลอง	11
ผลการทดลอง	14
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	36

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ผลของ ezetimibe ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2	17
รูปที่ 2 Ezetimibe ยับยั้งการนำเข้าโคเลสเตอรอลในเซลล์ Caco-2	21
รูปที่ 3 ผลของสารสกัดพริกไทยดำและ piperine ต่อการนำเข้าโคเลสเตอรอลในเซลล์ Caco-2	22

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายชื่อสมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษา	15
ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดสมุนไพร (100 µg/ml) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2	16
ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดสมุนไพร (100 µg/ml) ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้า Caco-2 cells	18
ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase	19
ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase	20
ตารางที่ 6 การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 50 µg/ml, piperine ที่ 50 µM และ ezetimibe 50 µM ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้า เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง	24
ตารางที่ 7 การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 25 µg/ml, piperine ที่ 25 µM และ ezetimibe 25 µM ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้า เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง	24
ตารางที่ 8 การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดพริกไทยดำ, piperine และ ezetimibe ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง	25
ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์รีนต่อขนาดของโคเลสเตอรอลไมเซลล์	26
ตารางที่ 10 สารสกัดพริกไทยดำและไฟเบอร์รีนต่อความสามารถในการละลายของ โคเลสเตอรอลในไมเซลล์	27

บทนำ

ภาวะโรคหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis) เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเป็นโรคหัวใจขาดเลือด (Ischemic Heart Disease) และโรคหลอดเลือดของสมอง (Cerebrovascular Disease) ภาวะโรคหลอดเลือดแข็งเกิดขึ้นเนื่องจากการคั่งของไขมันในผนังหลอดเลือด ไขมันที่คั่งนี้ส่วนใหญ่เป็นโคเลสเตอรอล (Cholesterol) การลดระดับของโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง

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 ร่วมกับยากกลุ่ม 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 เนื่องจากฤทธิ์ลดการสะสมของ cholesterol ester ภายในเซลล์ (Delsing et al., 2001; Kitayama et al., 2006) จะเห็นว่า การพัฒนายาลดโคเลสเตอรอลในปัจจุบันมีเป้าหมายของการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย แม้ว่าเป้าหมายหลัก จะเป็นการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด แต่การที่ยามีฤทธิ์ลดการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งด้วย จะทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจลดลงมากยิ่งขึ้น

นอกเหนือจากสารสังเคราะห์ มีการศึกษาพบว่าสารจากธรรมชาติ เช่น สารกลุ่ม phytosterol ซึ่งเป็น sterol จากพืช (plant sterol) สามารถลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลได้ โดยแย่งกับโคเลสเตอรอลในการดูดซึมที่ brush border membrane จากทางเดินอาหาร (Moghadasian MH, 2000; von Bergmann et al., 2005) มีรายงาน พบว่าสารสกัดจากโสมเกาหลี (*Panax ginseng*) (Rho et al., 2005) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ ACAT ในหลอดทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยง และยังพบว่ามีผลลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของสัตว์ทดลอง (Ji and Gong, 2007) คณะผู้วิจัยคาดว่าจะยังมีสมุนไพรอีกหลายชนิด โดยเฉพาะสมุนไพรที่พบมากในประเทศไทย มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการลดโคเลสเตอรอลในเลือดและป้องกันการเกิดภาวะโรคหลอดเลือดแข็งได้ จากการสืบค้นข้อมูล พบว่ามีสมุนไพรหลายชนิดที่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ลด

โคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองแล้วได้ผลดี แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรหรือสารสำคัญในสมุนไพรดังกล่าวไม่มากนัก ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย โดยในเบื้องต้นจะทำการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ขิง (*Zingiber officinale* Roc.) หม่อน (*Morus alba* L.) พริกไทย (*Piper nigrum*) และพรมมิ (*Bacopa monnieri*) ซึ่งสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดนี้ มีรายงานการวิจัยแล้วพบว่ามีฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลในสัตว์ทดลอง (Bhandari et al., 1998; Fuhrman et al., 2000; El-Beshbishy et al., 2006; Rai et al., 2003; Vijayakumar and Nalini, 2006) ต่อมาได้ทำการทดสอบสมุนไพรอีก 8 ชนิด ได้แก่ กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.) มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ฟักทอง (*Cucurbita moschata* Duchesne) สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) หม่อน (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) ข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* Rose) และตีป्ली (*Piper retrofractum* Vahl.) และจากผลการศึกษาในปีที่ 1 พบว่าสารสกัดพริกไทยดำมีความสามารถในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติม ถึงกลไกการออกฤทธิ์โดยได้ทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน piperine ซึ่งเป็นสารที่พบมากในสารสกัดพริกไทยดำ และคาดว่าจะอาจเป็นสารออกฤทธิ์ (active compound) ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์

วัตถุประสงค์

ปีที่ 1

- 1 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลโดยทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงลำไส้
- 2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งการย่อยไขมันโดยวัดผลต่อการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase
- 3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลโดยวัดผลต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

ปีที่ 2

1. เพื่อทดสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำ และ piperine ที่ความเข้มข้นต่างๆ
2. เพื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดจากพริกไทยดำ และ piperine กับ ezetimibe
3. เพื่อทดสอบผลสารสกัดจากพริกไทยดำ และ piperine ต่อ physicochemical properties ของ cholesterol micelles โดยทดสอบผลต่อขนาดของ micelle size และการละลายของโคเลสเตอรอลใน micelle

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

สารสกัดสมุนไพรบางส่วน เช่น ขิง หม่อน พรมมิ ดีปลี และพริกไทย ได้รับจาก Bioscreening Unit คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดย รศ.ดร. กรรณก อิงคินันท์ ส่วนสมุนไพร เช่น กระเจี๊ยบ มะรุม พักทอง สับปะรด ข่า ขมิ้นอ้อย และชา ได้รับจากสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ ในการเตรียมสารสกัด ขั้นตอนแรกล้างสมุนไพรโดยเปิดให้น้ำไหลผ่าน นำไปอบให้แห้งในตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และทำการตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ตามด้วยการบดด้วยเครื่อง และอบให้แห้งในตูบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2-3 วัน ขั้นตอนต่อไปนำไปหมักด้วย 95% methanol เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองและนำส่วนของเหลวไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotavapor ที่อุณหภูมิ 55-60 °C สารสกัดสมุนไพรถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ Caco-2 cells

เซลล์ Caco-2 cells ได้รับจาก American Type Culture Collection (ATCC) เซลล์ถูกเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin–streptomycin เซลล์ถูกเลี้ยงในตูบ่มที่ 95% ความชื้นของอากาศ 5% CO₂ และที่อุณหภูมิ 37 °C เซลล์เจริญใน 75 cm² flask และเลี้ยงใน 96-well plates เพื่อทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ หรือเลี้ยงใน 24-well plates เพื่อทดสอบการนำเข้าของโคเลสเตอรอล

3. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability test)

การมีชีวิตของเซลล์ถูกวัดโดยใช้วิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,3-diphenyl tetrazolium bromide) ในเซลล์ที่มีชีวิต สาร MTT ที่มีสีเหลืองจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร formazan ที่มีสีม่วง โดยเอนไซม์ mitochondria dehydrogenases ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer) ปริมาณของ formazan จะเป็นสัดส่วนเดียวกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ถูกเลี้ยงใน 96-well plates และบ่มกับสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สารละลาย MTT ถูกเติมเข้าไปในเซลล์ที่มีอาหารเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนครบเวลาบ่ม หลังจากนั้นเอาอาหารออก และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO:ETOH (1:1 v/v) และวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

4. การเตรียมโคเลสเตอรอลไมเซลล์ (Cholesterol micelles preparation)

วิธีการเตรียมโคเลสเตอรอลไมเซลล์ (cholesterol micelles) ถูกปรับจาก Yamanashi, Y และคณะ (Yamanashi et al., 2007) โดยเตรียมสารละลาย [1 α ,2 α (n)-³H] cholesterol, cholesterol และ phosphatidylcholine ใน chloroform ส่วนสารละลาย sodium taurocholate ถูกเตรียมใน methanol นำสารละลายของไขมันและเกลือน้ำดีผสมรวมให้เข้ากัน และนำไประเหยแห้งภายใต้ N₂ gas แผ่นฟิล์มที่ได้จะถูกเก็บไว้ภายใต้ N₂ gas ที่ -20 °C จนกระทั่งใช้ ก่อนใช้ นำแผ่นฟิล์มมาละลายในอาหารสูตร DMEM/F12 จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 µM cholesterol, 2 mM sodium taurocholate, 50 µM

phosphatidylcholine และ 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [$1\alpha,2\alpha(n)^3\text{H}$]cholesterol จากนั้นนำ cholesterol micelles ไป sonicate แล้วกรองผ่าน 0.2- μm และเก็บที่ 37 °C ก่อนนำไปใช้กับเซลล์

5. การวัดการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

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

6. การวัดการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase

การทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ถูกวัดโดยใช้ 4-methylumbelliferyl oleate (4-MU oleate) เป็นสารตั้งต้น (Nakai et al., 2005) 25 μl ของสารสกัดสมุนไพรร (ละลายใน 1% DMSO) หรือ Orlistat (Orlistat ใช้เป็น positive control ของการทดลอง) และ 10 μl ของ 1 mM 4-MU (ละลายใน DMSO) ถูกนำมารวมกับ 40 μl ของ buffer ที่ประกอบด้วย 13 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, และ 1.3 mM CaCl_2 (pH 8.0) ใน 96-well plates และ 25 μl ของ สารละลายเอนไซม์ lipase (50 U/ml) ถูกเติมเพื่อเริ่ม ปฏิกิริยา หลังจากนั้นบ่มไว้ที่ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที ปริมาณการปล่อยของ 4-methylumbelliferone ถูกวัด โดย fluorometrical microplate reader ที่ Ex 360 nm และ Em 535 nm

7. การวัดการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

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

8. การวัดขนาดของไมเซลล์ (micelle size)

โคเลสเตอรอลไมเซลล์ถูกเตรียมดังที่กล่าวข้างต้น (Yamanashi et al., 2007) วิธีการวัดขนาดของ โคเลสเตอรอลไมเซลล์ ถูกปรับจาก Chandra และคณะ (Kirana et al., 2005) ดังนี้ สารละลายไมเซลล์ถูก sonicated และกรองผ่าน 0.2 μm syringe filters และเก็บที่ 37 °C. สารสกัดพริกไทยดำและไฟเพอร์รีน ที่ ความเข้มข้น 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ หรือ μM , ตามลำดับ หรือ 0.1% DMSO ถูกเติมในสารละลายไมเซลล์ และ

บ่มไว้ที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง ขนาดของโคเลสเตอรอลไมเซลล์ถูกวัดโดยใช้เครื่อง a particle size analyzer (Brookhaven).

9. การวัดความสามารถในการละลายของโคเลสเตอรอลในไมเซลล์ (micellar cholesterol solubility)

โคเลสเตอรอลไมเซลล์ถูกเตรียมดังนี้ โคเลสเตอรอลไมเซลล์ประกอบด้วย 1 mM cholesterol, 1 mM sodium taurocholate และ 0.6 mM phosphatidylcholine สารสกัดพริกไทยหรือ ไพเพอร์รีนที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 500 และ 1000 µg/ml หรือ µM, ตามลำดับ หรือ 0.1% DMSO ถูกเติมในโคเลสเตอรอลไมเซลล์ หลังจากบ่มที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง โคเลสเตอรอลไมเซลล์ถูกกรองผ่าน 0.22 µm เพื่อแยกโคเลสเตอรอลที่เกาะติดรวมกัน (precipitated cholesterol) ออกจาก intermicellar cholesterol และความเข้มข้นของ intermicellar cholesterol ถูกวัดโดย cholesterol assay kit (Human).

10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองถูกแสดงในรูป Mean±SEM ข้อมูลการทดลองถูกวิเคราะห์โดยใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p \leq 0.05$ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50% (IC₅₀) คำนวณโดยใช้ Prism program (GraphPad Software Inc)

ผลการทดลอง

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *Caco-2*

ก่อนที่จะศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรหรือสารใดๆ ในการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอล จำเป็นต้องทดสอบเบื้องต้นถึงผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของ *Caco-2* cells โดยทำการทดสอบ cell viability test ก่อน เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ หรือมีผลต่อเซลล์น้อย ในการทดลองนี้ ได้ใช้วิธี MTT assay เพื่อทดสอบ cell viability โดยโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการทดสอบสารสกัดจากสมุนไพร 12 ชนิด ดังระบุไว้ในตารางที่ 1

การทดสอบ cell viability โดยใช้เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงที่มีอายุ 24 ชั่วโมง และให้สารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มากนัก โดย cell viability มีค่ามากกว่า 80 % ยกเว้น กระเจี๊ยบ (*H. sabdariffa*) และ พรหมมี (*B. monnieri*) ที่มีค่า cell viability 72.23 ± 2.23 และ 78.36 ± 10.58 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ในขณะที่สารสกัดจากหม่อน มีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์เล็กน้อย (cell viability 118.78 ± 2.74 %) จากผลการทดลองนี้ แม้ว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml จะ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เล็กน้อย แต่คาดว่าความเข้มข้นนี้จะไม่ส่งผลต่อเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ เนื่องจากเซลล์ที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ จะใช้เซลล์ที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ ที่มีความหนาแน่นสูงและเปลี่ยนสภาพไปเป็นชั้นของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ของผนังลำไส้ (differentiated *Caco-2* cell) ซึ่งชั้นของเซลล์นี้将有ความคงทนต่อสารต่างๆ มากกว่า แต่ไม่เหมาะสมในการนำมาทดสอบ cell viability เพราะมีความหนาแน่นของเซลล์มาก จึงอาจไม่สามารถบอกความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ในขนาดต่างๆ ได้ ดังนั้น สารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml จึงคาดว่าจะไม่มีผลต่อเซลล์ differentiated *Caco-2* cell ซึ่งจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็พบว่าสารสกัดของสมุนไพรทุกชนิดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อเซลล์

ตารางที่ 1 รายชื่อสมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษา

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

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

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดสมุนไพร (100 µg/ml) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2

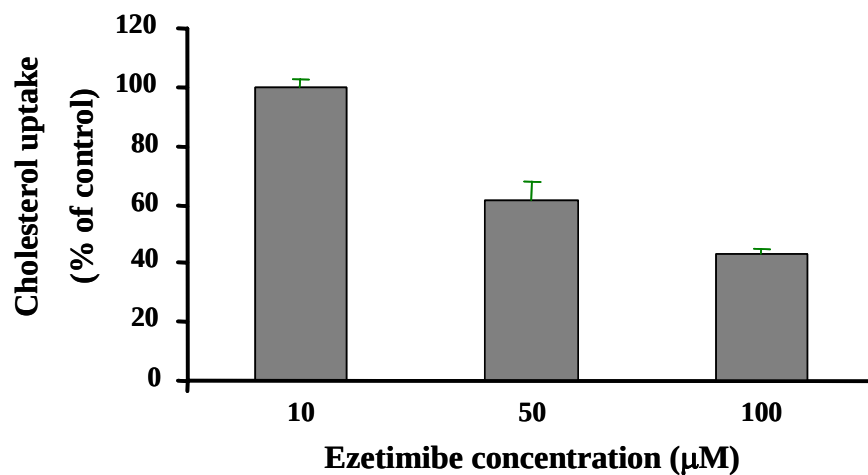
Common name	Cell viability (%)
Control	91.40 ± 1.99
Mulberry	118.78 ± 2.74
Ginger	106.97 ± 1.80
Long pepper	105.13 ± 3.94
Tea	95.01 ± 4.26
Horse radish tree	91.58 ± 6.03
Zedoary, Luya-Luyahan	88.36 ± 14.75
Pepper	86.75 ± 12.47
Pineapple	84.03 ± 1.87
Pumpkin	83.68 ± 2.61
Galangal	82.74 ± 3.15
Brahmi	78.36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

Control คือ เซลล์ที่ให้ 0.1% DMSO ซึ่งใช้ในการละลายสารสกัดสมุนไพร

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

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2

การดูดซึมของโคเลสเตอรอล ถูกวัดโดยการประเมินระดับของโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารรังสี ($[1\alpha,2\alpha(n)^3\text{-}^3\text{H}]\text{cholesterol}$) ที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของ cholesterol micelle และทำการคำนวณปริมาณสารรังสีต่อความเข้มข้นของโปรตีนจาก cell homogenate ในการศึกษานี้ ใช้ ezetimibe เป็น positive control ของการทดลอง ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า ezetimibe มีฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดซึมของโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ ซึ่งผลการทดลองนี้ พบว่าการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงมีค่าลดลงประมาณ 60 % หลังจากให้ ezetimibe ที่ความเข้มข้น 100 µM (รูปที่ 1) ผู้วิจัยได้ทดสอบ ezetimibe ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่พบว่าความสามารถในการยับยั้งโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ไม่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 1 ผลของ ezetimibe ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 เซลล์ Caco-2 มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ลำไส้เล็ก โดยเลี้ยงเซลล์กับ ezetimibe เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ก่อนวัดระดับของโคเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารรังสีที่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ ผลการทดลองแสดงค่า Mean $\pm$ SEM จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate)

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

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดสมุนไพร (100 µg/ml) ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้า Caco-2 cells

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

Control คือ เซลล์ที่ให้ 0.1% DMSO ซึ่งใช้ในการละลายสารสกัดสมุนไพร

ผลการทดลองแสดงค่า Mean ± SEM จาก 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำ 2 ครั้ง (duplicate)

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Pancreatic lipase*

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยอาหารไขมัน เป็นกลไกหนึ่งที่มีผลในการลดระดับของไขมันในเลือด ในการทดลองนี้แสดงถึงผลของสารสกัดสมุนไพร ต่อการทำงานของเอนไซม์ *pancreatic lipase* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้แบบ dose-dependent ซึ่งสามารถคำนวณค่าในรูปของ 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) หรือ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *pancreatic lipase* ได้ 50% ดังแสดงในตารางที่ 4 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากหัวข่า (*A. galangal*) มีความแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด โดย ($IC_{50} = 8.99 \pm 3.41$ µg/ml) ส่วนสารสกัดใบหม่อน (*M. alba*) มีความแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น้อยที่สุด ($IC_{50} = 244.94 \pm 83.96$ µg/ml) อย่างไรก็ตาม สารสกัดสมุนไพรมีความแรงใน

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น้อยกว่า orlistat มาก ซึ่ง orlistat เป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase โดยสามารถยับยั้งการย่อยและดูดซึมอาหารไขมันภายในลำไส้เล็กได้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่ มีแนวโน้มที่จะมีผลรบกวนการย่อยอาหารไขมันในทางเดินอาหาร ซึ่งผลที่ตามมาอาจส่งผลให้มีการลดลงของการดูดซึมโคเลสเตอรอล และเป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Pancreatic lipase

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

IC₅₀ คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50%

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

ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

นอกจากทดลองผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ผู้วิจัยยังได้ทดสอบผลของสมุนไพรดังกล่าวต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ด้วย ซึ่ง HMG-CoA reductase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล และเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม statins อย่างเช่น pravastatin ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิด (100 µg/ml) สามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ได้ แต่ด้วยความแรงที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) สารสกัดจากโสม (M. oleifera) ยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ได้สมบูรณ์เหมือนกับ pravastatin ซึ่งใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้ แม้ว่าสารสกัดขมิ้นมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรตัวอื่นๆ แต่ก็ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้พอสมควร ($53.08 \pm 2.20\%$ inhibition) ถึงแม้ว่าการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายนอกร่างกาย (in vitro) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจจะเหมือนหรือแตกต่างจากการทดลองในร่างกายสัตว์ทดลองหรือมนุษย์ แต่อย่างน้อยผลการศึกษานี้ก็แสดงให้เห็นถึงกลไกที่อาจเป็นไปได้ของสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการลดระดับของโคเลสเตอรอล โดยผ่านการยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล

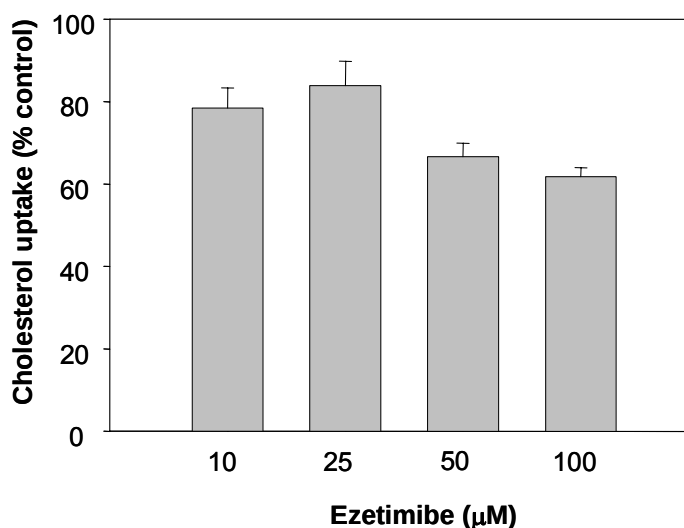
ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase

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

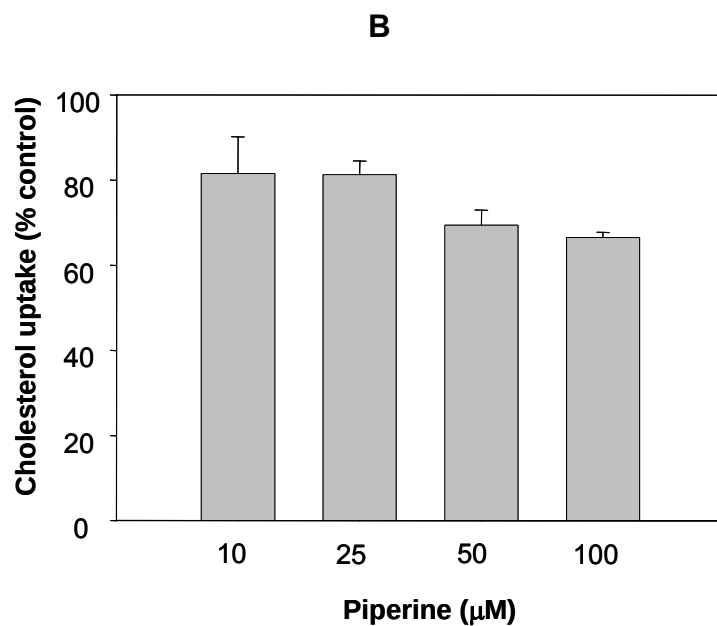
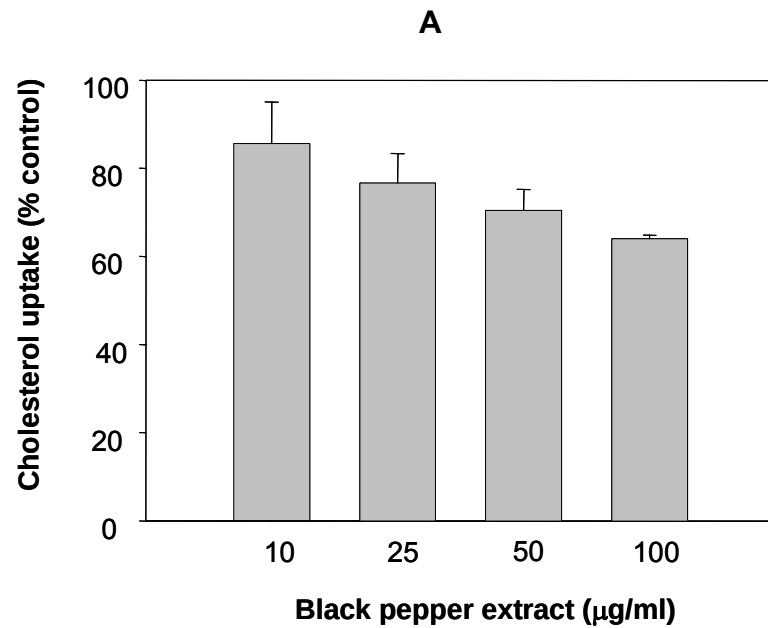
ผลการทดลองแสดงค่า Mean ± SEM ของ 3 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate)

ผลของสารสกัดพริกไทยดำและ ไพเพอร์รีน กับ Ezetimibe ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

ในการทดสอบฤทธิ์ของ ezetimibe พบว่าสามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 ได้ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ ซึ่งแสดงลักษณะของ dose-dependent (รูปที่ 2) ในทำนองเดียวกันกับการทดสอบสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine ขึ้น โคเลสเตอรอลจะถูกนำเข้าเซลล์ได้ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 3 A, B ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 นี้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ (dose-dependent) เช่นกัน สารสกัดพริกไทยดำที่ใช้ในการทดลองนี้ มีปริมาณของ piperine 28.19% เมื่อคำนวณจากปริมาณของ piperine ในสารสกัดพริกไทยดำนี้ พบว่าความเข้มข้นของ piperine ที่ใช้ในการทดลองนี้ เทียบเท่าได้กับความเข้มข้นของ piperine ที่อยู่ในสารสกัดพริกไทยดำ คือ สารสกัดพริกไทยดำ 100 $\mu\text{g/ml}$ จะมี piperine ในความเข้มข้น 100 μM จากผลการทดลองสารสกัดพริกไทยดำที่มี piperine ที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน พบว่ามีความสามารถใกล้เคียงกันในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ Caco-2 ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า สารสำคัญในพริกไทยดำที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ อาจจะเป็น piperine



รูปที่ 2 Ezetimibe ยับยั้งการนำเข้าโคเลสเตอรอลในเซลล์ Caco-2 เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 24 well-plate เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เติม Ezetimibe ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 μM หลังจากนั้น 1 ชม. เติม cholesterol micelles แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 3 ชม. นำ cell lysate ไปวัด radioactivity และความเข้มข้นของโปรตีน คำนวณ cholesterol uptake จำนวนเทียบกับ untreated cells และแสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SEM จาก 3 การทดลอง



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดพริกไทยดำและ piperine ต่อการนำเข้าโคเลสเตอรอลในเซลล์ Caco-2 เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 24 well-plate เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เติมสารสกัดพริกไทยดำ (A) และ piperine (B) ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากนั้น 1 ชม. เติม cholesterol micellces แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 3 ชม. นำ cell lysate ไปวัด radioactivity และความเข้มข้นของโปรตีน คำนวณจะ cholesterol uptake คำนวณเทียบกับ untreated cells และแสดงเป็นค่า Mean±SEM จาก 3 การทดลอง

การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดพริกไทยดำและ ไพเพอร์รีน กับ Ezetimibe ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่าการให้สารสกัดพริกไทยดำ และ piperine มีฤทธิ์ลดการดูดซึมโคเลสเตอรอลในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ เช่นเดียวกับ ezetimibe จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าสารนี้มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนหรือต่างจาก ezetimibe อย่างไร และจะสามารถเสริมฤทธิ์ (additive or synergistic effect) ซึ่งกันและกันได้หรือไม่ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง ของสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine โดยให้ร่วมกับ ezetimibe ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากผลการทดลองดังตารางที่ 6 พบว่าการให้สารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$, piperine ที่ 50 μM และ ezetimibe 50 μM เพียงอย่างเดียวหนึ่ง ทำให้เกิดการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้ใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 70 % แต่เมื่อใช้สารสกัดพริกไทยดำ หรือ piperine ร่วมกับ ezetimibe พบว่ามีผลเพิ่มการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงได้ โดยมีการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้ ประมาณ 60 % ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับการให้ ezetimibe ที่ความเข้มข้น 100 μM แสดงให้เห็นการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine กับ ezetimibe แม้ว่าผลการเสริมฤทธิ์ของสารดังกล่าวยังไม่ชัดเจนนัก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของสารในปริมาณที่อาจจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งเกือบถึงจุดสูงสุดแล้ว

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของสารที่ต่ำลง พบว่าสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$, piperine ที่ 25 μM และ ezetimibe 25 μM เพียงอย่างเดียว สามารถลดการนำเข้าของโคเลสเตอรอลได้เล็กน้อย โดยเซลล์สามารถนำโคเลสเตอรอลเข้าได้ประมาณ 80% ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 7) แต่เมื่อใช้สารร่วมกันพบว่า สารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ หรือ piperine ที่ 25 μM ร่วมกับ ezetimibe 25 μM สามารถเพิ่มการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้เทียบเท่ากับ ezetimibe 50 μM นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังพบว่าการให้สารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ หรือ piperine 10, 20 และ 40 μM ร่วมกับการให้ ezetimibe ที่ความเข้มข้นเดียว คือ 12.5 μM สามารถเพิ่มการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับสารเพียงตัวเดียว (ตารางที่ 8) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นการเสริมฤทธิ์กันของระหว่าง สารสกัดพริกไทยดำ และ piperine กับ ezetimibe และสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine อาจมี site of action ที่เดียวกับ ezetimibe เนื่องจากเมื่อทำการทดสอบด้วยสารที่ความเข้มข้นสูง กลับไม่พบการเสริมฤทธิ์กัน (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

ตารางที่ 6 การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$, piperine ที่ 50 μM และ ezetimibe 50 μM ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

	Cholesterol uptake (% of control)
Black pepper 50 $\mu\text{g/ml}$	70.46 $\pm$ 4.75
Piperine 50 μM	69.38 $\pm$ 3.59
Ezetimibe 50 μM	66.62 $\pm$ 3.26
Black pepper 50 $\mu\text{g/ml}$ + Ezetimibe 50 μM	60.22 $\pm$ 4.30*
Piperine 50 μM + Ezetimibe 50 μM	64.15 $\pm$ 3.78
Ezetimibe 100 μM	61.76 $\pm$ 2.25

*p-value $\leq$ 0.05 เปรียบเทียบกับสารสกัดพริกไทยดำเดี่ยวๆ

ค่าที่แสดงคือ Mean $\pm$ SEM

ตารางที่ 7 การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$, piperine ที่ 25 μM และ ezetimibe 25 μM ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

	Cholesterol uptake (% of control)
Black pepper 25 $\mu\text{g/ml}$	76.59 $\pm$ 6.75
Piperine 25 μM	81.28 $\pm$ 3.24
Ezetimibe 25 μM	83.79 $\pm$ 6.00
Black pepper 25 $\mu\text{g/ml}$ + Ezetimibe 25 μM	63.72 $\pm$ 2.12
Piperine 25 μM + Ezetimibe 25 μM	71.04 $\pm$ 3.19
Ezetimibe 50 μM	66.62 $\pm$ 3.26

ค่าที่แสดงคือ Mean $\pm$ SEM

ตารางที่ 8 การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดพริกไทยดำ, piperine และ ezetimibe ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

	Cholesterol uptake (% of control)
Black pepper 10 µg/ml	91.05 ± 4.98
Black pepper 20 µg/ml	91.68 ± 9.22
Black pepper 40 µg/ml	88.05 ± 5.69
Black pepper 10 µg/ml + Ezetimibe 12.5 µM	83.29 ± 4.16
Black pepper 20 µg/ml + Ezetimibe 12.5 µM	78.23 ± 5.51
Black pepper 40 µg/ml + Ezetimibe 12.5 µM	75.96 ± 3.25
Piperine 10 µM	97.75 ± 8.50
Piperine 20 µM	96.85 ± 12.93
Piperine 40 µM	72.52 ± 6.21
Piperine 10 µM + Ezetimibe 12.5 µM	84.90 ± 3.47
Piperine 20 µM + Ezetimibe 12.5 µM	78.46 ± 5.40
Piperine 40 µM + Ezetimibe 12.5 µM	68.91 ± 3.63
Ezetimibe 25 µM	87.57 ± 6.56

ค่าที่แสดงคือ Mean ± SEM

ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอรีนต่อขนาดของไมเซลล์

ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการนำเข้าสู่ของโคเลสเตอรอล ผู้วิจัยได้ทดสอบผลของ สารสกัดพริกไทยดำและ piperine ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ lipid micelles ซึ่งได้แก่ ขนาดของ micelles และปริมาณของโคเลสเตอรอลที่ละลายอยู่ใน micelles นั้น ซึ่งขนาดของ micelles ที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลทำให้เซลล์นำโคเลสเตอรอลเข้าลดลงได้ ในการทดลองนี้ ขนาดของ micelles ถูกวัดโดยใช้เครื่อง particle size analyzer (Brookhaven) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดพริกไทยดำและ piperine มีผลเพิ่มขนาดของ micelles เพียงเล็กน้อย โดยสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ และ piperine ที่ 100 μM ทำให้ micelle มีขนาดเป็น 114.52 ± 19.58 nm และ 137.23 ± 13.77 nm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (102.02 ± 20.43 nm) แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงที่เกิดจากการได้รับสารสกัดพริกไทยดำหรือ piperine อาจจะได้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของขนาด cholesterol micelles

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอรีนต่อขนาดของโคเลสเตอรอลไมเซลล์

Concentration of black pepper extract ($\mu\text{g/ml}$) or Piperine (μM)	Cholesterol micelles size (nm)	
	Black pepper extract	Piperine
Control	102.02 ± 20.43	102.02 ± 20.43
1	108.63 ± 20.02	107.74 ± 16.41
10	114.52 ± 19.58	109.44 ± 17.55
100	ND	137.23 ± 13.77

ND = No data เนื่องจากสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ครอบคลุมการวิเคราะห์ขนาดของ micelles

ค่าที่แสดงคือ Mean $\pm$ SEM

ผลของสารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อความสามารถในการละลายของโคเลสเตอรอลในไมเซลล์

นอกเหนือจากขนาดของ lipid micelles แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบผลของสารสกัดพริกไทยดำและ piperine ต่อความสามารถในการละลายของโคเลสเตอรอลในไมเซลล์แสดงดังตารางที่ 10 พบว่าความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลใน micelles มีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีสารสกัดพริกไทยดำที่ความเข้มข้นสูง ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงกับ piperine ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงที่ใส่สารสกัดพริกไทยดำหรือไพเพอร์รีนอาจจะไม่ได้เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการละลายของโคเลสเตอรอลในไมเซลล์

ตารางที่ 10 สารสกัดพริกไทยดำและไพเพอร์รีนต่อความสามารถในการละลายของของโคเลสเตอรอลในไมเซลล์

Concentration of black pepper extract ($\mu\text{g/ml}$) or Piperine (μM)	Micellar solubility of cholesterol (mg/dl)	
	Black pepper extract	Piperine
Control	50.43 ± 7.08	48.05 ± 4.81
100	45.64 ± 7.20	49.63 ± 2.11
200	49.74 ± 5.82	49.58 ± 4.95
400	46.45 ± 8.85	47.15 ± 3.28
500	44.67 ± 7.56	47.47 ± 5.61
1,000	42.15 ± 5.94	50.41 ± 3.05

ค่าที่แสดงคือ Mean $\pm$ SEM

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ พบว่าพืชบางชนิด เช่น ข่า ขมิ้นอ้อย ขา และ ขิง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจไม่มากเท่ากับยา orlistat แต่ค่า IC_{50} ก็ต่ำพอสมควร ($\leq 30 \mu\text{g/ml}$) (ตารางที่ 4) ซึ่งพืชเหล่านี้ใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหารไทยอยู่แล้ว ดังนั้นการกินอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชเหล่านี้ก็น่าจะส่งผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งอาจทำให้ลดการย่อยและดูดซึมไขมันได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารจำพวก polyphenols และ saponins ที่ได้จากขา สามารถ ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ (Han et al., 2001; Nakai et al., 2005) เนื่องจากเอนไซม์ pancreatic lipase เป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยไขมัน ดังนั้นสารใดๆ ก็ตามที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ ก็อาจมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดภาวะอ้วน อันเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบในระยะยาวได้ ซึ่งอาหารไทยมีเครื่องเทศที่มีรสเผ็ดร้อนจำนวนมาก ซึ่งคาดว่าจะมีฤทธิ์ในการขัดขวางการดูดซึมไขมันในลำไส้ได้

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

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

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

การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่า การลดการดูดซึมของโคเลสเตอรอลไม่เกี่ยวข้องกับผลสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการเจริญเติบโตหรือการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) (ตารางที่ 2) เนื่องจากพบว่าสัดส่วนของ การมีชีวิตของเซลล์ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ (ตารางที่ 3) จากที่กล่าวข้างต้นว่า การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ใช้เซลล์ undifferentiated Caco-2 cells ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ซึ่งใช้เซลล์ที่มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายลำไส้เล็ก (differentiated Caco-2 cells) คือเป็นเซลล์ที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ เซลล์จะมีความหนาแน่นของมากกว่า (Hidalgo et al., 1989) จากการสังเกตพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ดังกล่าวเมื่อให้สารสกัดสมุนไพร แสดงให้เห็นว่าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยงนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (100 $\mu\text{g/ml}$) ได้ดี จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ไม่ได้เป็นผลจากการรบกวนการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เป็นไปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรอาจจะไปยับยั้งการนำเข้าสู่ของโคเลสเตอรอลโดยกลไกอย่างใดอย่างหนึ่ง

นอกจากทดสอบกลไกที่อาจเป็นไปได้เกี่ยวกับการดูดซึมโคเลสเตอรอล ผู้วิจัยได้ทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล โดย HMG-CoA reductase จะเปลี่ยน HMG-CoA ไปเป็น mevalonate ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (Grigore et al., 2008) HMG-CoA reductase เป็นเป้าหมายหลักของยากลุ่ม statins แต่ผลของสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ยังมีการรายงานค่อนข้างจำกัด มีบางการศึกษาพบว่าสารสกัดจาก *C. zedoaria* สามารถยับยั้งการเจริญของ Vero cell ได้อย่างมีนัยสำคัญซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA

reductase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Liu et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจาก *A. comosus* (0.01–100 µg/ml) สามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ได้ 20-49% อย่างมีนัยสำคัญ (Xie et al., 2007) ในการศึกษาพบพบว่า สารสกัด *A. comosus* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 70% ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากกระบวนการสกัดสารสมุนไพรและแหล่งของพืชสมุนไพร ซึ่งทำให้มีปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน ในศึกษานี้ยังพบว่า สารสกัดจาก มะรุม (*M. oleifera*) สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase ได้เท่าๆ กับ ยา pravastatin ส่วนสารสกัดจาก กระเจี๊ยบ (*H. sabdariffa*) และใบผักทอง (*C. moschata*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ได้ถึง 90% ซึ่งสารสกัดเหล่านี้อาจจะยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในร่างกายได้ ซึ่งเป็นผลให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ และอาจจะเป็นประโยชน์ในการรักษาภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงได้ จากพืชทั้ง 12 ชนิดที่นำมาศึกษานี้ สารสกัดจากข่าและชะ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์นี้น้อยที่สุด (ประมาณ 50%) ผลของการลดโคเลสเตอรอลของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการดูดซึมโคเลสเตอรอลมากกว่าการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล

จากการศึกษานี้ สารสกัดพริกไทยดำมีฤทธิ์ที่ตีที่สุดในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับพืชสมุนไพรตัวอื่นๆ แต่กลไกที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งการดูดซึมและการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด มีหลายปัจจัยที่น่าจะมีอิทธิพลต่อการดูดซึมของโคเลสเตอรอล ในศึกษานี้ คาดว่าสารสำคัญในพริกไทยที่มีบทบาทยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ อาจจะเป็น piperine และยังพบว่า สารสกัดพริกไทยดำและ piperine สามารถเสริมฤทธิ์กับ ezetimibe ในการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ แต่กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน เนื่องจากมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า ถ้าความสามารถในการละลายของไขมัน (solubilization) ในไมเซลล์ (Brufau et al., 2008) หรือขนาดของไมเซลล์เปลี่ยนแปลงไป จะส่งผลต่อการดูดซึมโคเลสเตอรอลได้ (Ikeda et al., 1992; Nagaoka et al., 1999; Raederstorff et al., 2003) ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาผลของสารสกัดพริกไทยดำและ piperine ต่อคุณสมบัติการกายภาพของไมเซลล์ทั้งสองประการดังกล่าว ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สารสกัดพริกไทยดำและ piperine มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของโคเลสเตอรอลไมเซลล์น้อยมาก ทั้งขนาดของไมเซลล์และการละลายของโคเลสเตอรอลในไมเซลล์ จึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดพริกไทยดำ และ piperine ยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลโดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงกระบวนการบางอย่างภายในเซลล์ลำไส้ เช่น อาจมีผลต่อการทำงานหรือการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในการดูดซึมโคเลสเตอรอล อาทิ เช่น ยับยั้งการทำงานของ NPC1L1 ซึ่งมีบทบาทในการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ (Altmann et al., 2004) และ ACAT2 ซึ่งเป็นตัวส่งเสริมให้มีการดูดซึมโคเลสเตอรอลให้ดีขึ้น (Chang et al., 2001) หรืออาจมีผลส่งเสริมให้การทำงานของ ABCG5 และ ABCG8 ซึ่งทำหน้าที่ในการนำโคเลสเตอรอลออกนอกเซลล์ (Graf et al., 2002) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวยังมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ซึ่งอาจทำการศึกษาโดยวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าวด้วย western blotting

โดยสรุป ในการศึกษานี้ได้แสดงกลไกความเป็นไปได้ในการลดระดับของโคเลสเตอรอลของสารสกัดจากสมุนไพร 12 ชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการประกอบอาหารและใช้เป็นยาสมุนไพร โดยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพร (crude extracts) แต่ละชนิดออกฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลที่โดยกลไกหลักที่แตกต่างกัน และบางชนิดออกฤทธิ์ได้หลายกลไก ทั้งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยอาหารและการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล รวมทั้งการยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ ไขมันและไขมันแสดงถึงความเป็นไปได้ในการเป็นตัวยับยั้งการดูดซึมไขมันและโคเลสเตอรอล ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และขัดขวางการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ลำไส้ ในขณะที่มะรุม กระเจี๊ยบ และฟักทอง ให้ผลคล้ายกับ statin ที่ยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล ผ่านทางการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase พืชสมุนไพรเหล่านี้มีการใช้กันแพร่หลายในการเป็นส่วนประกอบของอาหารไทยหลายๆชนิด การรับประทานสมุนไพรเหล่านี้ร่วมกันในสัดส่วนที่เหมาะสม อาจจะสามารถช่วยส่งเสริมให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ โดยเฉพาะพริกไทยดำที่พบว่าสามารถยับยั้งการนำโคเลสเตอรอลเข้าเซลล์ได้ดี และสารสำคัญที่มีฤทธิ์นี้น่าจะเป็น piperine แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน แต่พบว่าสารสกัดพริกไทยดำสามารถเสริมฤทธิ์กับยา ezetimibe ได้ จึงอาจเป็นไปได้ในการพัฒนาสมุนไพรเหล่านี้ให้อยู่ในรูปของอาหารเสริม หรือผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อใช้ในการลดระดับโคเลสเตอรอล หรือเพื่อเสริมฤทธิ์กับยาแผนปัจจุบัน เพื่อลดปริมาณการใช้ยา

- Altmann, S.W., Jr., H.R.D., Zhu, L.j., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. and Graziano, M.P., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. **Science** 303, 1201-1204.
- Bhandari, U., Sharma, J.N. and Zafar, R., 1998. The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. **Journal of Ethnopharmacology** 61, 167-171.
- Brufau, G., Canela, M.A. and Rafecas, M., 2008. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research** 28, 217-225.
- Chang, T.Y., Chang, C.C.Y., Lin, S., Yu, C., Li, B.L. and Miyazaki, A., 2001. Roles of acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase-1 and -2. **Current Opinion in Lipidology** 12, 289-296.
- Chen, C.C., Liu, L.K., Hsu, J.D., Huang, H.P., Yang, M.Y. and Wang, C.J., 2005. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Food Chemistry** 91, 601-607.
- Choi, H., Eo, H., Park, K., Jin, M., Park, E.-J., Kim, S.H., Park, J.E. and Kim, S., 2007. A water-soluble extract from *Cucurbita moschata* shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in a high fat diet-induced obesity mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 359, 419-425.
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawat, S. and Pongrapeeporn, K.U., 2008. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of Ethnopharmacology** 116, 439-446.
- Davies, J. P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A., and Ioannou, Y. A., 2005. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. **Journal of Biological Chemistry** 280, 12710-12720.
- Davis, H.R. and Veltri, E.P., 2007. Zetia: inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to reduce intestinal cholesterol absorption and treat hyperlipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis** 14, 99-108.
- 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. and 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.
- El-Beshbishy, H.A., Singab, A.N.B., Sinkkonen, J. and Pihlaja, K., 2006. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. **Life Sciences** 78, 2724- 733.
- Fuhrman, B., Rosenblat, M., Hayek, T., Coleman, R. and Aviram, M., 2000. Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. **The Journal of Nutrition** 130, 1124-1131.
- Graf, G. A., Li, W.P., Gerard, R.D., Gelissen, I., White, A., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H., 2002. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. **The Journal of Clinical Investigation** 110, 659-669.
- Grigore, L., Norata, G.D. and Catapano, A.L., 2008. Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. **Vascular Health and Risk Management** 4, 267-278.
- Han, L.K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., Zheng, Y.N. and Okuda, H., 2001. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. **International Journal of Obesity** 25, 1459-1464.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J. and Borchard, R.T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology** 96, 736-749.
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyaphrathatsara, N., Sato, H., Herunsale, A. and Suthisisang, C., 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. **Journal of Ethnopharmacology** 103, 252-260.
- Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, E., Nakayama, M., Nagao, H., Takeo, T., Yayabe, F., and Sugano, M., 1992. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1127, 141-146.
- Jesch, E.D. and Carr, T.P., 2006. Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. **Nutrition Research** 26, 579-584.
- Ji, W. and Gong, B.Q., 2007. Hypolipidemic effects and mechanisms of *Panax notoginseng* on lipid profile in hyperlipidemic rats. **Journal of Ethnopharmacology** 113, 318-324.

- Kirana, C., Rogers, P.F., Bennett, L.E., Abeywardena, M.Y., and Patten, G.S., 2005. Naturally derived micelles for rapid in vitro screening of potential cholesterol-lowering bioactives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 4623-4627.
- Kitayama, K., Tanimoto, T., Koga, T., Terasaka, N., Fujioka, T. and Inaba, T., 2006. Importance of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1/2 dual inhibition for anti-atherosclerotic potency of pactimibe. **European Journal of Pharmacology** 540, 121-130.
- Liu, J.C., Chan, P., Hsu, F.L., Chen, Y.J., Hsieh, M.H., Lo, M.Y. and Lin, J.Y., 2002. The *in vitro* inhibitory effects of crude extracts of traditional chinese herbs on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase on vero cells. **American Journal of Clinical Medicine** 30, 629-636.
- Llaverías, G., Laguna, J.C. and Alegret, M., 2003. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). **Cardiovascular Drug Reviews** 21, 33-50.
- Moghadasian, M.H., 2000. Pharmacological properties of plant sterols *in vivo* and *in vitro* observations. **Life Sciences** 67, 605-615.
- Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G., and Yamamoto, K., 1999. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. **The Journal of Nutrition**, 129, 1725-1730.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F. and Kiso, Y., 2005. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 4593-4598.
- Raederstorff, D.G., Schlachter, M.F., Elste, V. and Weber, P., 2003. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. **Journal of Nutritional. Biochemistry**, 14, 326-332.
- Rai, D., Bhatia, G., Palit, G., Pal, R., Singh, S. and Singh, H.K., 2003. Adaptogenic effect of *Bacopa monniera* (Brahmi). **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior** 75, 823-830.
- Rho, M.C., Lee, H.S., Lee, S.W., Chang, J.S., Kwon, O.E., Chung, M.Y. and Kim, Y.K., 2005. Polyacetylenic compounds, ACAT inhibitors from the roots of *Panax ginseng*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 919-922.
- Rho, M.C., Lee, S.W., Park, H.R., Choi, J.H., Kang, J.Y., Kim, K., Lee, H.S. and Kim, Y.K., 2007. ACAT inhibition of alkaloids identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry** 68, 899-903.

- Sampalis, J.S., Bissonnette, .S, Habib, R. and Boukas, S., 2007. Reduction in estimated risk for coronary artery disease after use of ezetimibe with a statin. **The Annals of Pharmacotherapy** 41, 1345-1351.
- Sané, A.T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Ménard, D., Beaulieu, J.F., and Levy, E., 2006. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. **Journal of Lipid Research** 47, 2112-2120.
- Schmitz, G., Schmitz-Madry, A. and Ugocsai, P., 2007 Pharmacogenetics and pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. **Current Opinion in Lipidology** 18, 164-173.
- Vijayakumar, R.S. and Nalini, N., 2006. Piperine, an active principle from *Piper nigrum*, modulates hormonal and apo lipoprotein profiles in hyperlipidemic rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology** 17, 71-86.
- von Bergmann, K., Sudhop, T., Lutjohann, D., 2005. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. **The American journal of cardiology** 96, 10D-14D.
- Weinglass, A.B., Kohler, M., Schulte, U., Liu, J., Nketiah, E.O., Thomas, A., Schmalhofer, W., Williams, B., Bildl, W., McMasters, D.R., Dai, K., Beers, L., McCann, M.E., Kaczorowski, G.J. and Garcia, M.L., 2008 Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105, 11140-11145.
- Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Cai, G. and Du, L., 2007. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. **Journal of Pharmacological Sciences** 103, 267- 274.
- Yamanashi, Y., Takada, T. and Suzuki, H., 2007. Niemann-Pick C1-Like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and β -sitosterol uptake in Caco-2 cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 320, 559-564.

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ชื่อผู้แต่ง Acharaporn Duangjai, Kornkanok Ingkaninan and Nanteetip Limpeanchob

ชื่อเรื่อง Potential mechanisms of hypocholesterolemic effect of Thai spices/dietary extracts

ชื่อวารสาร Natural Product Research

ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า ยังไม่สามารถระบุได้ อยู่ระหว่างดำเนินการ

หมายเหตุ หนังสือตอบรับและ manuscript แสดงไว้ด้านหลัง

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

ชื่อเรื่อง: Potential mechanisms of hypocholesterolemic effect of Thai plants

ชื่องานประชุม : PERCH-CIC congress VI

วันที่-สถานที่ : 3-6 พฤษภาคม 2552 พัทยา จ.ชลบุรี

3. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

มีการสร้างนักวิจัยใหม่ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาเอก

Manuscript

Potential mechanisms of hypocholesterolemic effect of Thai spices/dietary extracts

Acharaporn Duangjai^{a,c}, Kornkanok Ingkaninan^b and Nanteetip Limpeanchob^{a*}

^aDepartment of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; ^bDepartment of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; ^cSchool of Medical Sciences, Naresuan University Phayao, Phayao 56000, Thailand

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

Several Thai spices/dietary ingredients were previously demonstrated the hypocholesterolemic effects. These studies were mostly conducted in animal models in which the mechanisms of action were not yet well established. Therefore, the present study was aimed to investigate the potential mechanism of hypocholesterolemic action of twelve selected plants (*Hibiscus sabdariffa* L., *Moringa oleifera* Lam., *Cucurbita moschata* Duchesne, *Ananas comosus* (L.) Merr., *Zingiber officinale*, *Morus alba* L., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Piper nigrum* L., *Alpinia galanga* (L.) Willd., *Curcuma zedoaria* Rose, *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., and *Piper retrofractum* Vahl.) widely used as spices and ingredients in various types of Thai food. The extract of *P. nigrum* at 100 µg/ml was found to be the most effective agent as cholesterol uptake inhibitor whereas that of *A. galanga* and *C. zedoaria* effectively inhibited pancreatic lipase activity with IC₅₀ 8.99±3.41 and 12.36±1.23 µg/ml, respectively. The potency of extracts from *M. oleifera*, *H. sabdariffa*, and *C. moschata* at 100 µg/ml were similarly to 0.4 µg/ml pravastatin to inhibit HMG-CoA reductase and possibly reduce cholesterol biosynthesis. This study also demonstrated that several of the tested plants possessed multiple sites of action that were possibly responsible for their cholesterol lowering effect in the *in vivo* model.

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

1. Introduction

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

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

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

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

2. Materials and methods

2.1 Materials

Pancreatic lipase (type II, from porcine pancreas), orlistat and all the materials for cell culture were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Gibco. 4-Methylumbelliferyl oleate was obtained from Fluka. Some of plant extracts (ginger, mulberry, brahmi, long pepper, and pepper) were obtained from the Bioscreening Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University and identified by Kornkanok Ingkaninan. The rest of the Thai plants (roselle, horse radish tree, pumpkin, pineapple, galangal, zedoary and tea) were obtained from the Queen Sirikit Botanic Garden (Chiang Mai, Thailand)

2.2 Plants extract preparation

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

2.3 Cell culture preparation

Caco-2 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in CO₂ incubator in a saturated humidity atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. All cells were propagated in culture flasks and subsequently plated in 96-well plates for viability test and in 24-well plates for cholesterol uptake experiment.

2.4 Cholesterol micelle preparation

The micelle preparations were modified from Yamanashi (Yamanashi, Takada, & Suzuki, 2007). Briefly, stock solutions of [$1\alpha,2\alpha(n)^3\text{H}$]cholesterol, cholesterol, phosphatidylcholine were dissolved in chloroform. A stock solution of sodium taurocholate was prepared in methanol. The lipid and bile salt solutions were mixed and evaporated under a stream of N_2 . The lipid film was stored under N_2 at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until use. The micelle solutions were freshly prepared by hydrating the lipid film in serum-free DMEM/F12 so that the final concentrations of the micelle were $1\text{ }\mu\text{M}$ cholesterol, 2 mM sodium taurocholate, $50\text{ }\mu\text{M}$ phosphatidylcholine, and $1\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ [$1\alpha,2\alpha(n)^3\text{H}$]cholesterol. The micelle solutions were sonicated and passed through $0.2\text{ }\mu\text{m}$ syringe filters and kept at $37\text{ }^\circ\text{C}$ before adding to the cells.

2.5 Cholesterol uptake assay

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

2.6 Measurement of pancreatic lipase activity

The pancreatic lipase activity was measured using 4-methylumbelliferyl oleate (4-MU oleate) as a substrate (Nakai, et al., 2005). Twenty-five microliters of plant extracts

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

2.7 HMG-CoA reductase assay

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

2.8 Statistical analysis

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

3. Results and discussion

3.1 Effect of plant extracts on cholesterol uptake

To examine the effect of the extracts on cholesterol absorption in the intestinal lumen, differentiated Caco-2 cells were used as an *in vitro* model. The level of [$1\alpha,2\alpha(n)^3\text{H}$] cholesterol captured in Caco-2 cells was measured and calculated as the amount of tritium cholesterol per mg protein of cell lysates. In this study, ezetimibe was used as

a positive control since it is known to block cholesterol transporter protein leading to the cholesterol uptake inhibition. The uptake of cholesterol into Caco-2 cells was reduced approximately 60% following pre-incubation with 100 μ M ezetimibe.

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

3.2 Pancreatic lipase inhibition

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

consequently reduce cholesterol absorption and eventually result in the lowering of serum cholesterol.

3.3 HMG-CoA reductase inhibition

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

3.4 Discussion

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

hypocholesterolemic activities could be one of the alternatives for cholesterol lowering purpose.

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

In this study, several of the selected plant extracts such as galangal, zedoary, tea (*C. sinensis*) and ginger (*Z. officinale*) showed promising inhibitory activities against pancreatic lipase. Although their potencies are not as strong as orlistat, their IC₅₀ values are quite low ($\leq 30 \mu\text{g/ml}$). Since they are regularly used in Thai food and drink, daily intake of these plants might provide the sufficient amount to inhibit pancreatic lipase and consequently reduce lipid digestion and absorption. Polyphenols and saponins from tea were found to be responsible for pancreatic lipase inhibition (Han, et al., 2001; Nakai, et al., 2005). Although the active compound from *A. galanga* (lesser galangal) as pancreatic lipase inhibitor was not identified, the compound extracted from one of the related plant *A. officinarum* (greater galangal), 3-methylethergalangin, was showed to inhibit pancreatic lipase activity (Shin, Joo Han, & Kim, 2003). There is no report showing the effect of galangal, zedoary and ginger. Although pancreatic lipase is responsible for the triacylglycerol hydrolysis, it was suggested to play an important role in dietary cholesterol absorption. Pancreatic lipase-mediated hydrolysis of the triacylglycerols was necessary for cholesterol transport from lipid emulsion to the intestinal cells (Young & Hui, 1999). Transgenic mice lacking pancreatic lipase exhibited significant reduction of dietary cholesterol

absorption (Huggins, Camarota, Howles, & Hui, 2003). Inhibition of pancreatic lipase may somewhat decrease dietary lipid digestion as well as absorption and consequently prevents obesity and/or hyperlipidemia from long-term high-fat diet consumption. A number of Thai spices-containing foods therefore are anticipated to play a key role to counteract lipid absorption from the intestinal lumen by inhibiting pancreatic lipase.

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

competitive in binding at cholesterol transporters and inhibiting chylomicron formation by interfering with the activity of acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT) within the enterocyte (Brufau, et al., 2008; Jesch & Carr, 2006). However, there is no report indicating significant amount of phytosterol content in the extracts from pepper, tea, galangal and long pepper, thus their cholesterol lowering effect may be the result of other plant components. These compounds possibly affect the cholesterol absorption through non-competitive pathway via specific proteins including NPC1L1 cholesterol transporter or ACAT cholesterol esterification enzyme. ACAT mediates cellular cholesterol esterification and consequently promotes cholesterol absorption (Chang, et al., 2001). Piperine and alkamide in *P. nigrum* were found to inhibit ACAT and consequently decrease lipid accumulation in macrophage and hepatic cells (Matsuda, et al., 2008; Rho, et al., 2007). These observations might indicate indirect mechanism of cholesterol lowering effect of black pepper. The effects of other plants on ACAT activity have not been established.

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

In addition to testing the potential mechanism at site of cholesterol absorption, the effects of plant extracts on cholesterol synthesis enzyme HMG-CoA reductase were also tested. HMG-CoA reductase catalyzes the reduction of HMG-CoA to mevalonate which is the rate-limiting step of cholesterol biosynthesis (Grigore, Norata, & Catapano, 2008). HMG-CoA reductase is the major target of statins, the well-known cholesterol lowering drugs. At this point, there is limited number of study evaluating the HMG-CoA reductase inhibitory activity of this group of plants. The extract from *C. zedoaria* showed significant growth inhibition of Vero cell model indicating effective HMG Co-A reductase inhibitory activity (Liu, et al., 2002). The extract from *A. comosus* (0.01-100 µg/ml) significantly inhibited HMG Co-A reductase activity by 20-49% in *in vitro* assay (Xie, et al., 2007). In the present study, the *A. comosus* extract showed approximately 70% inhibition. The differences in extract protocol and sources of plant could lead to the differences in the composition of active ingredients in the extract. Interestingly, in this study, the extract from horse radish tree (100 µg/ml) inhibited the HMG-CoA reductase activity as effectively as pravastatin (0.4 µg/ml). The extracts from roselle calyx and pumpkin (*C. moschata*) leave could also effectively inhibit this enzyme by 90%. Although it was not the direct enzyme inhibitory activity, polyphenols from roselle was recently showed to reduce the expression of HMG-CoA reductase in HepG2 cells (Yang, et al., 2010). These extracts might inhibit cholesterol biosynthesis in the body which was responsible for their cholesterol lowering activity and thus showed the beneficial treatment for hypercholesterolemia. The extract from galangal and tea showed the lowest (approximately 50% inhibition) among all tested plants. The cholesterol lowering effect of these two plants is likely associated with cholesterol absorption rather than cholesterol synthesis.

In conclusion, the present study demonstrates the potential mechanisms of cholesterol lowering effect of twelve plants that have been widely used in Thai cooking. The crude extracts isolated from this group of plants display different and some show multiple sites of their hypocholesterolemic actions including inhibitions at lipid digestive enzyme, cholesterol uptake into intestinal cells and cholesterol synthetic enzyme. Tea and galangal seem to be the potential candidates as inhibitors of lipid and cholesterol absorption since they inhibit pancreatic lipase and block the cholesterol uptake into intestinal cells. Perhaps, site of action of roselle calyx, horse radish tree and pumpkin leaves appear to be similar to that of statins that inhibit cholesterol synthesis through the suppression of HMG-CoA reductase. Several of these plants are widely used as spices and ingredients in many types of Thai food and have been thought to be good for health. Suitable combinations of these plants could potentiate each other cholesterol lowering activities when used as dietary supplement or nutraceutical food.

Acknowledgements

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

References

- Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303, 1201-1204.
- Bhandari, U., Sharma, J.N., & Zafar, R. (1998). The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 167-171.
- Bhatnagar, D., Soran, H., & Durrington, P.N. (2008). Hypercholesterolaemia and its management. *British Medical Journal*, 337, 503-508.
- Brufau, G., Canela, M.A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28, 217-225.
- Chang, T.Y., Chang, C.C., Lin, S., Yu, C., Li, B.L., & Miyazaki, A. (2001). Roles of acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Current Opinion in Lipidology*, 12, 289-296.
- Chen, C.C., Liu, L.K., Hsu, J.D., Huang, H.P., Yang, M.Y., & Wang, C.J. (2005). Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chemistry*, 91, 601-607.
- Choi, H., Eo, H., Park, K., Jin, M., Park, E.J., Kim, S.H., et al. (2007). A water-soluble extract from *Cucurbita moschata* shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in a high fat diet-induced obesity mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359, 419-425.
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., et al. (2008). The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 439-446.
- Davies, J.P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A., & Ioannou, Y.A. (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 12710-12720.
- El-Beshbishy, H.A., Singab, A.N.B., Sinkkonen, J., & Pihlaja, K. (2006). Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life Sciences*, 78, 2724-2733.
- Frishman, W. (1998). Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. *American Journal of Medicine*, 104, 18S-27S.
- Garg, A., & Simha, V. (2007). Update on dyslipidemia. *The journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92, 1581-1589.
- Grigore, L., Norata, G.D., & Catapano, A.L. (2008). Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 267-278.
- Han, L. K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., et al. (2001). Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 25, 1459 - 1464.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., & Borchard, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96, 736-749.

- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., et al. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 252-260.
- Huggins, K.W., Camarota, L.M., Howles, P.N., & Hui, D.Y. (2003). Pancreatic triglyceride lipase deficiency minimally affects dietary fat absorption but dramatically decreases dietary cholesterol absorption in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 42899-42905.
- Jesch, E.D., & Carr, T.P. (2006). Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutrition Research*, 26, 579- 584.
- Liu, J.C., Chan, P., Hsu, F.L., Chen, Y.J., Hsieh, M.H., Lo, M.Y., et al. (2002). The *in vitro* inhibitory effects of crude extracts of traditional chinese herbs on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase on vero cells. *American Journal of Clinical Medicine*, 30, 629-636.
- Matsuda, D., Ohte, S., Ohshiro, T., Jiang, W., Rudel, L., Hong, B., Si, S., et al. (2008). Molecular target of piperine in the inhibition of lipid droplet accumulation in macrophages. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31, 1063-1066.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., et al. (2005). Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4593-4598.
- Pahan, K. (2006). Lipid-lowering drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1165-1178.
- Pollex, R.L., Joy, T.R., & Hegele, R.A. (2008). Emerging antidyslipidemic drugs. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 13, 363-381.
- Rho, M.C., Lee, S.W., Park, H.R., Choi, J.H., Kang, J.Y., Kim, K., et al. (2007). ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum* *Phytochemistry*, 68, 899-903.
- Sane, A.T., Sinnott, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Menard, D., et al. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *Journal of Lipid Research*, 47, 2112-2120.
- Shin, J. E., Joo Han, M., Kim, D. H. (2003). 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* inhibits pancreatic lipase. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 26, 854-857.
- Weinglass, A.B., Kohler, M., Schulte, U., Liu, J., Nketiah, E.O., Thomas, A., et al. (2008). Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11140-11145.
- Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Cai, G., & Du, L. (2007). Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103, 267- 274.
- Yamanashi, Y., Takada, T., & Suzuki, H. (2007). Niemann-Pick C1-Like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and β -sitosterol uptake in Caco-2 cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320, 559-564.
- Yang, M. Y., Peng, C. H., Chan, K. C., Yang, Y. S., Huang, C. N., Wang, C. J. (2010). The hypolipidemic effect of *Hibiscus sabdariffa* polyphenols via inhibiting lipogenesis and promoting hepatic lipid clearance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 850-859.

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

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

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

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

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

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

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

* = p ≤ 0.05 comparing to control

Table 3. Inhibitory effects of plant extracts on pancreatic lipase

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

^a IC₅₀ = the half maximal (50%) inhibitory concentration.

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

Table 4. Effect of plant extracts (100 µg/ml) on HMG-CoA reductase activity

Common name	Inhibition of HMG-CoA reductase activities (%)
Pravastatin (0.4 µg/ml)	103.96 ± 4.08
Horse radish tree	106.46 ± 3.70
Roselle	94.91 ± 11.86
Pumpkin	92.60 ± 10.17
Ginger	77.43 ± 1.80
Pepper	77.11 ± 15.88
Zedoary, Luya-Luyahan	76.58 ± 0.31
Pineapple	74.36 ± 15.25
Brahmi	65.27 ± 7.00
Mulberry	64.57 ± 5.97
Long pepper	59.52 ± 13.56
Tea	53.61 ± 2.73
Galangal	53.08 ± 2.20

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

- 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(20), 1201-1204.
- Bhandari, U., Sharma, J. N., & Zafar, R. (1998). The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 167-171.
- Bhatnagar, D., Soran, H., & Durrington, P. N. (2008). Hypercholesterolaemia and its management. *British Medical Journal*, 337, 503-508.
- Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28, 217-225.
- Chang, T. Y., Chang, C. C. Y., Lin, S., Yu, C., Li, B. L., & Miyazaki, A. (2001). Roles of acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Current Opinion in Lipidology*, 12(3), 289-296
- Chen, C. C., Liu, L. K., Hsu, J. D., Huang, H. P., Yang, M. Y., & Wang, C. J. (2005). Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chemistry*, 91, 601-607.
- Choi, H., Eo, H., Park, K., Jin, M., Park, E.-J., Kim, S. H., et al. (2007). A water-soluble extract from *Cucurbita moschata* shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in a high fat diet-induced obesity mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359, 419-425.
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N. P., Phivthong-ngam, L., et al. (2008). The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 439-446
- Davies, J. P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A., & Ioannou, Y. A. (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *Journal of Biological Chemistry*, 280(April 1), 12710-12720.
- El-Beshbishy, H. A., Singab, A. N. B., Sinkkonen, J., & Pihlaja, K. (2006). Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life Sciences*, 78, 2724 - 2733.
- Frishman, W. (1998). Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. *American Journal of Medicine*, 104, 18S-27S.
- Garg, A., & Simha, V. (2007). Update on dyslipidemia. *The journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(5), 1581-1589.
- Grigore, L., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2008). Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. *Vascular Health and Risk Management*, 4(2), 267-278.
- Han, L. K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., et al. (2001). Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *International Journal of obesity and related Metabolic Disorders*, 25, 1459 - 1464.

- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchard, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96, 736-749.
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N. P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., et al. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 252-260.
- Huggins, K. W., Camarota, L. M., Howles, P. N., & Hui, D. Y. (2003). Pancreatic triglyceride lipase deficiency minimally affects dietary fat absorption but dramatically decreases dietary cholesterol absorption in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 42899-42905.
- Jesch, E. D., & Carr, T. P. (2006). Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutrition Research*, 26, 579-584.
- Liu, J. C., Chan, P., Hsu, F. L., Chen, Y. J., Hsieh, M. H., Lo, M. Y., et al. (2002). The in vitro inhibitory effects of crude extracts of traditional chinese herbs on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase on vero cells. *American Journal of Clinical Medicine*, 30(4), 629-636.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., et al. (2005). Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4593-4598.
- Pahan, K. (2006). Lipid-lowering drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(10), 1165-1178.
- Pollex, R. L., Joy, T. R., & Hegele, R. A. (2008). Emerging antidyslipidemic drugs. *Expert Opin Emerg Drugs*, 13(2), 363-381.
- Sane, A. T. o., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V. r., Me'nard, D., et al. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *Journal of Lipid Research*, 47, 2112-2120.
- Weinglass, A. B., Kohler, M., Schulte, U., Liu, J., Nketiah, E. O., Thomas, A., et al. (2008). Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), 11140-11145.
- Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Cai, G., & Du, L. (2007). Hypolipidemic mechanisms of ananas comosus L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. *Journal of Pharmacological Sciences*, 103, 267-274.
- Yamanashi, Y., Takada, T., & Suzuki, H. (2007). Niemann-Pick C1-Like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and β -sitosterol uptake in Caco-2 cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320, 559-564.
- Young, S. C., & Hui, D. Y. (1999). Pancreatic lipase/ colipase-mediated triacylglycerol hydrolysis is required for cholesterol transport from lipid emulsions to intestinal cells. *Biochemical Journal*, 339, 615-620.