รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ต่อการขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

Action and mechanism of action of omeprazole on paracellular passive magnesium transport in epithelial-like Caco-2 monolayer

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น

มิถุนายน 2555

สัญญาเลขที่ MRG5380003

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ต่อการขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

Action and mechanism of action of omeprazole on paracellular passive magnesium transport in epithelial-like Caco-2 monolayer

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

Abstract

Project Code : MRG5380003

Project Title : Action and mechanism of action of omeprazole on paracellular passive magnesium transport in epithelial-like Caco-2 monolayer

Investigator : Asst. Prof. Narongrit Thonon

Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University

E-mail Address : narongritt@buu.ac.th

Project Period : June 15, 2010 – June 15, 2012

Aim: Clinical studies reported severe hypomagnesemia associated with long-term omeprazole usage, suggested the intestinal wasting. The present study aimed to elucidate the effect and underlying mechanism of omeprazole action on Mg^{2+} transport across intestinal epithelium.

Methods: Caco-2 monolayer was cultured in culture media containing 200, 400, 600, 800, or 1,000 ng/nl omeprazole for 14 or 21 days before the measurement of bi-directional Mg^{2+} fluxes and electrical parameters in a modified Ussing chamber apparatus. Paracellular permeability of the monolayer was also determined by dilution potential technique and cation permeability study. The Arrhenius plot was performed to elucidate the activation energy of passive Mg^{2+} transport across the Caco-2 monolayers. The expression of claudi-2, -7, and -12 that highly expressed throughout small intestinal epithelium also observed.

Results: Both apical to basolateral and basolateral to apical passive Mg^{2+} fluxes of omeprazole-treated epithelia were decreased in a dose- and time-dependent manner. Omeprazole also decreased the paracellular cation selectivity and changed the paracellular selective permeability profile of Caco-2 epithelium to Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Rb^{+}, and Cs^{+} from series VII to series VI of Eisenman sequence. The Arrhenius plot revealed a higher activation energy for passive Mg^{2+} transport in omeprazole-treated epithelium, indicating that omeprazole affected the paracellular channel of Caco-2 epithelium in such a way that Mg^{2+} movement was impeded. In addition, omeprazole significantly decreased claudin-7 and -12, but not -2, expression in Caco-2 cells.

Conclusions: Omeprazole suppressed claudin-7 and -12 expresion. Omeprazole also decreased the paracellular cation permeability, possibly by decreased negative electrical field strength in the paracellular pores, and increased the activation energy for passive Mg^{2+} transport leading to the suppression of paracellular passive Mg^{2+} absorption. The present study provided the evidence about the adverse effect of omeprazole on intestinal Mg^{2+} absorption.

Keywords : hypomagnesaemia, intestinal epithelium, omeprazole, passive aproption, tight junction

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5380003

ชื่อโครงการ ผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ต่อการขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ชื่อนักวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

E-mail Address : narongritt@buu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 15 มิถุนายน 2553 ถึง 15 มิถุนายน 2555

วัตถุประสงค์: การศึกษาทางคลินิกหลายฉบับรายงานภาวะปริมาณแมกนีเซียมในกระแสเลือดต่ำอย่างรุนแรงสัมพันธ์กับการใช้ยาโอมิพราโซลติดต่อกันเป็นเวลานาน และเสนอว่าภาวะดังกล่าวเกิดจากการสูญเสียการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของโอมิพราโซลต่อการขนส่งแมกนีเซียมในแผ่นเยื่อบุลำไส้

วิธีทดลอง: แผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ถูกเลี้ยงในสารน้ำเลี้ยงเซลล์ปกติ หรือผสมโอมิพราโซลความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, หรือ 1,000 ng/ml เป็นเวลา 14 หรือ 21 วัน ก่อนนำไปศึกษาการขนส่งแมกนีเซียมโดยใช้ modified Ussing chamber ค่าการซึมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงถูกทดสอบโดยใช้ dilution potential technique และ cation permeability study กราฟ Arrhenius plot ถูกใช้เพื่อศึกษาพลังงานก่อกัมมันต์ของการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 การแสดงออกของโปรตีน claudin-2, -7, และ -12 ซึ่งมีตลอดความยาวลำไส้เล็กก็ถูกศึกษาเช่นกัน

ผลการทดลอง: โอมิพราโซลลดการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงานโดยขึ้นกับความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับ โอมิพราโซลยังลดคุณสมบัติการเลือกประจุบวก และเปลี่ยนค่าการการซึมผ่านของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อ Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Rb^{+}, และ Cs^{+} จาก Eisenman sequence VII เป็น Eisenman sequence VI ผลจากการศึกษา Arrhenius plot แสดงว่าโอมิพราโซลเพิ่มพลังงานก่อกัมมันต์ของการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงาน บ่งชี้ว่าโอมิพราโซลมีฤทธิ์ขัดขวางการเคลื่อนที่ของ Mg^{2+} ผ่าน paracellular channel นอกจากนั้นโอมิพราโซลยังลดการแสดงออกของ claudin-7 และ -12 ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

สรุปผลการทดลอง: โอมิพราโซลลดการแสดงออกของ claudin-7 และ -12 และลดคุณสมบัติการเลือกประจุบวกของช่องว่างระหว่างเซลล์ โดยลดสนามไฟฟ้าประจุลบในช่องว่างระหว่างเซลล์ และเพิ่มพลังงานก่อกัมมันต์ของการขนส่ง Mg^{2+} แบบไม่ใช้พลังงาน ส่งผลให้การการดูดซึม Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลดลง การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลข้างเคียงของการใช้โอมิพราโซลต่อการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้

คำหลัก: ภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำ, แผ่นเยื่อบุลำไส้, โอมิพราโซล, การดูดซึมแบบไม่ใช้พลังงาน, ไทท์ จังชัน

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาของปัญหา

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นอิออนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อร่างกายมนุษย์ หากปริมาณ Mg^{2+} ในร่างกายลดลงอาจก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพ อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน, Alzheimer's disease, และ ความดันโลหิตสูง ดังนั้นระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดจึงต้องถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมคือ 0.7 – 1.1 mmol/l โดยอาศัยการทำงานของอวัยวะสำคัญสองส่วนคือ ลำไส้ซึ่งมีหน้าที่ดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย และไตซึ่งมีหน้าที่ขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย โดยปกติประมาณ 90% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมโดยลำไส้จะดูดซึมผ่านทางช่องระหว่างเซลล์ (paracellular route) ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกลไกที่ไม่ใช้พลังงานแต่อาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg^{2+} และถูกควบคุมโดยโปรตีนใน tight junction ได้แก่ claudin ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถคัดเลือกชนิดประจุ และขนาดของสารที่เคลื่อนที่ผ่าน tight junction โดยเฉพาะ claudin-16 และ -19

omeprazole เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ H^+/K^+-ATPase และนิยมใช้รักษาโรคที่จำเป็นต้องยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานานมีระดับของ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ในกระแสเลือดลดลง เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยให้ Ca^{2+} เสริมนั้นสามารถทำให้ระดับ Ca^{2+} ในกระแสเลือดกลับเป็นปกติได้ แต่การให้ Mg^{2+} เสริมในปริมาณที่สูงกลับไม่สามารถเพิ่มระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดรวมถึงปริมาณที่ขับถ่ายในปัสสาวะให้กลับเป็นปกติได้ แสดงว่า omeprazole น่าจะมีผลในการยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ รวมถึงมีผลรบกวนการทำงานของ claudin ชนิดที่ใช้ขนส่ง Mg^{2+} อย่างไรก็ดีผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องระว่างเซลล์ในลำไส้นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

Caco-2 cell เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ แต่แสดงคุณลักษณะสำคัญของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กไม่ว่าจะเป็นด้านโครงสร้าง หรือการทำงานซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำไส้เล็กของมนุษย์ ดังนั้น Caco-2 cell จึงนิยมใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการดูดซึมยา หรือ อิออน อาทิเช่น Mg^{2+} นอกจากนั้น Caco-2 cell มีการแสดงออกของ H^+/K^+-ATPase ซึ่งเป็นโปรตีน เป้าหมายในการออกฤทธิ์ของ omeprazole บ่งชี้ว่า Caco-2 cell จะสามารถตอบสนองต่อการให้ omeprazole ได้ ดังนั้นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จึงเป็นแบบจำลองที่เหมาะสมในการศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg^{2+} ในเซลล์ลำไส้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 ศึกษาผลของ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

2.2 ศึกษาผลของ omeprazole ต่อคุณสมบัติต่างๆ ของ tight junction ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

3. ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ทำการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 (ATCC® Number: HTB-37) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) ที่ประกอบด้วย heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 12%, nonessential amino acid (Sigma) และ 1% penicillin-streptomycin (GIBCO) 1% โดยเลี้ยงใน T–flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 75 cm^2 ในตู้ปลอดเชื้อที่ 37 °C และความเข้มข้น CO_2 ที่ 5%

ในการเตรียมแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เพื่อนำไปศึกษาวิจัยนั้น เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะถูกเลี้ยงบน polyester Snapwell (Snapwell™ inserts, Corning, Corning, NY, USA) ที่ความหนาแน่น 5×10^5 cells/cm^2 เป็นเวลา 14 หรือ 21 วัน ใน DMEM ปกติ หรือ DMEM ที่มี omeprazole (Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, หรือ 1,000 ng/ml

3.2 การวัดค่าทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ในการทดลองนี้แผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะถูกใส่ลงใน modified Ussing chamber ซึ่งแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะอยู่ตรงกลางและแบ่งระหว่างสองด้านของ chamber โดยที่ แผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะแช่อยู่ใน bathing solution ที่ประกอบด้วย NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, $MgCl_2$ 1.1 mM, $CaCl_2$ 1.25mM, $NaHCO_3$ 23 mM, D-glucose 12 mM, L-glutamine 2.5 mM และ mannitol 2 mM และมีค่า osmolarity เท่ากับ 290-295 mmol kg^{-1} H_2O ตลอดการทดลองใน modified Ussing chamber system จะมีการให้ humidified 5% CO_2 และ 95% O_2 เข้าไปในระบบ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C

ในการวัดค่าทางไฟฟ้านั้น chamber แต่ละด้านจะถูกต่อพ่วงด้วย Ag/AgCl electrode จำนวน 2 คู่ โดย electrode คู่แรกจะอยู่บริเวณชิดกับแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เพื่อทำการวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (Vt) โดยปลายอีกด้านของ electrode ที่วัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้านั้นจะต่อพ่วงกับ pre-amplifier (model ECV-4000; World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA) ส่วน electrode อีกคู่นั้นจะต่อเข้าที่ปลายแต่ละด้านของ chamber เพื่อให้กระแส short-circuits current (Isc) จาก ECV-4000 current-generating unit (World Precision Instrument) ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าและค่า Isc ที่ได้มาจะถูกนำไปคำนวณเพื่อหาค่าความต้านทานไฟฟ้าของแผ่น เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยใช้กฎของโอห์ม

3.3 การศึกษาการขนส่ง Mg ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 โดยใช้ Xylidyl-Blue

ในการศึกษาการขนส่ง Mg จะทำการทดลองด้วย modified Ussing chamber system เช่นเดียวกับการศึกษาค่าทางไฟฟ้าแต่จะเพิ่มความเข้มข้น $MgCl_2$ ใน bathing solution ด้าน apical เป็น 2.5, 5, 10, 20, 40, และ 80 mM โดยไม่มี $MgCl_2$ ใน bathing solution ด้าน basolateral ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความลาดเอียงทางความเข้มข้น จากนั้นจึงเก็บตัวอย่าง 200 µL จาก bathing solution ด้าน basolateral ทุกๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนผสมตัวอย่างกับ Xylidyl-Blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 mM ปริมาตร 1 mL แล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) ความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะถูกคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับเส้นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานซึ่งเกิดจากการนำ 200 µL ของ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 8, 20, 40 หรือ 80 mM ผสมกับ Xylidyl-Blue reagent 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น จากนั้น

จึงหากราฟเส้นตรงความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Mg^{2+} โดย เส้นกราฟต้องมีค่า $r^2 \geq 0.95$

เพื่อทดสอบ Mg^{2+} transport kinetic ซึ่งจะทำให้ทราบว่า omeprazole มีผลต่อกลไกใดในการขนส่ง Mg^{2+} ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ค่า $Mg_{A\rightarrow B}$ จะถูกนำไปศึกษาโดยใช้สมการ modified Michaelis–Menten kinetic plus linear component (1)

$$Mg_{A\rightarrow B}\,\text{transport} = \frac{(V_m \times C_{Mg})}{(K_m + C_{Mg})} + mC_{Mg} \quad (1)$$

โดยค่า V_m คือ maximal rate of saturable $Mg_{A\rightarrow B}$ transport คืออัตราการขนส่ง Mg^{2+} สูงสุดโดยกลไกขนส่งแบบใช้พลังงาน (แบบผ่านเซลล์), K_m คือ rate constant of saturable $Mg_{A\rightarrow B}$ transport คือค่าคงที่ของอัตราการขน Mg^{2+} โดยกลไกขนส่งแบบใช้พลังงาน (แบบผ่านเซลล์), m คือ rate constant for non-saturable $Mg_{A\rightarrow B}$ transport คือ อัตราการขน Mg^{2+} โดยกลไกขนส่งแบบไม่ใช้พลังงาน (แบบผ่านช่องว่างระเซลล์) และ C_{Mg} คือค่าความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในด้าน apical

3.4 การศึกษา charge selectivity โดย dilution potential technique

ก่อนเริ่มทำการศึกษาแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะแช่อยู่ใน bathing solution ซึ่งมีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 145 mM ใน modified Ussing chamber setup เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 3.2 เมื่อเริ่มทำการทดลอง bathing solution ด้าน basolateral จะถูกเปลี่ยนเป็น bathing solution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 72.5 mM จากนั้นจะวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า แล้วนำค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปไปใช้ในการคำนวณด้วย Goldman-Hodgkin-Katz equation และ Kimizuka-Koketsu equation เพื่อหาค่า permeability ratio ของ Na ต่อ Cl (P_{Na}/P_{Cl}) ค่า sodium permeability (P_{Na}) และ ค่า chloride permeability (P_{Cl})

3.5 การศึกษาค่า absolute permeability ของ Li^+ (P_{Li}), Na^+ (P_{Na}), K^+ (P_K), Rb^+ (P_{Rb}), Cs^+ (P_{Cs}), และ Mg^{2+} (P_{Mg})

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันว่า omeorazole มีผลยับยั้งการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่าง เซลล์และรบกวนการทำงานของ Mg-selective claudin จริง โดยศึกษาค่า absolute permeability ของอิออนประจุบวกได้แก่ Li^+, Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+, Ca^{2+}, และ Mg^{2+}

การศึกษาค่า P_{Mg} จะทำการศึกษาพร้อมกับการศึกษาการขนส่ง Mg^{2+} ซึ่งค่า P_{Mg} สามารถคำนวณได้โดยการนำค่าอัตราการขนส่ง Mg หารด้วยค่าความต่างความเข้มข้นของ Mg^{2+} ใน bathing solution ด้าน apical และ basolateral

การศึกษาค่า P_{Li}, P_{Na}, P_K, P_{Cs}, และ P_{Rb} นั้นจะทำการศึกษาใน modified Ussing chamber setup เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 3.2 และทำการวัดค่าทางไฟฟ้า จากนั้นเปลี่ยน bathing solution ด้าน apical เป็น bathing solution ที่ผสม LiCl, NaCl, KCl, CsCl, หรือ RbCl ที่ความเข้มข้น 100 mM และเปลี่ยน bathing solution ด้าน basolateral เป็น bathing solution ที่ผสม LiCl, NaCl, KCl, CsCl, หรือ RbCl ที่ความเข้มข้น 50 mM จากนั้นจึงวัดค่า

ทางไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป แล้วนำค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปไปใช้ในการคำนวณด้วย Goldman-Hodgkin-Katz equation และ Kimizuka-Koketsu equation เพื่อหาค่า absolute permeability ของอิออนแต่ละชนิด

3.7 การประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means ± SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูล สองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะทดสอบโดย One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า P □ 0.05 ประเมินผลข้อมูลโดย GraphPad Prism (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA)

เนื้อหาผลการวิจัย

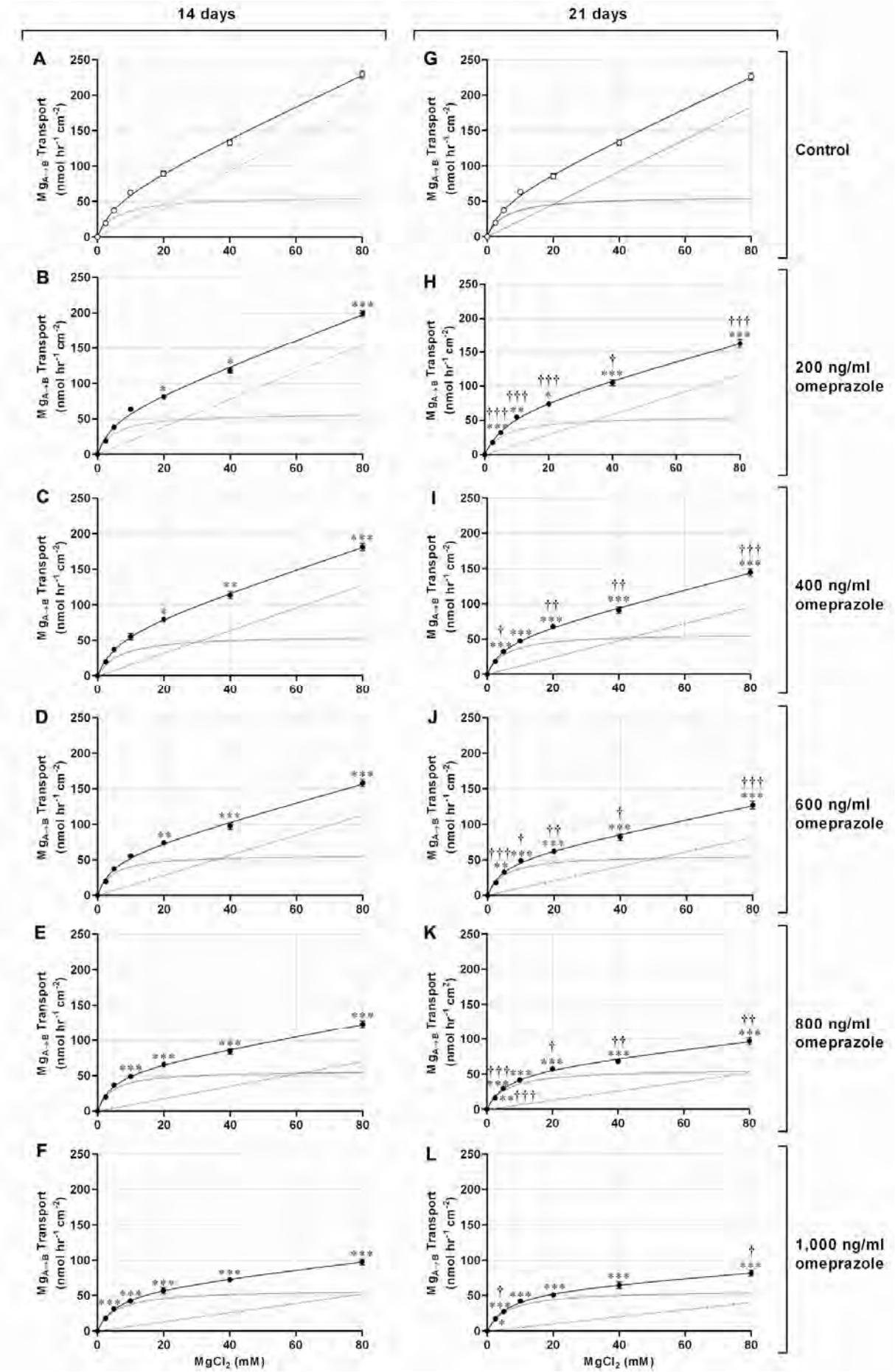
1. omeprazole ลดการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ โดยขึ้นกับระยะเวลาและความเข้มข้นของ omeprazole ที่ได้รับ

ในกลุ่มแผ่นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ 1A–1F) การขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ ในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200 (1B), 400 (1C), 600 (1D), 800 (1E) หรือ 1,000 ng/ml (1F) มีค่าน้อยกว่าการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ ในกลุ่มควบคุม (1A) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ จะมีค่าลดลงมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้นมากกว่า ส่วนในกลุ่มแผ่นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน (รูปที่ 1G–1L) พบว่าผลการทดลองคล้ายคลึงกับผลการทดลองข้างต้น

นอกจากนั้นหากพิจารณาถึงระยะเวลาที่แผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ได้รับ omeprazole พบว่าการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ ในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200 ng/ml เป็นเวลา 21 วัน (1H) มีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200 ng/ml เป็นเวลา 14 วัน (1B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเช่นเดียวกันการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ ในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 400 (1I), 600 (1J), 800 (1K) และ 1,000 ng/ml (1L) เป็นเวลา 21 วัน มีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ omeorazole ความเข้มข้นเท่ากันเป็นเวลา 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แสดงว่า omeprazole มีฤทธิ์ยับยั้งการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ ซึ่งคือการยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} จากโพรงลำไส้เข้าสู่ร่างกายนั่นเอง นอกจากนั้นผลการทดลองยังบ่งชี้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ ของ omeprazole นั้นขึ้นกับความเข้มและระยะเวลาที่แบบจำลองเยื่อบุลำไส้ได้รับ omeprazole หากได้รับที่ความเข้มมากกว่าและระยะเวลานานกว่าจะมีฤทธิ์ในการกดการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ มากกว่า

รูปที่ 1 แสดงค่า $Mg_{A\rightarrow B}$ transport ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ใน DMEM ปกติ (**A**) หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole ความเข้มข้น 200 ng/ml (**B**), 400 ng/ml (**C**), 600 ng/ml (**D**), 800 ng/ml (**E**), 1000 ng/ml (**F**) หรือ ค่า $Mg_{A\rightarrow B}$ transport ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ใน DMEM ปกติ (**G**) หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole ความเข้มข้น 200 ng/ml (**H**), 400 ng/ml (**I**), 600 ng/ml (**J**), 800 ng/ml (**K**), 1000 ng/ml (**L**). เส้นสีเทาทึบแสดงอัตราการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ แบบผ่านเซลล์ และเส้นสีเทาประแสดงอัตราการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole ในระยะวันเลี้ยงเซลล์เท่ากัน (เทียบแนวตั้งของรูป) †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้นเท่ากันที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (เทียบแนวนอนของรูป), $n = 9$


14 days
21 days
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
Control
200 ng/ml omeprazole
400 ng/ml omeprazole
600 ng/ml omeprazole
800 ng/ml omeprazole
1,000 ng/ml omeprazole
Mg A→B Transport (nmol hr-1 cm-2)
MgCl2 (mM)

2. omeprazole ลดการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

ผลการทดลองจากตารางที่ 1 โดยลดอัตราการขน Mg^{2+} โดยกลไกขนส่งแบบไม่ใช้พลังงานผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (*m*) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole เป็นเวลา 14 และ 21 วัน อย่างไรก็ดี omeprazole ไม่มีผลต่อการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ แบบผ่านเซลล์โดยกลไกที่ใช้พลังงาน (V_m และ K_m) นอกจากนั้นการออกฤทธิ์ของ omeprazole นั้นขึ้นกับระยะเวลาและความเข้มข้นของ omeprazole ที่ได้รับ เช่นเดียวกันกับผลการทดลองในรูปที่ 1 กล่าวคือค่า *m* จะลดลงมากกว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาและความเข้มข้นของการให้ omeprazole (ตารางที่ 1)

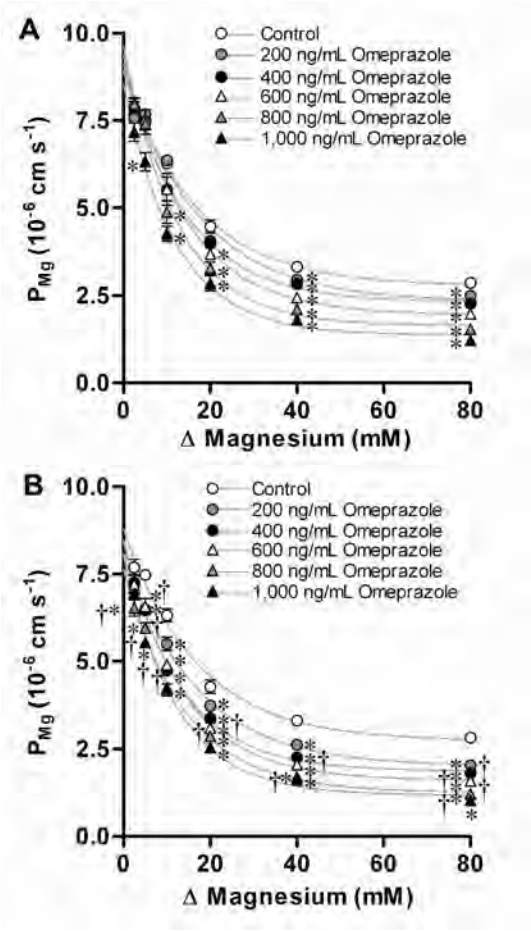
ตารางที่ 1 แสดง Kinetic data ของการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$

	V_m (nmol/hr/cm^2)	K_m (mM)	m ($\times 10^{-3}$ cm/hr)
14 days;			
Control	57.22 ± 8.41	5.62 ± 1.83	2.18 ± 0.11
Omeprazole treated			
200 ng/mL	58.12 ± 6.19	4.55 ± 1.23	1.80 ± 0.08*
400 ng/mL	62.82 ± 9.64	5.83 ± 2.22	1.54 ± 0.12*
600 ng/mL	57.01 ± 7.49	4.48 ± 1.44	1.28 ± 0.09*
800 ng/mL	59.35 ± 7.40	4.71 ± 1.40	0.83 ± 0.09*
1,000 ng/mL	58.84 ± 7.52	5.84 ± 1.59	0.52 ± 0.10*
21 days;			
Control	55.82 ± 8.02	5.09 ± 1.89	2.17 ± 0.10
Omeprazole treated			
200 ng/mL	57.81 ± 10.41	7.48 ± 2.24	1.26 ± 0.12*†
400 ng/mL	53.47 ± 7.59	5.10 ± 1.87	1.18 ± 0.10*†
600 ng/mL	53.12 ± 7.53	4.42 ± 1.68	0.96 ± 0.09*†
800 ng/mL	57.65 ± 6.76	5.97 ± 1.51	0.53 ± 0.08*†
1,000 ng/mL	57.99 ± 7.72	6.09 ± 1.48	0.49 ± 0.07*

*$P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole ในระยะวันเลี้ยงเซลล์เท่ากัน, †$P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้นเท่ากันที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน, $n = 9$

3. omeprazole ลดค่า apical to basolateral Mg^{2+} permeability ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

จากผลการทดลองในรูปที่ 2 พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดค่า apical to basolateral Mg^{2+} permeability ทั้งในแผ่นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 (2A) และ 21 วัน (2B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นกับระยะเวลาและความเข้มข้นของ omeprazole ที่ได้รับ กล่าวคือค่า Mg^{2+} permeability จะลดลงมากกว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาและความเข้มข้นของการให้ omeprazole เช่นเดียวกันกับผลการทดลองในรูปที่ 1 และตารางที่ 1

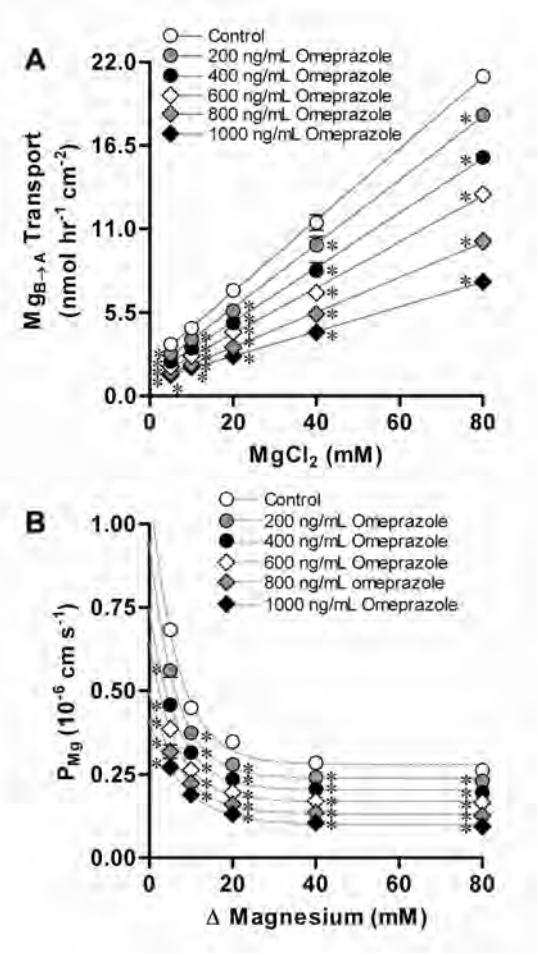


รูปที่ 2 แสดงค่า apical to basolateral Mg^{2+} permeability ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (**A**) หรือ 21 วัน (**B**), $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole ในระยะวันเลี้ยงเซลล์เท่ากัน, †$P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้นเท่ากันที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน, $n = 9$

4. omeprazole ลดการขนส่ง $Mg_{B\rightarrow A}$ และลดค่า basolateral to apical Mg^{2+} permeability

ดังแสดงในรูปที่ 3 omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่ง $Mg_{B\rightarrow A}$ (3A) และลดค่า basolateral to apical Mg^{2+} permeability (3B) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของ omeprazole ที่ได้รับ หากความเข้มข้นมากกว่าจะมีฤทธิ์ลดค่า $Mg_{B\rightarrow A}$ และลดค่า basolateral to apical Mg^{2+}

permeability มากกว่า ซึ่งการขนส่ง $Mg_{B\rightarrow A}$ ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ และแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 นั้นจะผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์เท่านั้น ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์



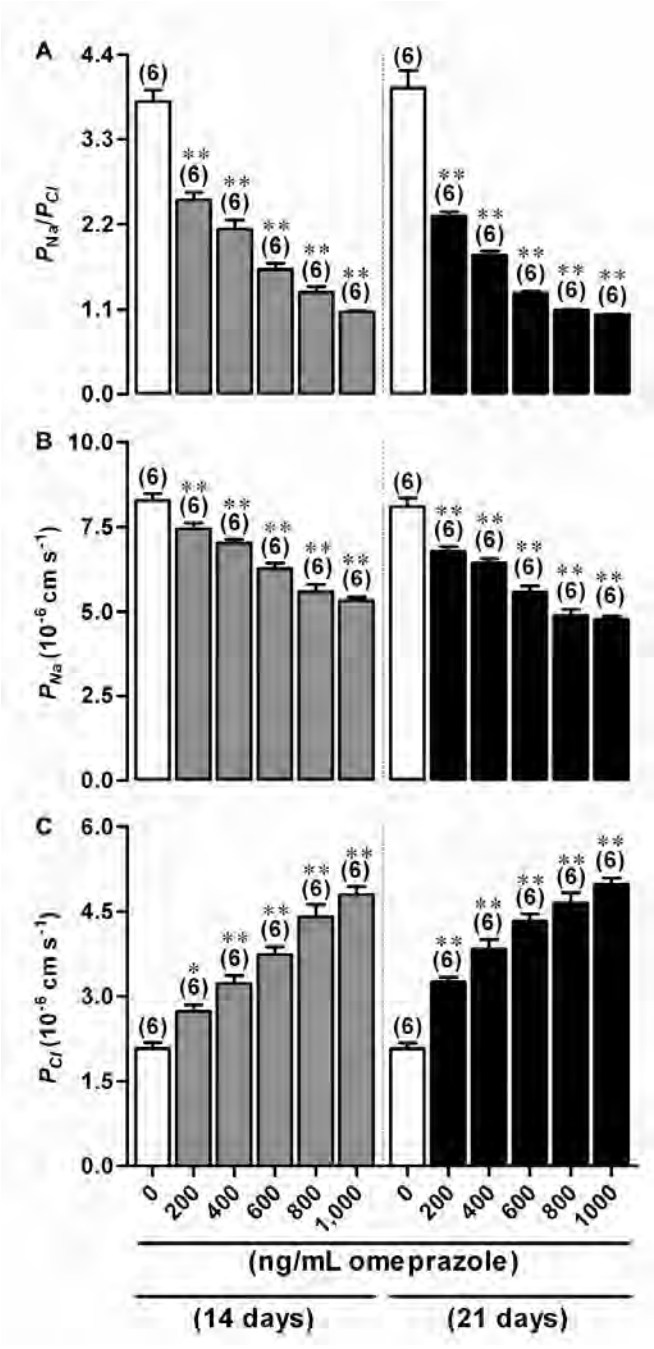
รูปที่ 3 แสดงค่า $Mg_{B\rightarrow A}$ (**A**) และค่า basolateral to apical Mg^{2+} permeability (**B**) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14, $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole, $n = 6$

จากผลการทดลองในข้อที่ 1 ถึง 4 บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นกลไกที่ไม่ใช้พลังงานของแบบจำลองเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก ทั้งนี้กลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้มนุษย์นั้นอาศัยกลไกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ถึง 90% ดังนั้นการที่ omeprazole มีฤทธิ์กดการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์จึงน่าจะเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำในผู้ป่วยที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน

5. omeprazole ลดคุณสมบัติ cation selectivity ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

จากรูปที่ 4 พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดค่า P_{Na}/P_{Cl} และค่า P_{Na} แต่เพิ่มค่า P_{Cl} ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในแผ่นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 และ 21 วัน โดยขึ้นกับความเข้มข้นของ

omeprazole ที่ได้รับ บ่งชี้ว่า omprazole ลด cation selectivity และเพิ่ม anion selectivity ของช่องว่างระหว่างเซลล์ของแบบจำลองแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ จึงทำให้แผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ขนส่งอิออนประจุบวก รวมถึง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ลดลง



รูปที่ 4 แสดงค่า P_{Na}/P_{Cl} (**A**), ค่า P_{Na} (**B**) และค่า P_{Cl} (**B**) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 หรือ 21 วัน ใน DMEM ปกติ หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800,หรือ 1,000 ng/ml, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole ในระยะวันเลี้ยงเซลล์เท่ากัน, $n = 6$

6. omeprazole ลดค่า TER ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่มค่า TER ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Cacao-2 สถิติ ทั้งในแผ่นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 และ 21 วัน แต่ omeprazole ไม่มีผลต่อค่า I_{SC} และค่า PD แสดงว่ามีการเพิ่มความต้านทานของการขนส่งอิออนผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในแบบจำลองแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก

ตารางที่ 2 แสดงค่าคุณสมบัติทางไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

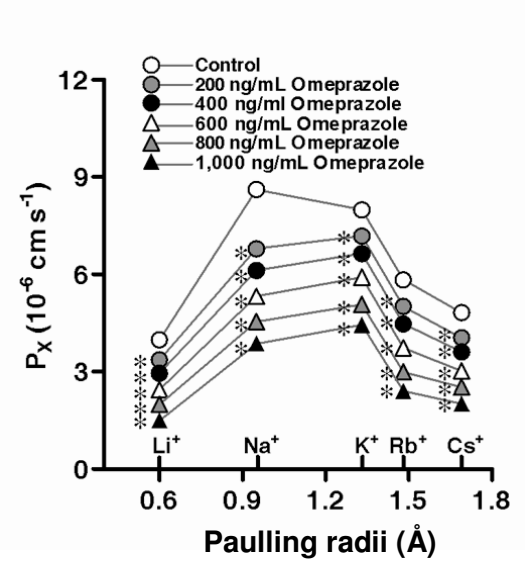
	n	PD (mV)	I_{SC} ($\mu A/cm^2$)	TER ($\Omega.cm^2$)
14 days;				
Control	9	0.99 ± 0.12	3.09 ± 0.36	322.19 ± 6.37
Omeprazole treated				
200 ng/mL	9	1.03 ± 0.54	2.52 ± 0.39	413.64 ± 12.95
400 ng/mL	9	0.98 ± 0.14	2.24 ±0.29	433.23 ± 17.66
600 ng/mL	9	1.08 ± 0.15	2.29 ± 0.31	470.35 ± 23.87**
800 ng/mL	9	1.09 ± 0.18	2.30 ± 0.41	483.22 ± 20.20**
1,000 ng/mL	9	1.20 ± 0.11	2.41 ± 0.20	502.88 ± 30.99**
21 days;				
Control	9	1.00 ± 0.15	3.18 ± 0.47	314.05 ± 4.64
Omeprazole treated				
200 ng/mL	9	1.26 ± 0.20	2.48 ± 0.32	485.09 ± 24.36*
400 ng/mL	9	1.13 ± 0.19	2.20 ± 0.32	502.19 ± 27.47**
600 ng/mL	9	1.06 ± 0.13	2.21 ± 0.34	500.33 ± 32.97**
800 ng/mL	9	0.99 ± 0.19	1.97 ± 0.31	481.64 ± 25.48**
1,000 ng/mL	9	1.07 ± 0.18	2.06 ± 0.30	500.84 ± 26.61**

*P < 0.01, **P < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole ในระยะวันเลี้ยงเซลล์เท่ากัน

7. omeprazole เปลี่ยน selective permeability profile ของอิออนปรจุบวก

รูปที่ 5 แสดงค่า absolute paracellular permeability ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงต่ออิออนประจุบวก ได้แก่ Li^+, Na^+, K^+, Rb^+, และ Cs^+ พบว่าในภาวะควบคุมแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Cacao-2 มีลำดับการยอมให้อิออนประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ดังนี้ P_{Na} (8.62±0.18) > P_K (7.99±0.19) > P_{Rb} (5.84±0.08) > P_{Cs} (4.82±0.07) > P_{Li} (3.98±0.12) ซึ่งจัดอยู่ใน Eisenman sequence VII แสดงว่าภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ใน tight junction ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 มีสนามไฟฟ้าประจุลบความเข้มปานกลาง ซึ่งเป็นลักษณะของ ion channel ที่ขนส่งอิออนประ

จุบวก omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, และ 1,000 ng/ml ลดค่า absolute paracellular permeability ของอิออนทุกชนิด และยังมีฤทธิ์เปลี่ยนลำดับการยอมให้อิออนประจุบวกผ่านดังนี้ $P_K > P_{Na} > P_{Rb} > P_{Cs} > P_{Li}$ ซึ่งจัดอยู่ใน Eisenman sequence VI แสดงว่าสนามไฟฟ้าประจุลบภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ใน tight junction มีความเข้มน้อยลง บ่งชี้ว่าช่องว่างระหว่างเซลล์ลดความสามารถในการขนส่งอิออนประจุบวกลดลง



รูปที่ 5 แสดงค่า P_{Li}, P_{Na}, P_K, P_{Rb}, และค่า P_{Cs} ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 ใน DMEM ปกติ หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800,หรือ 1,000 ng/ml, $*P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole ในระยะวันเลี้ยงเซลล์เท่ากัน, $n = 6$

8. omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่ง $Mg_{A \rightarrow B}$ แบบ paracellular passive transport

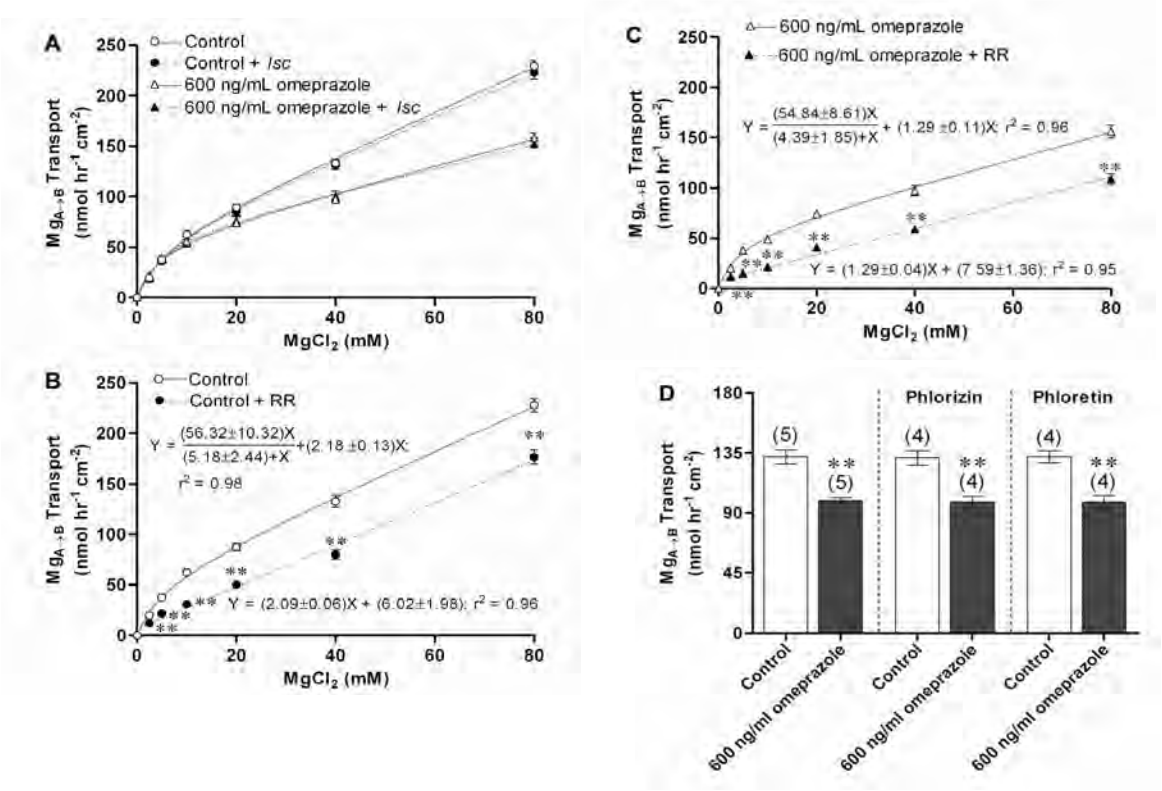
ในทางทฤษฎีการขนส่ง $Mg_{A \rightarrow B}$ ประกอบด้วยการขนส่งแบบใช้พลังงาน (active transport) ซึ่งแบ่งย่อยได้เป็น 3 กลไกคือ voltage-dependent $Mg_{A \rightarrow B}$ active transport, solvent drag induced $Mg_{A \rightarrow B}$ active transport, และ transcelluar $Mg_{A \rightarrow B}$ active transport และการขนส่งแบบไม่ใช้พลังงาน หรือ passive $Mg_{A \rightarrow B}$ active transport เพื่อศึกษาว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด $Mg_{A \rightarrow B}$ กลไกใด แผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จึงได้รับกระแส *Isc* เพื่อยับยั้งการขนส่งแบบ voltage-dependent active Mg^{2+} transport (รูปที่ 6A) พบว่ากระแส *Isc* ไมมีผลต่อ $Mg_{A \rightarrow B}$ transport ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ omeprazole บ่งชี้ว่าไม่มีการขนส่งกลไกนี้ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

เมื่อบ่มแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย 2 μmol/l ruthenium red (RR) ซึ่งยับยั้ง transcelluar $Mg_{A \rightarrow B}$ active transport (รูปที่ 6B, 6C) พบว่า RR มีฤทธิ์ยับยั้ง transcelluar $Mg_{A \rightarrow B}$ active transport และทำให้ความสัมพันธ์ระหว่าง $Mg_{A \rightarrow B}$ transport – [$MgCl_2$] เป็นแบบเส้นตรง เมื่อศึกษาสมการเส้นตรงดังกล่าวทั้งของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6B) และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole (รูปที่ 6C) พบว่าความชันของสมการเส้นตรงนั้นมีค่าเทียบเคียงได้กับค่า *m* ในกลุ่มที่ไม่ได้รับ RR และเมื่อนำผลการทดลองในกลุ่มที่ได้รับ RR ของแผ่นเซลล์ควบคุม และแผ่นเซลล์ที่ได้รับ omeprazole

พบว่า omeprazole ลดการขนส่ง $Mg_{A\rightarrow B}$ และลดความชันของสมการเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลด passive $Mg_{A\rightarrow B}$ active transport

เมื่อบ่มแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย 100 µmol/l phlorizin หรือ 100 µmol/l phloretin ซึ่งยับยั้ง solvent drag induced $Mg_{A\rightarrow B}$ active transport (รูปที่ 6D) พบว่า phlorizin หรือ phloretin ไม่มีผลต่อ $Mg_{A\rightarrow B}$ transport ทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole บ่ชี้ว่าไม่มีการขนส่งกลไกนี้ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 มีการขนส่งแมกนีเซียม 2 กลไก คือ paracellular passive $Mg_{A\rightarrow B}$ transport และ transcellular passive $Mg_{A\rightarrow B}$ transport นอกจากนั้น omeprazole มีฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งแมกนีเซียมแบบ paracellular passive transport ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้

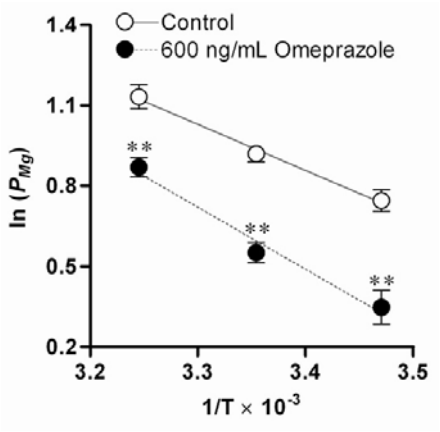


รูปที่ 6 แสดงค่า $Mg_{A\rightarrow B}$ transport ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ใน DMEM ปกติ หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole ความเข้มข้น 600 ng/ml ทำการทดลองโดยให้กระแส *Isc* (A) หรือบ่มแผ่นเซลล์พาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย ruthenium red (RR) (B, C) หรือ phlorizin หรือ Phoretin (D). $^{**}P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole, $n = 6$

9. omeprazole เพิ่ม activation energy ของการขนส่ง Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

ในทางทฤษฎี การขนส่งอิออนผ่าน ion channel ถือเป็นปฏิกิริยาทางกายภาพที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นกับอุณหภูมิ หากเพิ่มอุณหภูมิจะเร่งปฏิกิริยาการขนส่งอิออนได้ รูปที่ 8 แสดง Arrhenius plot แสดงความสัมพันธ์

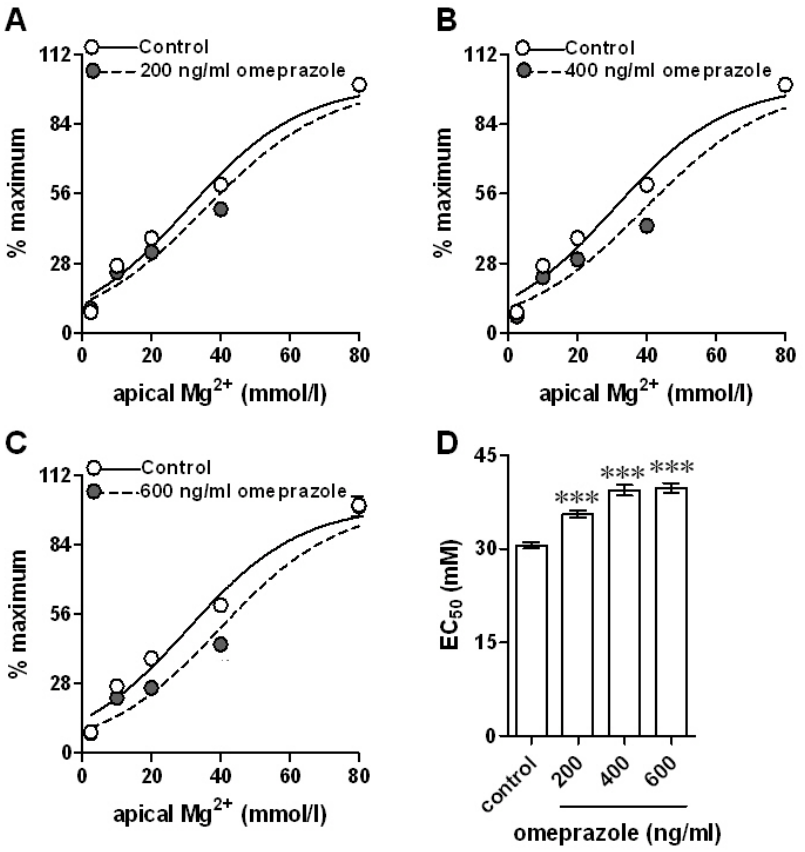
ระหว่าง ln(P_{Mg}) กับอุณหภูมิ เพื่อศึกษา activation energy (E_a) (จากความชันของเส้นตรง) และสัมประสิทธิ์อุณหภูมิ Q_{10} (สัดส่วนอัตราการขนส่งที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 10 °C) ของการขนส่งแมกนีเซียมแบบ passive transport ผ่านแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ พบว่าในกลุ่มควบคุมมีค่า E_a เท่ากับ 14.28±1.19 kJ/mol และสัมประสิทธิ์อุณหภูมิ Q_{10} เท่ากับ 1.22±0.04 omeprazole มีฤทธิ์เพิ่ม E_a (19.24±1.98 kj/mol) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่เปลี่ยนค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิ Q_{10} (1.31±0.05) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิ Q_{10} มีค่าระหว่าง 1.2 – 1.4 เทียบเคียงได้กับค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิ Q_{10} ของการแพร่ของอิออนผ่าน ion channel นอกจากนั้น omeprazole เพิ่มค่า E_a บ่งชี้ได้ว่า omeprazole ขัดขวางการขนส่งแมกนีเซียมผ่าน paracellular channel ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2



รูปที่ 7 แสดง Arrhenius plot ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ใน DMEM ปกติ หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole ความเข้มข้น 600 ng/ml, $^{**}P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole, $n = 6$

10. omeprazole ลด Mg^{2+} affinity ของ paracellular channel

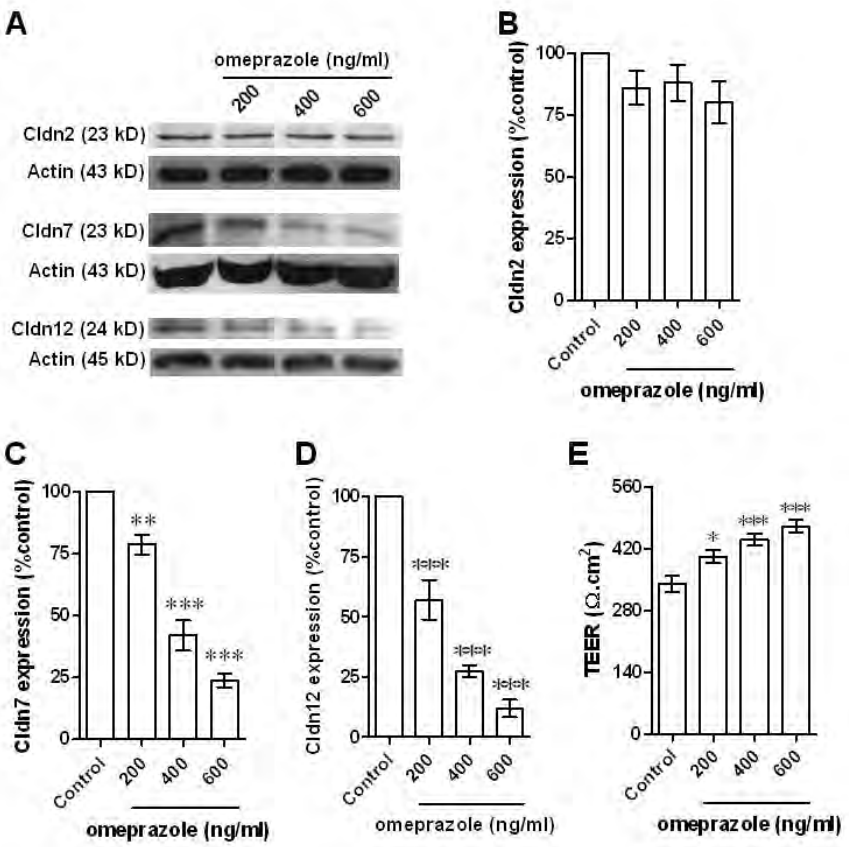
รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % maximum passive $Mg_{A \rightarrow B}$ transport กับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในด้าน apical เทียบเคียงได้กับด้านโพรงลำไส้ ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ และที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200 (รูปที่ 8A), 400 (รูปที่ 8B), และ 600 ng/ml (รูปที่ 8C) พบว่า omeprazole ทุกความเข้มข้นมีผลเลื่อนเส้นความสัมพันธ์ไปด้านขวาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อพิจารณาค่า half maximum effective concentration (EC_{50}) พบว่า omeprazole ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์เพิ่มค่า EC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่าเมื่อได้รับ omeprazole ประสิทธิภาพของ paracellular channel ในการจับกับ Mg^{2+} (Mg^{2+} affinity) ลดลง จึงส่งผลให้การขนส่งแมกนีเซียมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลดลง



รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % maximum passive $Mg_{A \rightarrow B}$ transport กับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ในด้าน apical (8A - 8C) และ ค่า EC_{50} (8D) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ใน DMEM ปกติ หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole, ***$P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole, $n = 6$

11. omeprazole ลดปริมาณการแสดงออกของ claudin-7 และ -12

การขนส่งอิออนผ่านช่องว่างเซลล์นั้นจะถูกควบคุมด้วยโปรตีนใน tight junction ที่เรียกว่า claudin ซึ่งพบประมาณ 23 ชนิดในแผ่นเซลล์เยื่อบุ (epithelium) ทั่วร่างกายมนุษย์ การศึกษาก่อนหน้านี้บ่งชี้ว่า claudin-16 และ -19 ควบคุมการขนส่งแมกนีเซียมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เยื่อบุท่อไต อย่างไรก็ดี claudin-16 และ -19 ไม่พบในลำไส้ ผู้วิจัยจึงศึกษา claudin-2, -7, และ -12 ซึ่งเป็น claudin ที่ควบคุมการขนส่งอิออนประจุบวก และมีการแสดงออกตลอดความยาวลำไส้เล็ก รูปที่ 9A แสดงการแสดงออกของ claudin-2, -7, และ -12 ด้วยวิธี western blot analysis และ relative expression ของ claudin-2 (รูปที่ 9B), -7 (รูปที่ 9C), และ -12 (รูปที่ 9D) ด้วยวิธี densitometric analysis พบว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการแสดงออกของ claudin-7, และ -12 แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ claudin-2 บ่งชี้ว่า claudin-7 และ -12 ควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้



รูปที่ 8 แสดงการแสดงออกของ claudin-2, -7, และ -12 ด้วยวิธี western blot analysis (A) และ แสดงการแสดงออกของ claudin-2 (8B), -7 (8C), และ -12 (8D) ด้วยวิธี densitometric analysis ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ใน DMEM ปกติ หรือ DMEM ที่ผสม omeprazole, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole, $n = 6$

สรุปผลการทดลอง

Claudin-7 และ -12 เป็นโปรตีนควบคุมการดูดซึมแมกนีเซียมผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในลำไส้ ซึ่งถือเป็นกลไกหลักที่ร่างกายมนุษย์ใช้ดูดซึมแมกนีเซียมคิดเป็น 90% ของการดูดซึมแมกนีเซียมทั้งหมดในลำไส้ การที่ omeprazole มีฤทธิ์กดการแสดงออกของ Claudin-7 และ -12 จึงส่งผลลดการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ การที่คนไข้รับประทาน omeprazole รวมถึงยาในกลุ่ม proton pump inhibitor ตัวอื่น ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะส่งผลลดการดูดซึมแมกนีเซียมอย่างต่อเนื่อง ทำให้แมกนีเซียมที่สะสมในกระดูกและเซลล์ทั่วร่างกายมนุษย์ค่อยๆ ถูกนำออกมาใช้จนเหลือน้อยลง ดังรายงานทางการแพทย์ที่พบอัตราการเกิดกระดูกหักง่ายในคนไข้กลุ่มนี้ และสุดท้ายจึงส่งผลให้เกิดภาวะปริมาณแมกนีเซียมในกระแสเลือดลดต่ำลง

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาต่อเนื่องถึงกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของ claudin-7 และ -12 รวมถึงกลไกที่ omeprazole ควบคุมการแสดงออกของ claudin-7 และ -12 เพื่อพัฒนาเป็นวิธีการป้องกันหรือรักษา ภาวะแมกนีเซียมในเลือดต่ำจากการได้รับ omeprazole เป็นเวลานาน รวมถึงโรคชนิดอื่นที่เกิดจากความผิดปกติจากการดูดซึมแมกนีเซียมในลำไส้ อาทิเช่น hypomagnesemia and secondary hypocalcemia ซึ่งเกิดจากการกลายพันธ์ของ TRPM6 ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่านเซลล์

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 **Thongon N***, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. World J Gastroenterol 2011; 17(12):1574–1583. (Impact factor 2009 = 2.092)

*First and Corresponding author, contribute for 90%

1.2 Manuscript: **Thongon N***, Krishnamra N. Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers.

*First and Corresponding author

2. อื่น ๆ

ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น. ภาวะปริมาณแมกนีเซียมในเลือดต่ำจากการได้รับโอมิพราโซลเป็นเวลานาน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 2553. 15(2): 116–121.

ภาคผนวก

1. Thongon N, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. World J Gastroenterol 2011; 17(12):1574–1583.

2. ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น. ภาวะปริมาณแมกนีเซียมในเลือดต่ำจากการได้รับโอมิพราโซลเป็นเวลานาน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 2553. 15(2): 116–121

3. Manuscript: **Thongon N**, Krishnamra N. Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers.

แบบแสดงหลักฐานการมีส่วนร่วมในผลงานวิชาการ

Confirmation for participation in academic work

☐ ตำราหรือหนังสือ Textbook/book ☑ งานวิจัย Research ☐ ผลงานทางวิชาการในลักษณะอื่น Other academic work

ชื่อเรื่อง (Title) Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. World Journal of Gastroenterology 2011; 17(12): 1574–1583.

จำนวนผู้ร่วมงาน 2 ท่าน แต่ละท่านมีส่วนร่วมในงานดังนี้

ชื่อผู้ร่วมงาน (Names of all members)	ปริมาณงานร้อยละ (%) และหน้าที่ความรับผิดชอบ
1. Narongrit Thongon	90 (A, B, C, D, E)
2. Nateetip Krishnamra	10 (D, F)

(A) Performed research, (B) Designed research, (C) Analyzed data, (D) Wrote the paper, (E) Corresponding author, (F) provided experimental tools

ลงชื่อ ..... (Narongrit Thongon, Ph.D.)

ลงชื่อ ..... (Prof. Nateetip Krishnamra, Ph.D.)

Signed on: April 28, 2011

World Journal of Gastroenterology

Online Submissions: http://www.wjgnet.com/1007-9327office
wjg@wjgnet.com
doi:10.3748/wjg.v17.i12.1574

World J Gastroenterol 2011 March 28; 17(12): 1574-1583
ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)
© 2011 Baishideng. All rights reserved.

ORIGINAL ARTICLE

Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers

Narongrit Thongon, Nateetip Krishnamra

Narongrit Thongon, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand
Nateetip Krishnamra, Consortium for Calcium and Bone Research (COCAB) and Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
Author contributions: Thongon N designed and performed the experiment, analyzed and interpreted the results, wrote and edited the manuscript; Krishmanra N provided the critical experimental tools and edited the manuscript.
Supported by The Thailand Research Fund (to Thongon N), No. MRG5380003
Correspondence to: Narongrit Thongon, PhD, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Rd., Saensook, Muang, Chonburi 20131, Thailand. narongritt@buu.ac.th
Telephone: +66-38-393497 Fax: +66-38-393497
Received: June 3, 2010 Revised: July 12, 2010
Accepted: July 19, 2010
Published online: March 28, 2011

Abstract

AIM: To elucidate the effect and underlying mechanisms of omeprazole action on Mg^{2+} transport across the intestinal epithelium.

METHODS: Caco-2 monolayers were cultured in various dose omeprazole-containing media for 14 or 21 d before being inserted into a modified Ussing chamber apparatus to investigate the bi-directional Mg^{2+} transport and electrical parameters. Paracellular permeability of the monolayer was also observed by the dilution potential technique and a cation permeability study. An Arrhenius plot was performed to elucidate the activation energy of passive Mg^{2+} transport across the Caco-2 monolayers.

RESULTS: Both apical to basolateral and basolateral to apical passive Mg^{2+} fluxes of omeprazole-treated epithelium were decreased in a dose- and time-dependent manner. Omeprazole also decreased the paracellular cation selectivity and changed the paracellular selective permeability profile of Caco-2 epithelium to Li^+, Na^+, K^+, Rb^+, and Cs^+ from series Ⅶ to series Ⅵ of the Eisenman sequence. The Arrhenius plot revealed the higher activation energy for passive Mg^{2+} transport in omeprazole-treated epithelium than that of control epithelium, indicating that omeprazole affected the paracellular channel of Caco-2 epithelium in such a way that Mg^{2+} movement was impeded.

CONCLUSION: Omeprazole decreased paracellular cation permeability and increased the activation energy for passive Mg^{2+} transport of Caco-2 monolayers that led to the suppression of passive Mg^{2+} absorption.

© 2011 Baishideng. All rights reserved.

Key words: Magnesium; Paracellular; Proton pump inhibitor; Transepithelial; Tight junction

Peer reviewer: Vittorio Ricci, MD, PhD, Department of Physiology, Human Physiology Section, University of Pavia Medical School, Via Forlanini 6, Pavia, 27100, Italy

Thongon N, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol* 2011; 17(12): 1574-1583 Available from: URL: http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v17/i12/1574.htm DOI: http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1574

INTRODUCTION

Magnesium plays an important role in numerous biological functions. Mg^{2+} deficiency is associated with several diseases, e.g. Alzheimer's disease[1], osteoporosis[2], and hypertension[3]. Therefore, its plasma level is tightly regulated within a narrow range (0.7-1.1 mmol/L) by intestinal absorption and renal excretion[4]. In human intestine, fractional Mg^{2+} absorption varies from 11% to 65% depending on the amount of Mg^{2+} intake[5]. Intestinal epithelium absorbs Mg^{2+} *via* both saturable transcellular and non-saturable paracellular pathways. Transcellular Mg^{2+} transport is an

active process that requires the activity of transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) and the basolateral Na^+/Mg^{2+} exchanger[6,7]. On the other hand, paracellular Mg^{2+} transport is a passive mechanism and is implicated in about 90% of intestinal Mg^{2+} absorption[7]. The paracellular Mg^{2+} transport process is modulated by the tight junction proteins, i.e. Claudin-16 and Claudin-19[8].

Omeprazole is a common therapeutic tool for acid-peptic disorders. Its active sulphenamide form selectively and covalently interacts with the H^+/K^+-ATPase, particularly the extracellular cysteine 813, leading to potent inhibition of H^+/K^+-ATPase activity[9]. Previous reports demonstrated that prolonged omeprazole administration led to hypomagnesemia and hypomagnesuria in humans[10,11]. Withdrawal of omeprazole and intravenous Mg^{2+} replacement, but not high dose oral Mg^{2+} supplement, could normalize the plasma and urinary Mg^{2+} levels[10,12]. Renal Mg^{2+} handling was normal in patients with severe hypomagnesemia associated with long-term use of omeprazole[12-14]. This body of evidence suggested an inhibitory effect of omeprazole on intestinal Mg^{2+} absorption. However, the direct action of omeprazole on intestinal Mg^{2+} transport is still elusive. The present study, therefore, aimed to elucidate the effect of omeprazole as well as obtain information regarding possible mechanisms of omeprazole action on Mg^{2+} transport across the intestinal epithelium. This study employed a monolayer of Caco-2 cells which is a suitable *in vitro* model for studying intestinal transport of divalent cations, e.g. Ca^{2+}[15] and Mg^{2+}[16].

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Caco-2 cells (ATCC No. HTB-37) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS-Gold) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 1% L-glutamine (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% non-essential amino acid (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco, Grand Island, NY, USA) and maintained at a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37℃. The Caco-2 monolayers were developed by seeding cells (5.0×10^5 cells/cm^2) onto permeable Snapwell™ inserts (12-mm diameter and 0.4-μm pore size polyester filter) (Corning, Corning, NY, USA). In the omeprazole-treated group, Caco-2 monolayers were grown in 200, 400, 600, 800, or 1000 ng/mL omeprazole (Calbiochem, San Diego, CA, USA) containing culture media. The culture medium was changed three times a week. On day 14 or 21 after seeding, the Snapwell was inserted into a modified Ussing chamber (1.13 cm^2 exposed area).

Measurement of Mg^{2+} flux

In the Ussing chamber, the monolayer was equilibrated for 20 min in bathing solution at 37℃, pH 7.4, and osmolarity of 290-293 mmol/kg H_2O[17]. To avoid the unstirred water layer and to maintain pH at 7.4, the bathing solution in each hemi-chamber was continuously gassed with humidified 5% CO_2 in 95% O_2. After equilibration, the apical or basolateral bathing solution was replaced with 2.5, 5, 10, 20, 40, or 80 mmol/L $MgCl_2$-containing bathing solution, while the contralateral side was replaced with $MgCl_2$-free bathing solution. At 1 and 2 h, 500 μL solution was collected from the side that contained $MgCl_2$-free bathing solution and Mg^{2+} concentration was measured. Mg^{2+} flux (nmol/h per cm^2) was calculated using Equation (Eq. 1):

$$Mg^{2+} \text{ flux} = C_{Mg}/(t \times S) \quad (1)$$

Where C_{Mg} is Mg^{2+} concentration (nmol/L); t is time (h); and S is transport surface area (cm^2).

To elucidate the involvement of solvent drag-induced mechanism on Mg^{2+} transport, 100 μmol/L phlorizin (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) and 100 μmol/L phloretin (Calbiochem, San Diego, CA, USA) were added to the apical and basolateral solution, respectively. Mg^{2+} transport was also observed at different temperatures (15, 25, or 35℃) and the results were presented as an Arrhernius plot[18] (Eq. 2):

$$\ln(P_{Mg}) = (-E_a)/(RT) + \ln(E) \quad (2)$$

Where $\ln(P_{Mg})$ is the natural logarithm of Mg^{2+} permeability (cm/s); E_a is activation energy (kJ/mol); R is gas constant; T is absolute temperature (273+°C), E is pre-exponential factor. The temperature coefficient Q_{10} was determined as previously described[19].

Measurement of Mg^{2+} concentration

The concentration of Mg^{2+} was determined by Xylidyl Blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) colorimetric assay, modified from the method of Tang and Goodenough[20]. In brief, the sample solutions were spun at 1000 × *g* for 10 min and a 200 μL sample of the upper solution was collected. An aliquot was added to 100 μL water, gently mixed, and then 200 μL of 1.25 mmol/L EGTA was added to the assay tube. After mixing well, 500 μL of Xylidyl Blue solution (pH 10.5) was added to the assay tube. After 5 min of incubation at room temperature, the assay solution was subjected to colorimetric analysis using a spectrophotometer at 520 nm (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan).

Measurement of epithelial electrical parameters

Trans-epithelium resistance (TER), potential difference (PD), and short-circuit current (I_{SC}) were determined as previously described[21]. These electrical parameters were recorded after 20 min equilibration at 30 min intervals throughout the 2 h of Mg^{2+} flux study.

Ion permeability measurement

Absolute permeabilities of Na^+ (P_{Na}) and Cl^- (P_{Cl}), as well as the relative permeability of Na^+ to Cl^- (P_{Na}/P_{Cl}), of Caco-2 monolayers were obtained by the dilution potential technique as previously described[21]. The absolute permeability of group I alkaline metals (Li^+, K^+, Rb^+, and Cs^+), i.e. P_{Li}, P_K, P_{Rb}, and P_{Cs} was determined as previously described[21] using the same calculation as that used to obtain P_{Na}.

The Mg^{2+} permeability (P_{Mg}) of Caco-2 monolayers was calculated using Eq. 3:

$$P_{Mg} = Mg^{2+} \text{ flux}/\Delta C_{Mg} \quad (3)$$

Table 1 Kinetic data of $Mg_{B\to A}$ transport

	V_m (nmol/h per cm^2)	K_m (mmol/L)	m ($\times 10^{-3}$ cm/h)
14 d			
Control	57.22 ± 8.41	5.62 ± 1.83	2.18 ± 0.11
Omeprazole treated (ng/mL)			
200	58.12 ± 6.19	4.55 ± 1.23	1.80 ± 0.08[b]
400	62.82 ± 9.64	5.83 ± 2.22	1.54 ± 0.12[b]
600	57.01 ± 7.49	4.48 ± 1.44	1.28 ± 0.09[b]
800	59.35 ± 7.40	4.71 ± 1.40	0.83 ± 0.09[b]
1000	58.84 ± 7.52	5.84 ± 1.59	0.52 ± 0.10[b]
21 d			
Control	55.82 ± 8.02	5.09 ± 1.89	2.17 ± 0.10
Omeprazole treated (ng/mL)			
200	57.81 ± 10.41	7.48 ± 2.24	1.26 ± 0.12[b,d]
400	53.47 ± 7.59	5.10 ± 1.87	1.18 ± 0.10[b,d]
600	53.12 ± 7.53	4.42 ± 1.68	0.96 ± 0.09[b,d]
800	57.65 ± 6.76	5.97 ± 1.51	0.53 ± 0.08[b,d]
1000	57.99 ± 7.72	6.09 ± 1.48	0.49 ± 0.07[b]

[b]$P < 0.001$ *vs* the age-matched control group, [d]$P < 0.001$ *vs* the concentration-matched 14 d-omeprazole-treated groups.

Table 2 Electrical parameters of Caco-2 monolayers

	n	PD (mV)	I_{SC} (mA/cm^2)	TER ($\Omega.cm^2$)
14 d				
Control	9	0.99 ± 0.12	3.09 ± 0.36	322.19 ± 6.37
Omeprazole treated (ng/mL)				
200	9	1.03 ± 0.54	2.52 ± 0.39	413.64 ± 12.95
400	9	0.98 ± 0.14	2.24 ± 0.29	433.23 ± 17.66
600	9	1.08 ± 0.15	2.29 ± 0.31	470.35 ± 23.87[d]
800	9	1.09 ± 0.18	2.30 ± 0.41	483.22 ± 20.20[d]
1000	9	1.20 ± 0.11	2.41 ± 0.20	502.88 ± 30.99[d]
21 d				
Control	9	1.00 ± 0.15	3.18 ± 0.47	314.05 ± 4.64
Omeprazole treated (ng/mL)				
200	9	1.26 ± 0.20	2.48 ± 0.32	485.09 ± 24.36[b]
400	9	1.13 ± 0.19	2.20 ± 0.32	502.19 ± 27.47[d]
600	9	1.06 ± 0.13	2.21 ± 0.34	500.33 ± 32.97[d]
800	9	0.99 ± 0.19	1.97 ± 0.31	481.64 ± 25.48[d]
1000	9	1.07 ± 0.18	2.06 ± 0.30	500.84 ± 26.61[d]

[b]$P < 0.01$, [d]$P < 0.001$ *vs* the age-matched control group.

Where ΔC_{Mg} is the concentration difference of Mg^{2+} between the apical and basolateral solutions.

Mg^{2+} transport kinetic analysis

To estimate the kinetic values of the saturable active and non-saturable passive Mg^{2+} transport, the rate of apical to basolateral Mg^{2+} transport ($Mg_{A\to B}$ transport) was fitted to a modified Michaelis-Menten kinetic plus linear component as shown in Eq. 4:

$$Mg_{A\to B}\ \text{transport} = (V_m \times C_{mg})/(K_m + C_{mg}) + mC_{mg} \quad (4)$$

Where V_m is the maximal rate of saturable $Mg_{A\to B}$ transport; K_m is the rate constant of saturable $Mg_{A\to B}$ transport; m is the rate constant for non-saturable $Mg_{A\to B}$ transport; and C_{Mg} as mentioned above. This study was performed using a nonlinear regression program of GraphPad Prism version 5.0 for Window (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Statistical analysis

Results were expressed as means ± SE. Two sets of data were compared using the unpaired Student's *t*-test. One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's posttest was employed for multiple sets of data. The level of significance was $P < 0.05$. Linear regression and slope analysis were performed to obtain the basolateral to apical Mg^{2+} transport ($Mg_{B\to A}$ transport)-Mg concentration relationship. The curve of P_{Mg}-Δmagnesium relationship was obtained using one phase exponential decay equation. All data were analyzed by GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.).

RESULTS

Omeprazole decreased $Mg_{A\to B}$ transport and P_{Mg} in both a dose- and time-dependent manner

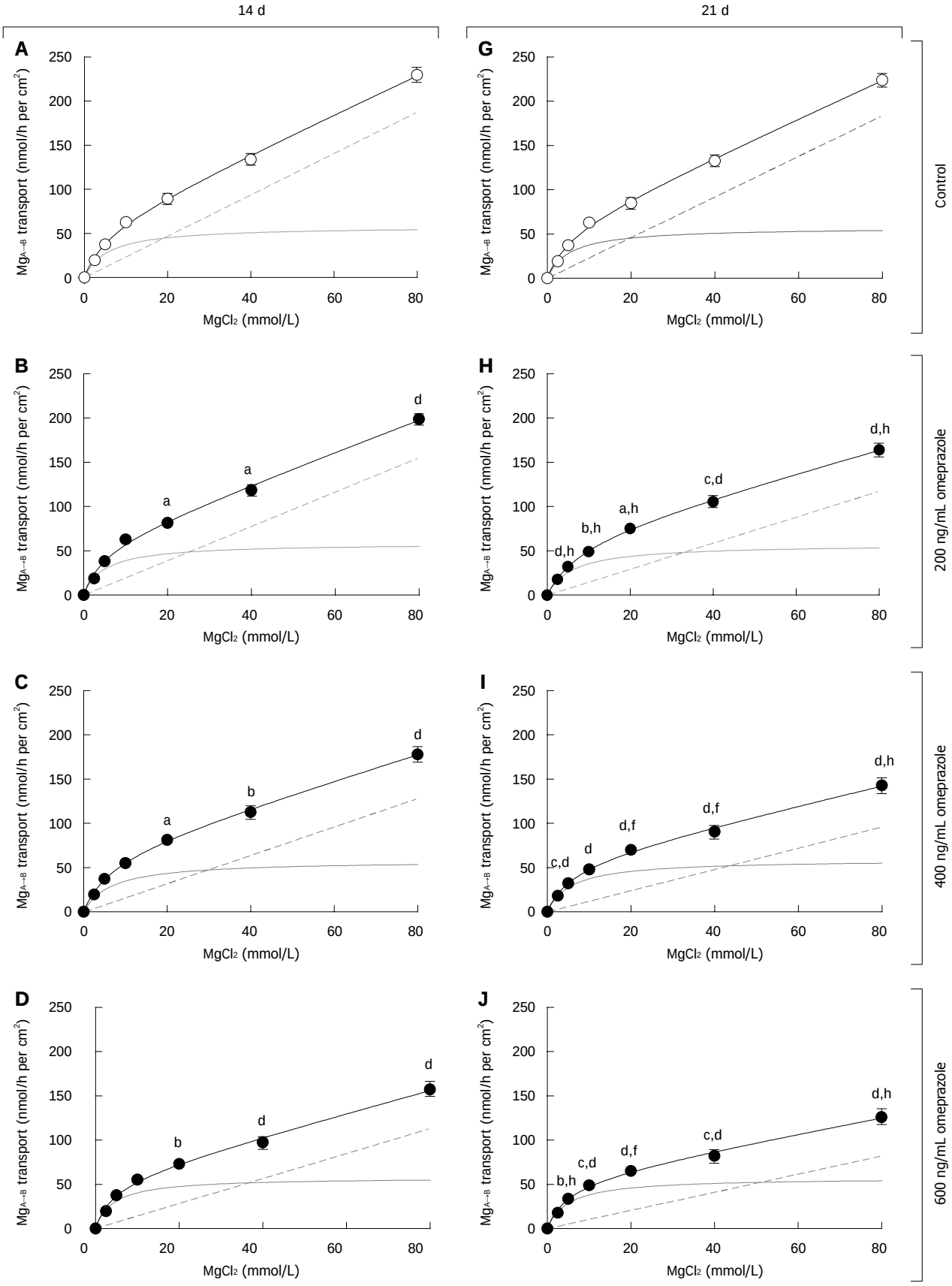
As demonstrated in Figure 1, the $Mg_{A\to B}$ transport *vs* Mg^{2+} concentration plots of Caco-2 monolayers were curvilinear similar to that reported in humans[5]. After 14 d in the omeprazole-treated groups, $Mg_{A\to B}$ transport was inhibited when compared with its corresponding untreated group (Figures 1A-F). The level of inhibition progressively increased with higher concentrations of omeprazole. Omeprazole selectively decreased non-saturable $Mg_{A\to B}$ transport, but not the saturated component, as clearly demonstrated by the lower rate constant for non-saturable $Mg_{A\to B}$ transport (Table 1). For 21 d omeprazole-treated groups, the results were similar to those of the 14 d omeprazole-treatment (Figure 1G-L, Table 1). When the same omeprazole concentration was considered, 21 d-treated groups showed a significantly lower $Mg_{A\to B}$ transport than the 14 d-treated groups (Figure 1, Table 1). Therefore, omeprazole decreased $Mg_{A\to B}$ transport in a dose- and time-dependent manner. According to the $Mg_{A\to B}$ transport, omeprazole also decreased the apical to basolateral P_{Mg} in a dose- and time-dependent mechanism (Figure 2). Moreover, omeprazole significantly increased TER, but not PD or I_{SC}, of Caco-2 monolayers (Table 2), indicating the lower paracellular permeability to ion transport.

Omeprazole decreased $Mg_{B\to A}$ transport

Since the $Mg_{B\to A}$ transport occurred solely through the paracellular pathway, the $Mg_{B\to A}$ transport *vs* Mg^{2+} concentration plot was linear (Figure 3A). Omeprazole significantly decreased the slope of the $Mg_{B\to A}$ transport-Mg^{2+} concentration plot. The slope progressively decreased with increased concentration of omeprazole (Figure 3A). In addition, omeprazole significantly suppressed the basolateral to apical P_{Mg} in a dose-dependent manner (Figure 3B). The collective results clearly showed that omeprazole suppressed paracellular passive Mg^{2+} transport across Caco-2 monolayers.

Omeprazole decreased paracellular cation selectivity

Similar to previous reports[21,22], Caco-2 monolayers


14 d
21 d
A
B
C
D
G
H
I
J
Control
200 ng/mL omeprazole
400 ng/mL omeprazole
600 ng/mL omeprazole
MgA→B transport (nmol/h per cm2)
MgCl2 (mmol/L)
0
20
40
60
80
50
100
150
200
250
a
b
d
a,h
b,h
c,d
d,f
d,h

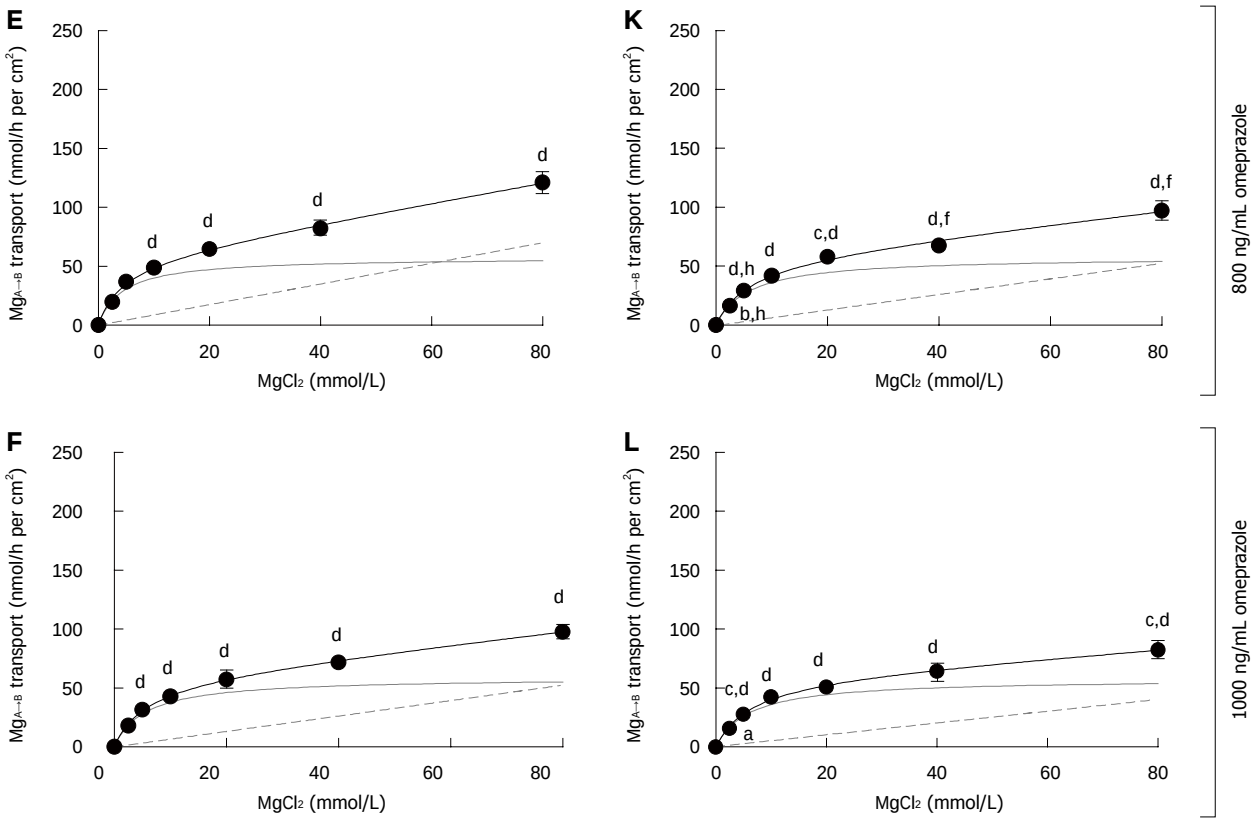


Figure 1 $Mg_{A\rightarrow B}$ transport across Caco-2 monolayers. For $Mg_{A\rightarrow B}$ transport of 14 d monolayers, A: Control; B: 200 ng/mL omeprazole-treated; C: 400 ng/mL omeprazole-treated; D: 600 ng/mL omeprazole-treated; E: 800 ng/mL omeprazole-treated; and F: 1000 ng/mL omeprazole-treated monolayers. For $Mg_{A\rightarrow B}$ transport of 21 d monolayers, G: control; H: 200 ng/mL omeprazole-treated; I: 400 ng/mL omeprazole-treated; J: 600 ng/mL omeprazole-treated; K: 800 ng/mL omeprazole-treated and L: 1000 ng/mL omeprazole-treated monolayers. Light solid lines represent the saturable component. Dashed lines represent the non-saturable component. $^{a}P < 0.05$, $^{b}P < 0.01$, $^{d}P < 0.001$ *vs* the age-matched control group, $^{c}P < 0.05$, $^{f}P < 0.01$, $^{h}P < 0.001$ *vs* the concentration-matched 14 d omeprazole-treated groups. For each data point, $n = 9$.

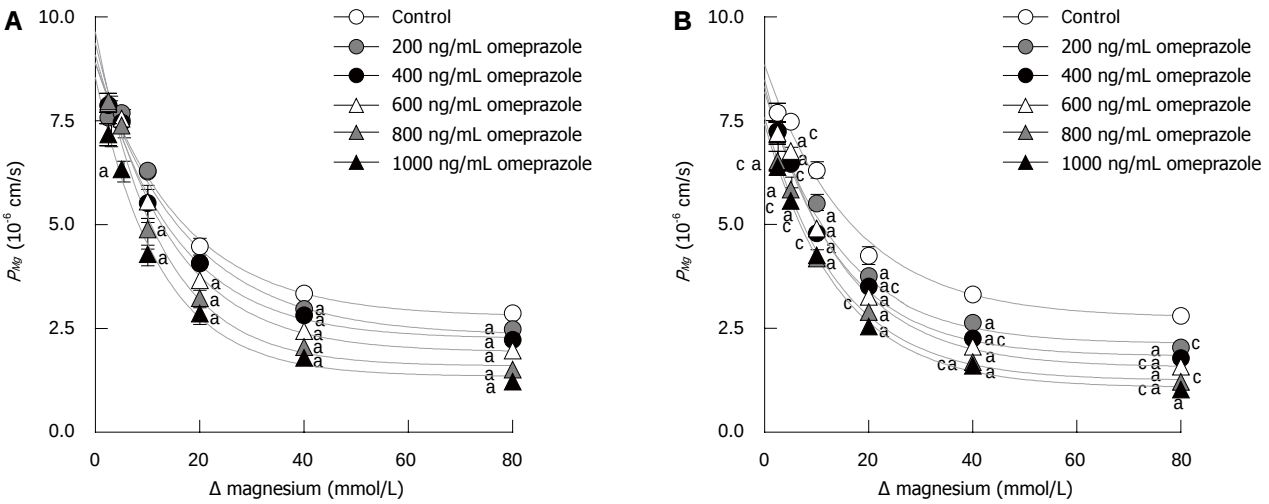


Figure 2 Apical to basolateral P_{Mg}. A: P_{Mg} of 14 d control and various dose omeprazole-treated monolayers; B: 21 d control and various dose omeprazole-treated monolayers. $^{a}P < 0.05$ *vs* the age-matched control group, $^{c}P < 0.05$ *vs* the concentration-matched 14 d omeprazole-treated group. For each data point, $n = 9$.

showed high P_{Na}/P_{Cl} (3.79 ± 0.15 in 14 d monolayers; 3.96 ± 0.22 in 21 d monolayers) from the higher P_{Na} (8.28 ± 0.20 in 14 d monolayers; 8.11 ± 0.25 in 21 d monolayers) than P_{Cl} (2.08 ± 0.09 in 14 d monolayers; 2.07 ± 0.11 in 21 d monolayers) (Figure 4A-C). Therefore, the Caco-2 monolayer was a cation selective epithelium. In 14 d- as well as 21 d-omeprazole-treated groups, omeprazole significantly suppressed P_{Na}/P_{Cl} and P_{Na} but enhanced P_{Cl} in a dose-dependent manner (Figure 4A-C), indicating that omeprazole decreased cation selectivity of Caco-2 monolayers.

Moreover, the present study also examined the paracellular permeability to monovalent cations, i.e. Li^+, Na^+,

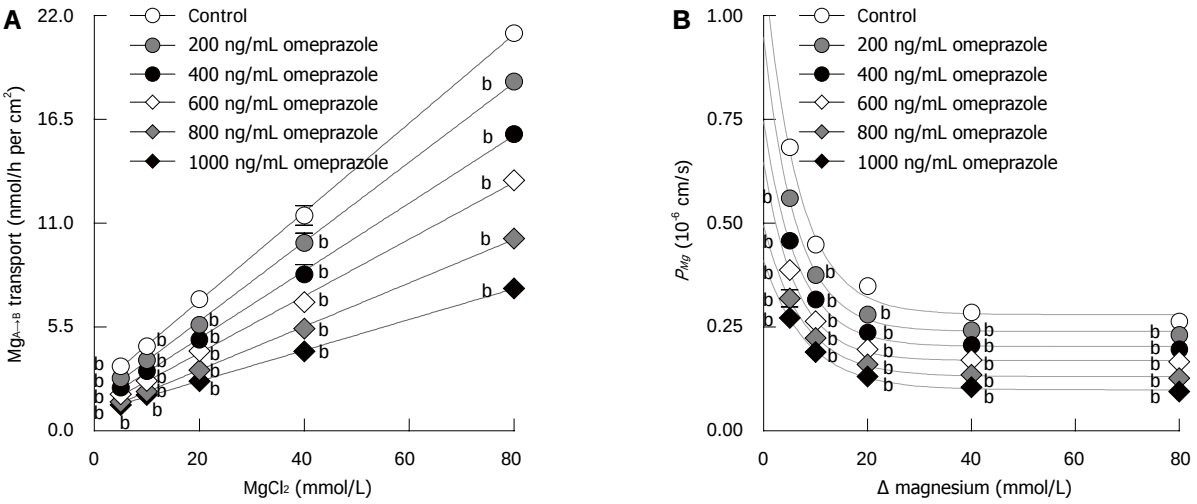


Figure 3 $Mg_{B\rightarrow A}$ transport and basolateral to apical P_{Mg}. A: $Mg_{B\rightarrow A}$ transport; B: Basolateral to apical P_{Mg} of 14 d control and various dose omeprazole-treated monolayers. $^bP < 0.01$ *vs* the control group. For each data point, $n = 6$.

K^+, Rb^+, and Cs^+. In control conditions, Caco-2 monolayers showed the following selective sequence: P_{Na} (8.62 ± 0.18) > P_K (7.99 ± 0.19) > P_{Rb} (5.84 ± 0.08) > P_{Cs} (4.82 ± 0.07) > P_{Li} (3.98 ± 0.12) (Figure 4D). Interestingly, 14 d-omeprazole (600 ng/mL)-exposed monolayers showed a different permeability sequence as follows: P_K > P_{Na} > P_{Rb} > P_{Cs} > P_{Li} (Figure 4D). In addition, omeprazole also inhibited Caco-2 permeability to all of these monovalent cations in a dose-dependent manner.

In a parallel study, TER was simultaneously recorded when the monolayers were exposed to group I alkaline metals containing solution. In control conditions, Caco-2 monolayers showed the highest conductance (lowest TER) to Na^+ (Figure 4E). The TER-Pauling radii relationship showed a V-shaped profile. Omeprazole-treated Caco-2 monolayers showed the lowest TER when the primary ion was K^+ (Figure 4E). Omeprazole also changed the TER-Pauling radii graph to a U-shape relationship and increased TER in all groups.

Omeprazole inhibited paracellular Mg^{2+} transport

Theoretically, ions can move transversely across Caco-2 monolayer *via* four transport mechanisms, i.e. solvent drag-induced active, voltage dependent active, transcellular active, and paracellular passive transport. Therefore, the present experiment aimed to identify the relative involvement of each mechanism in Mg^{2+} transport across Caco-2 monolayers. Inhibitors of solvent drag-induced ion transport (phlorizin and phloretin) had no effect on $Mg_{A\rightarrow B}$ transport (40 mmol/L Mg^{2+} concentration gradient) in both control and omeprazole-treated monolayers (Figure 5D). In another set of experiments, Caco-2 monolayers received continuous application of *Isc*, simultaneously with the Mg^{2+} flux study, to nullify trans-epithelial PD and to abolish voltage dependent Mg^{2+} transport. The $Mg_{A\rightarrow B}$ transport in both control and omeprazole-treated monolayers were unaffected by *Isc*, (Figure 5A). The results indicated that solvent drag-induced and voltage dependent $Mg_{A\rightarrow B}$ transport were negligible.

Since transcellular Mg^{2+} transport required apical Mg^{2+} influx, inhibition of Mg^{2+} influx should abolish Mg^{2+} transport. When 20 μmol/L ruthenium red (RR), a TRPM6 inhibitor[23], was added to the apical solution, a linear relationship between $Mg_{A\rightarrow B}$ transport and Mg^{2+} concentration was observed (Figure 5B). The rate constant for non-saturable $Mg_{A\rightarrow B}$ transport of control monolayers (2.18 ± 0.13) was not different from the slope of $Mg_{A\rightarrow B}$ transport (2.09 ± 0.06) of RR-treated control monolayers. In parallel experiments, 14 d-600 ng/mL omeprazole-treated monolayers were bathed in bathing solution with or without 20 μmol/L RR (Figure 5C). Similar to control conditions, RR inhibited the saturable component, but not the non-saturable component, of $Mg_{A\rightarrow B}$ transport in omeprazole-treated monolayers. In RR-treated monolayers, the 14 d-omeprazole-treated group showed a less steep slope when compared with that of the control group (1.29 ± 0.04 *vs* 2.09 ± 0.06, $P < 0.001$, Figure 5B and C). Therefore, omeprazole suppressed the non-saturable passive Mg^{2+} transport across Caco-2 monolayers.

Temperature dependent Mg^{2+} permeability

To elucidate the temperature dependent Mg^{2+} transport, Caco-2 monolayers were bathed in 40 mmol/L $MgCl_2$ containing apical solution, while the basolateral solution had no $MgCl_2$. As shown by the Arrhenius plot (Figure 5E), the ln(P_{Mg}) decreased in lower temperatures. The control monolayers showed E_a of 14.28 ± 1.19 kJ/mol and Q_{10} of 1.22 ± 0.04. Fourteen days of 600 ng/mL omeprazole exposure significantly suppressed Mg^{2+} transport and increased E_a (19.24 ± 1.98 kj/mol, $P <$ 0.05), but not Q_{10} (1.31 ± 0.05), of Caco-2 monolayers.

DISCUSSION

The present study demonstrated the effect of omeprazole on Mg^{2+} transport across Caco-2 intestinal epithelium. Omeprazole-treated monolayers showed a dose- and time-dependent decrease in Mg^{2+} transport and P_{Mg} (Figures 1-3).

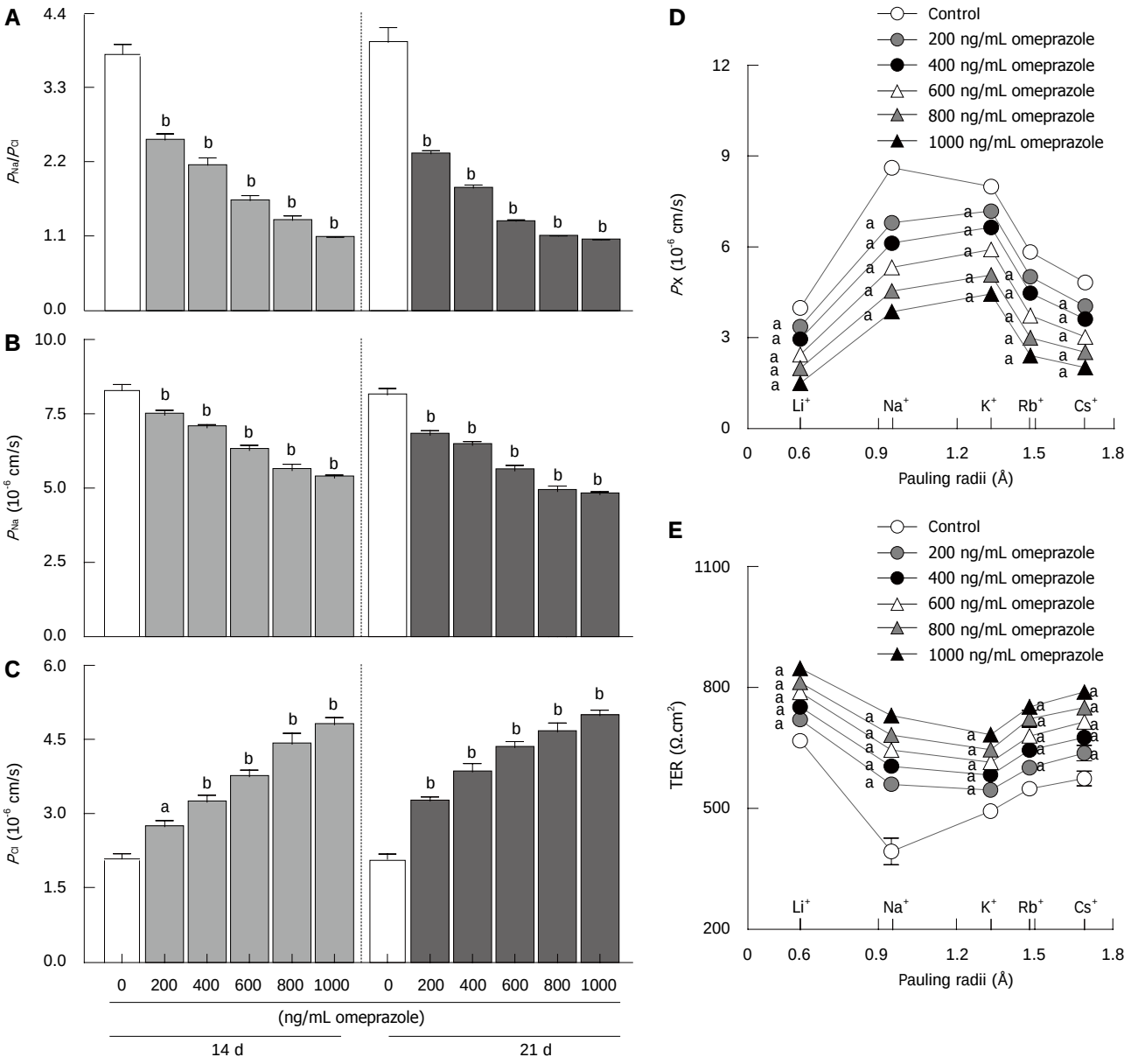


Figure 4 Paracellular charge selectivity and selective permeability profile. A: P_{Na}/P_{Cl}; B: P_{Na}; C: P_{Cl} of 14 and 21 d control and various dose omeprazole-treated monolayers; D: Absolute alkaline metal ions (Li^+, Na^+, K^+, Rb^+, and Cs^+) permeability; E: Trans-epithelium resistance (TER) of 14 d control and 600 ng/mL omeprazole-treated monolayers. $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ *vs* the age matched control group. For each data point, $n = 6$.

Omeprazole selectively inhibited the non-saturable passive component, but not the saturable active component, of transepithelial Mg^{2+} transport (Table 1 and Figure 5). The paracellular cation selectivity of the monolayers was also reduced after prolonged exposure to omeprazole (Figure 4). Results of the Arrhenius plot (Figure 5) showed the higher E_a in the omeprazole-treated group, indicating impediment of the paracellular channel to Mg^{2+} movement.

In humans, intestinal Mg^{2+} absorption *vs* Mg^{2+} intake exhibited a curvilinear relationship[5] from the combination of saturable active and non-saturable passive absorption. Moreover, lower intestinal passive Mg^{2+} absorption as compared with passive Ca^{2+} absorption was also demonstrated[5,24]. Similarly, in Caco-2 monolayers, a plot of $Mg_{A\rightarrow B}$ transport (representing Mg^{2+} absorption) against Mg^{2+} concentration (in apical solution) was also curvilinear (Figure 1) and $Mg_{A\rightarrow B}$ transport was lower than the apical to basolateral Ca^{2+} transport[21]. Therefore, the Caco-2 monolayer was a suitable *in vitro* model of intestinal Mg^{2+} absorption[16].

Several case reports demonstrated severe hypomagnesemia associated with prolonged omeprazole usage[10-14], suggesting that intestinal Mg^{2+} absorption, but not renal Mg^{2+} handling, was defective. On the other hand, short-term omeprazole administration had no effect on intestinal Mg^{2+} absorption[25] because its bioavailability was low and its half-life was short[9,26]. Therefore, the later development of hypomagnesemia was probably associated with the depletion of Mg^{2+} store in the human body[13]. The present study demonstrated an inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} fluxes across 14 and 21 d-omeprazole-treated Caco-2 monolayers, suggesting that the intes-

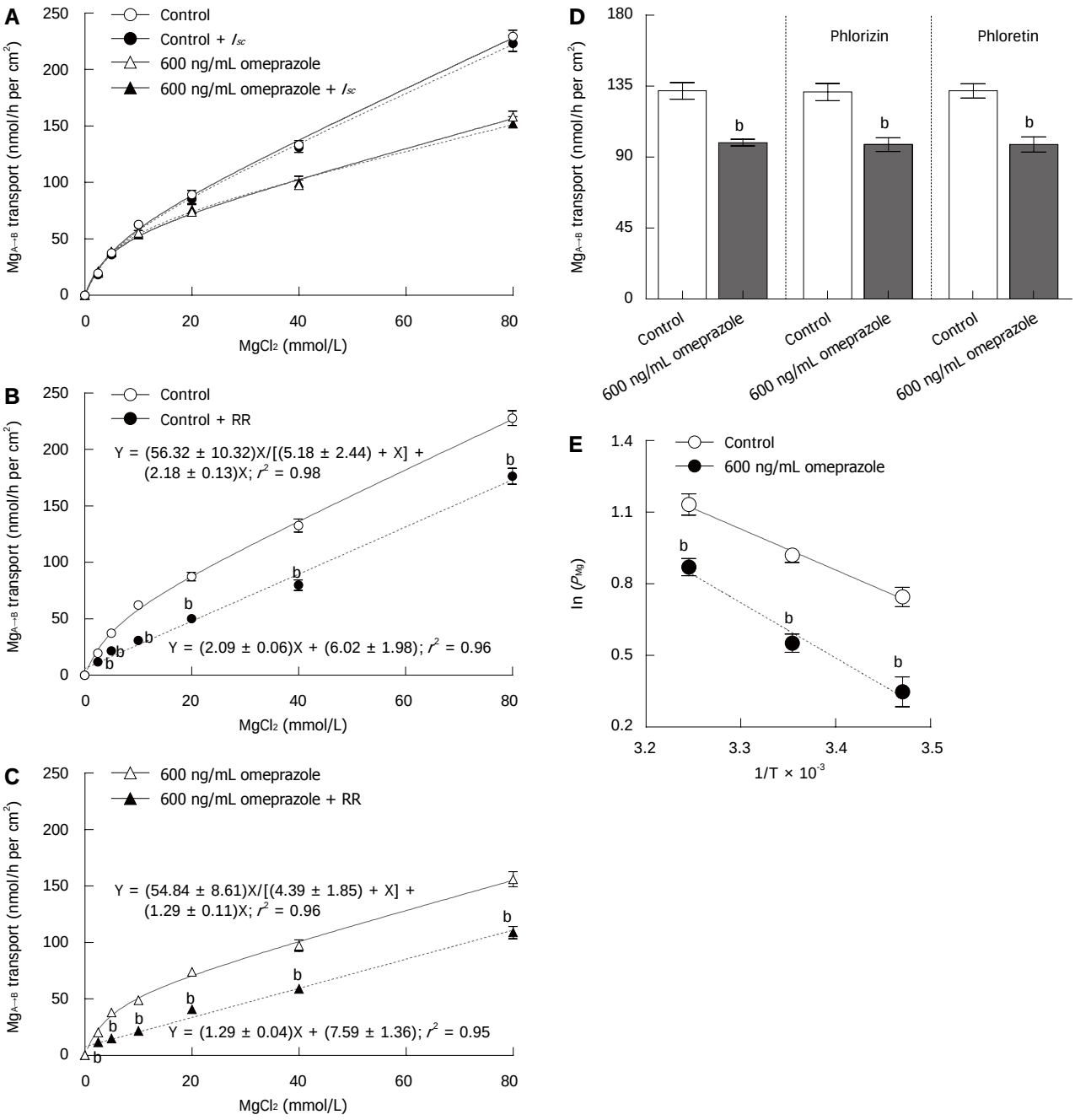


Figure 5 Mechanism of $Mg_{A\rightarrow B}$ transport. A: $Mg_{A\rightarrow B}$ transport 14 d control and 600 ng/mL omeprazole-treated monolayers with or without I_{sc}; B and C: 20 μmol/L ruthenium red (RR); D: 100 μmol/L phlorizin or 100 μmol/L phloretin. For each data point, n = 9 in A; n = 6 in B and C. E, Arrhenius plot of 14 d control and 600 ng/mL omeprazole-treated monolayers. $^bP < 0.01$ *vs* the control group. For each data point, n = 6.

tinal Mg^{2+} flux defect could not be responsible for later development of hypomagnesemia in omeprazole use.

There are two transport mechanisms for Mg^{2+} absorption, i.e. transcellular active and paracellular passive transport, across the intestinal epithelium[7]. Previous reports suggested that omeprazole inhibited active intestinal Mg^{2+} absorption and TRPM6 activity because high dose oral Mg^{2+} supplement partially[13] and totally[14] resolved hypomagnesemia in prolonged omeprazole use. On the other hand, other reports showed different results i.e. high dose oral Mg^{2+} supplement, but not intravenous Mg^{2+} replacement and withdrawal of omeprazole, failed to normalize plasma and urinary Mg^{2+} levels[10,12]. The later evidence indicated that omeprazole inhibited passive Mg^{2+} absorption, which agreed with the present findings. In the present study, omeprazole inhibited the non-saturable passive, but not saturable active, Mg^{2+} transport across Caco-2 monolayers (Table 1). In addition, the role of transcellular active Mg^{2+} transport was examined using the TRPM6 inhibitor RR. Inhibition of TRPM6 in Caco-2 cells[27] abolished the saturable active Mg^{2+} transport and revealed the inhibition of non-saturable passive Mg^{2+} transport in omeprazole-treated monolayers (Figure 5B and C). Therefore, the paracellular passive Mg^{2+} absorption defect should be recognized in omeprazole usage.

Consistent with previous findings that the paracellular

passive transport of cations, such as Na^+, Cs^+, H^+, Ca^{2+}, and Mg^{2+}, was a temperature variance mechanism[18,20], the present Arrhenius plot (Figure 5E) showed the temperature-dependent Mg^{2+} transport. Since the temperature coefficient Q_{10} of passive ion diffusion through the open ion channel ranged from 1.2 to 1.4[28] and the paracellular pore of the tight junction behaved as the channel[20], therefore, the Q_{10} of control (1.22) and omeprazole treated (1.31) monolayers indicated that Mg^{2+} mainly moved through the paracellular channels of Caco-2 epithelium. The paracellular passive H^+ transport occurred *via* the claudin-8 channel of MDCK II epithelium[18]. The paracellular claudin-8 channel was found to impede H^+ transport by increasing the E_a[18]. Therefore, the higher E_a of omeprazole-treated Caco-2 epithelium suggested that the paracellular channel of Caco-2 epithelium impeded Mg^{2+} transport. In addition, the higher TER (Table 2) also indicated lower paracellular permeability. The present study supported a previous report by Hou *et al*[29], who demonstrated that the epithelium with higher TER showed lower passive Mg^{2+} transport.

The paracellular transport of Mg^{2+} was regulated by the paracellular charge selectivity, i.e. cation selectivity, of the tight junction[29,30]. Caco-2 epithelium was a cation selective epithelium (Figure 4A-C)[21,22] that favored the transport of cations through the paracellular pathway. Similar to a previous report[21], the paracellular selective permeability profile of Caco-2 monolayers to monovalent cations was $Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Li^+$ (Figure 4D) which was classified as series Ⅶ of the Eisenman sequence[31]. Series Ⅶ indicated the presence of moderate negative electrical field strength in the paracellular channel of Caco-2 epithelium. However, omeprazole changed the selective permeability profile to series Ⅵ of the Eisenman sequence ($K^+ > Na^+ > Rb^+ > Cs^+ > Li^+$)[31]. Since series Ⅵ was characterized by lower negative electrical field strength than that of series Ⅶ[31], the paracellular cation selectivity was decreased when the monolayers were exposed to omeprazole (Figure 4A-C). Hou *et al*[29] also demonstrated lower paracellular Mg^{2+} transport due to lower paracellular cation selectivity of the epithelium. Thereby, omeprazole-induced suppression of paracellular cation selectivity led to the inhibition of paracellular Mg^{2+} transport across Caco-2 epithelium.

The present study demonstrated the inhibitory effect of omeprazole on passive Mg^{2+} transport which was consistent with previous reports[29,30,32-34]. The paracellular passive Mg^{2+} transport was mainly mediated by claudins at the tight junction[29,30], the distribution of which could be affected by the change in extracellular fluid pH. Inhibition of H^+/K^+-ATPase activity in Caco-2 cells[35] by omeprazole might decrease the extracellular H^+ concentration, which in turn increased the sensitivity of the extracellular calcium sensing receptor (CaSR)[32, 33], which was expressed in Caco-2 cells[36,37]. Ikari *et al*[34] clearly demonstrated that the activation of CaSR led to the translocation of claudin-16 from the tight junction into the cell, thus inhibiting paracellular Mg^{2+} transport. Therefore, omeprazole-inhibited passive Mg^{2+} transport appeared to involve the CaSR-tight junction-dependent mechanism.

In conclusion, omeprazole inhibited paracellular passive Mg^{2+} transport across Caco-2 epithelium in a dose- and time-dependent fashion. The inhibition of passive Mg^{2+} transport was due to the decrease in paracellular cation selectivity. The results from the present study provided evidence for the regulation of intestinal Mg^{2+} absorption. However, the underlying mechanism of omeprazole inhibiting passive Mg^{2+} transport requires further study.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to Assistant Professor Narattaphol Charoenphandhu of the Department of Physiology and Consortium for Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, for critical suggestions. We also thank Ms Jirawan Thongbunchoo of COCAB, for technical assistance.

COMMENTS

Background

Previously, it was widely believed that intestinal Mg^{2+} transport in humans depended on the amount of Mg^{2+} intake and was not tightly regulated by any hormones. Omeprazole, a common therapeutic drug for acid-peptic disorders, has been found to have effects on Mg^{2+} metabolism.

Research frontiers

Several previous reports have demonstrated an association between severe hypomagnesemia and prolonged omeprazole usage in humans. Those patients had normal renal Mg^{2+} handling, suggesting that a defect in intestinal Mg^{2+} absorption may be responsible for hypomagnesemia. However, the direct action of omeprazole on intestinal Mg^{2+} absorption is unknown. In this manuscript, an inhibitory effect of omeprazole on intestinal passive Mg^{2+} absorption is demonstrated.

Innovations and breakthroughs

In this manuscript, the authors reported a direct inhibitory action of prolonged omeprazole treatment on paracellular passive Mg^{2+} absorption across the intestinal epithelium. This finding provides an explanation on how prolonged usage of omeprazole could lead to hypomagnesemia.

Applications

Acid-peptic disorders, e.g. gastro-oesophageal reflux disease, erosive oesophagitis, heartburn, and Barrett's disease, are chronic diseases that require prolonged omeprazole administration. Therefore, plasma Mg^{2+} assessment should help prevent hypomagnesemia in these patients.

Terminology

The paracellular charge selectivity is a property of epithelium that is selectively permeable to specific charged molecules, e.g. ions. This property is regulated by proteins of the tight junction, i.e. claudins. Alterations in claudin expression in the tight junction directly affect the charge selectivity and the paracellular ion transport across the epithelium.

Peer review

This is an interesting paper investigating the inhibitory action of omeprazole on magnesium transepithelial transport at intestinal level. The study is well-done, the rationale is clear, the experimental design correct, and the results shown convincingly support the conclusions drawn.

REFERENCES

1 **Durlach J**. Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Magnes Res* 1990; **3**: 217-218
2 **Rude RK**, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem* 2004; **15**: 710-716
3 **Touyz RM**. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 2003; **24**: 107-136

4 **Konrad M**, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**: F599-F605
5 **Fine KD**, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J Clin Invest* 1991; **88**: 396-402
6 **Schlingmann KP**, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1772**: 813-821
7 **Quamme GA**. Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; **24**: 230-235
8 **Hou J**, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008; **118**: 619-628
9 **Olbe L**, Carlsson E, Lindberg P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat Rev Drug Discov* 2003; **2**: 132-139
10 **Epstein M**, McGrath S, Law F. Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1834-1836
11 **Hoorn EJ**, van der Hoek J, de Man RA, Kuipers EJ, Bolwerk C, Zietse R. A case series of proton pump inhibitor-induced hypomagnesemia. *Am J Kidney Dis* 2010; **56**: 112-116
12 **Shabajee N**, Lamb EJ, Sturgess I, Sumathipala RW. Omeprazole and refractory hypomagnesaemia. *BMJ* 2008; **337**: a425
13 **Cundy T**, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol* (Oxf) 2008; **69**: 338-341
14 **Broeren MA**, Geerdink EA, Vader HL, van den Wall Bake AW. Hypomagnesemia induced by several proton-pump inhibitors. *Ann Intern Med* 2009; **151**: 755-756
15 **Jantarajit W**, Thongon N, Pandaranandaka J, Teeraporn-puntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**: E372-E384
16 **Ekmekcioglu C**, Ekmekcioglu A, Marktl W. Magnesium transport from aqueous solutions across Caco-2 cells--an experimental model for intestinal bioavailability studies. Physiological considerations and recommendations. *Magnes Res* 2000; **13**: 93-102
17 **Thongon N**, Nakkrasae LI, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Enhancement of calcium transport in Caco-2 monolayer through PKCzeta-dependent Cav1.3-mediated transcellular and rectifying paracellular pathways by prolactin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; **296**: C1373-C1382
18 **Angelow S**, Kim KJ, Yu AS. Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J Physiol* 2006; **571**: 15-26
19 **Winkler JP**, Cherry RS, Schlesinger WH. The Q_{10} relationship of microbial respiration in a temperate forest soil. *Soil Biol Biochem* 1996; **28**: 1067-1072
20 **Tang VW**, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 2003; **84**: 1660-1673
21 **Thongon N**, Nakkrasae LI, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **294**: C1158-C1168
22 **Carr G**, Haslam IS, Simmons NL. Voltage dependence of transepithelial guanidine permeation across Caco-2 epithelia allows determination of the paracellular flux component. *Pharm Res* 2006; **23**: 540-548
23 **Voets T**, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG. TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J Biol Chem* 2004; **279**: 19-25
24 **Roth P**, Werner E. Intestinal absorption of magnesium in man. *Int J Appl Radiat Isot* 1979; **30**: 523-526
25 **Serfaty-Lacrosniere C**, Wood RJ, Voytko D, Saltzman JR, Pedrosa M, Sepe TE, Russell RR. Hypochlorhydria from short-term omeprazole treatment does not inhibit intestinal absorption of calcium, phosphorus, magnesium or zinc from food in humans. *J Am Coll Nutr* 1995; **14**: 364-368
26 **Boparai V**, Rajagopalan J, Triadafilopoulos G. Guide to the use of proton pump inhibitors in adult patients. *Drugs* 2008; **68**: 925-947
27 **Flach CF**, Qadri F, Bhuiyan TR, Alam NH, Jennische E, Holmgren J, Lönnroth I. Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. *FEBS Lett* 2007; **581**: 3183-3188
28 **Hille B**. Ion channels of Excitable Membranes. Massachusetts: Sinauer Associates, 2001
29 **Hou J**, Paul DL, Goodenough DA. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci* 2005; **118**: 5109-5118
30 **Shan Q**, Himmerkus N, Hou J, Goodenough DA, Bleich M. Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1165**: 148-151
31 **Eisenman G**, Horn R. Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. *J Membr Biol* 1983; **76**: 197-225
32 **Quinn SJ**, Bai M, Brown EM. pH Sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 2004; **279**: 37241-37249
33 **Doroszewicz J**, Waldegger P, Jeck N, Seyberth H, Waldegger S. pH dependence of extracellular calcium sensing receptor activity determined by a novel technique. *Kidney Int* 2005; **67**: 187-192
34 **Ikari A**, Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M. Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport *via* claudin-16. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 283-290
35 **Abrahamse SL**, Bindels RJ, van Os CH. The colon carcinoma cell line Caco-2 contains an H^+/K^+-ATPase that contributes to intracellular pH regulation. *Pflugers Arch* 1992; **421**: 591-597
36 **Davies SL**, Gibbons CE, Steward MC, Ward DT. Extracellular calcium- and magnesium-mediated regulation of passive calcium transport across Caco-2 monolayers. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 2318-2324
37 **Gama L**, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE. Ca^{2+}-sensing receptors in intestinal epithelium. *Am J Physiol* 1997; **273**: C1168-C1175

S- Editor Shi ZF **L- Editor** Webster JR **E- Editor** Ma WH

ภาวะปริมาณแมกนีเซียมในเลือดต่ำจากการได้รับโอมิพราโซลเป็นเวลานาน
Hypomagnesemia from Long-Term Omeprazole Administration

ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น*
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Narongrit Thongon*
Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University.

บทคัดย่อ

โอมิพราโซล (omeprazole) คือยาที่นิยมใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อย จึงทำให้โอมิพราโซลถูกใช้มานานกว่า 20 ปี อย่างไรก็ตามนับจากปีคริสต์ศักราช 2006 มีรายงานจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงภาวะปริมาณแมกนีเซียมในเลือดต่ำอย่างรุนแรงในผู้ป่วยที่ใช้โอมิพราโซลเป็นเวลานาน แต่จากการศึกษาในผู้ป่วยเหล่านั้นพบว่าการทำงานของไตในการจัดการแมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นปกติ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าโอมิพราโซลอาจยับยั้งการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้แสดงให้เห็นว่าโอมิพราโซลมีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ดังนั้นการติดตามระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับโอมิพราโซลเป็นเวลานานอาจช่วยป้องกันผลข้างเคียงของยาต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด

คำสำคัญ : การดูดซึม แมกนีเซียม โอมิพราโซล ลำไส้

Abstract

Omeprazole is a common therapeutic drug for acid-peptic disorder. Because of its very few adverse effects, it has been using for more than 20 years. However, since 2006, several reports showed severe hypomagnesemia in long-term omeprazole-administrated patients while renal Mg^{2+} handling was reported to be normal. Therefore, omeprazole propably supresses the intestinal Mg^{2+} absorption. The recent study demonstrated the inhibitory effect of omeprazole on intestinal Mg^{2+} absorption. Therefore, plasma Mg^{2+} assessment in long-term omeprazole administrated patients may help to prevent the adverse effect of omeprazole on the plasma Mg^{2+} level.

Keywords : absorption, intestine, magnesium, omeprazole,

* E-mail: narongritt@buu.ac.th

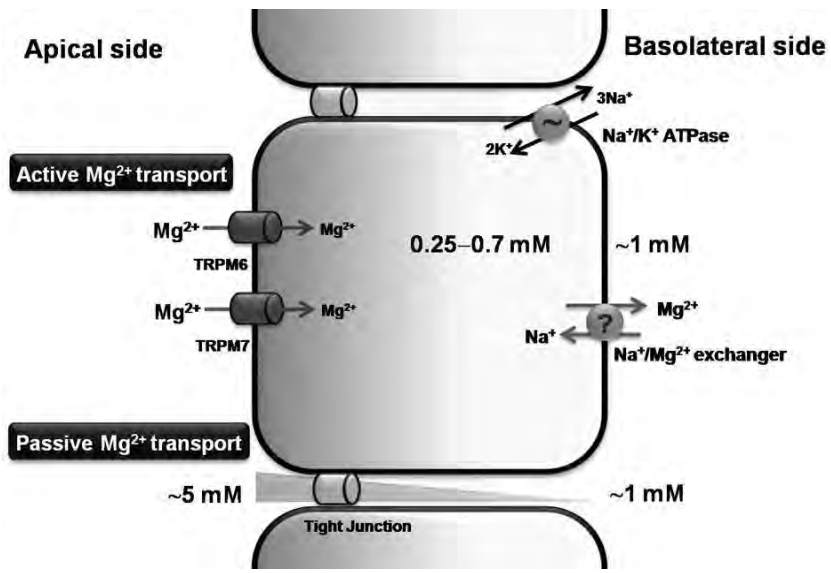
บทนำ

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) เป็นไอออนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อร่างกายมนุษย์ หากปริมาณของ Mg^{2+} ในร่างกายลดลงอาจก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพ อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน (Rude & Gruber, 2004), Alzheimer's disease (Durlach, 1990), cardiac arrhythmia (Delva, 2003), และความดันโลหิตสูง (Touyz, 2003) ดังนั้นระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดจึงต้องถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมคือประมาณ 0.7-1.1 mmol/l โดยอาศัยการทำงานของอวัยวะสำคัญสองส่วนคือ ลำไส้ซึ่งมีหน้าที่ดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย และไตซึ่งมีหน้าที่ขับ Mg^{2+} ส่วนเกินออกจากร่างกาย หากการทำงานของอวัยวะทั้งสองเกิดความผิดปกติจะส่งผลร้ายแรงต่อปริมาณของ Mg^{2+} ในกระแสเลือด (Rude, 1998) บทความนี้จะนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับผลข้างเคียงของโอมิพราโซลซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ต่อระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด เพื่อให้ผู้ป่วยและผู้ให้การรักษาตระหนักและหาทางป้องกันผลข้างเคียงของยา

สมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย

ในร่างกายของผู้ใหญ่นั้นมี Mg^{2+} อยู่ประมาณ 24 g ซึ่งในจำนวนนี้ประมาณ 53% สะสมในกระดูก อีกประมาณ 46% อยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย ส่วนที่เหลือคือประมาณ 1% นั้นจะอยู่ในกระแสเลือดและของเหลวระหว่างเซลล์ (Vormann, 2003) Mg^{2+} มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทุกเซลล์ในร่างกายมนุษย์ เนื่องจากมีส่วนสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของ ion channel ควบคุมการคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ ควบคุมกระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์สำคัญต่างๆ ภายในเซลล์มากกว่า 300 ชนิด (Rude, 1998)

ในแต่ละวันเราได้รับ Mg^{2+} จากอาหารที่รับประทานประมาณ 300-360 mg ซึ่ง 30-50 % จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (Rude, 1998) ส่วนที่เหลือนั้นจะสูญเสียไปทางอุจจาระ แต่อย่างไรก็ตามในภาวะที่อาหารที่รับประทานมีปริมาณ Mg^{2+} น้อย ลำไส้จะเพิ่มการดูดซึม Mg^{2+} เป็นประมาณ 80% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่รับประทาน (Fine *et al*., 1991; Quamme, 2008) ซึ่งหากพิจารณาแต่ละส่วนของลำไส้ ในภาวะปกติลำไส้ส่วน duodenum ดูดซึมประมาณ 15 mg ลำไส้ส่วน jejunum ดูดซึมประมาณ 30 mg ลำไส้ส่วน ileum ดูดซึมประมาณ 75 mg หรือคิดเป็น 56% ของ ปริมาณ Mg ทั้งหมดที่ดูดโดยลำไส้ ส่วนลำไส้ใหญ่นั้นจะดูดซึมประมาณ 15 mg (McCarthy *et al*., 1999) โดยเซลล์เยื่อบุลำไส้ดูดซึม Mg^{2+} ผ่านทาง 2 กลไกคือ การดูดซึมแบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1. ภาพแสดงกลไกการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้. Apical side คือผนังด้านโพรงลำไส้; Basolateral side คือผนังลำไส้ด้านที่ติดกับหลอดเลือด

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงาน (active Mg^{2+} transport) โดย Mg^{2+} จากโพรงลำไส้จะไหลเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง transient receptor potential melastatin (TRPM) 6 และ TRPM7 จากนั้น Mg^{2+} จะถูกนำออกนอกเซลล์ก่อนเข้าสู่กระแสเลือดโดย Na^{+}/Mg^{2+} exchanger การดูดซึม Mg^{2+} ด้วยกลไกนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งในภาวะที่รับประทาน Mg^{2+} ในปริมาณน้อย (Quamme, 2008; Romani, 2007)

การดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้พลังงาน (passive Mg^{2+} transport) โดยอาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg^{2+} โดยปริมาณของ Mg^{2+} อิสระในโพรงลำไส้มีค่าอย่างน้อยประมาณ 5 mmol/l ซึ่งสูงกว่าความเข้นของ Mg^{2+} อิสระในกระแสเลือดที่มีค่าประมาณ 0.7-1.1 mmol/l ส่งผลให้ Mg^{2+} จากด้านโพรงลำไส้ไหลผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ก่อนเข้าสู่กระแสเลือด กลไกการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ถือเป็นกลไกหลักของร่างกายเนื่องจากดูดซึม Mg^{2+} ประมาณ 90% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมโดยลำไส้ (Quamme, 2008)

เพื่อรักษาระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้มีค่าที่เหมาะสมคือประมาณ 0.7-1.1 mmol/l นั้น Mg^{2+} ส่วนเกินจะถูกขับออกจากร่างกายโดยอาศัยการทำงานของไต โดยในแต่ละวันประมาณ 80% ของ Mg^{2+} ทั้งหมดจะถูกกรองเข้าสู่ท่อไต ในจำนวนนี้ประมาณ 95% จะถูกดูดกลับเข้าสู่กระแสเลือด โดยท่อไตส่วนต้นดูดกลับประมาณ 20% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ถูกกรองเข้าสู่ท่อไต ท่อไตส่วน thick ascending limb ดูดกลับประมาณ 70% และท่อไตส่วนปลายดูดกลับประมาณ 5-10% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ถูกกรองเข้าสู่ท่อไต (Konrad *et al*., 2004) อย่างไรก็ดีในภาวะที่ร่างกายมีปริมาณ Mg^{2+} น้อย ท่อไตสามารถเพิ่มการดูดกลับ Mg^{2+} ได้ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมน

ถึงแม้ว่าการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้จะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษาระดับ Mg^{2+} ในร่างกาย แต่กลับไม่มีฮอร์โมนชนิดใดที่มีหน้าที่ควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ ต่างจากการดูดกลับ Mg^{2+} ที่ท่อไตส่วน thick ascending limb ซึ่งถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนหลายชนิด ได้แก่ arginine vasopressin, glucagon, calcitonin, parathyroid hormone, estrogen, epidermal growth factor, และ insulin (Hoenderop & Bindels 2008; Quamme & de Rouffignac, 2000).

โอมิพราโซลและสมดุล Mg^{2+} ในร่างกาย

โอมิพราโซล (omeprazole) เป็นยาในกลุ่ม proton pump inhibitor (PPIs; omeprazole, lansoprazole, pantoprazole, rabeprazole และ esomeprazole) ซึ่งเป็นสารเคมีประเภท pyridyl methylsulfinyl benzamidazoles เมื่อถูกกระตุ้นด้วยภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารจะเปลี่ยนเป็น sulphenamides มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ H^{+}/K^{+}-ATPase (Olbe *et al*., 2008) และยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ดังนั้นโอมิพราโซลจึงนิยมใช้รักษาโรคของระบบทางเดินอาหารที่ต้องการการยับยั้งการหลั่งกรดจาก parietal cells ในกระเพาะอาหาร อาทิเช่น peptic ulcer, gasto-oesophageal reflux disease, erosive oesophagitis, heartburn, และ Barret's disease (Boparai *et al*., 2008; Olbe *et al*., 2008) จึงทำให้โอมิพราโซลเป็นที่นิยมและกลายเป็นยาที่ขายดีที่สุดในโลกในทศวรรษที่ 1990 (Olbe *et al*., 2008) ถึงแม้ว่าการได้รับโอมิพราโซลเพียงครั้งเดียวจะสามารถยับยั้งการหลั่งกรดได้เป็นเวลา 2-3 วัน แต่การที่ร่างกายสามารถกำจัดโอมิพราโซลได้เร็ว (half life 0.5-2 ชั่วโมง) ดังนั้นการป่วยเรื้อรัง อาทิเช่น peptic ulcer และ erosive oesophagitis จึงทำให้ผู้ป่วยต้องได้รับโอมิพราโซลติดต่อกันเป็นเวลานาน (Olbe *et al*.,2008)

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 จนปัจจุบัน มีรายงานทางการแพทย์ในผู้ป่วยที่ได้รับโอมิพราโซลติดต่อกันเป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี ส่งผลข้างเคียงคือทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติอย่างรุนแรง และทำให้เกิดอาการผิดปกติต่างๆ อาทิเช่น การสั่นอย่างรุนแรง ตะคริว ลมชัก หรือ หมดสติ (Epstein *et al*., 2006; Cundy & Dissanayaki, 2008; Shabajee *et al*., 2008; Broeren *et al*., 2009; Hoorn *et al*., 2010) นอกจากนั้นยังทำให้เกิดความผิดปกติของมวลกระดูก ทำให้กระดูกเปราะและหักง่าย (Broeren *et al*., 2009; Yang *el al*., 2006) บ่งชี้ว่าปริมาณของ Mg^{2+} ในกระดูกและเซลล์ทั่วร่างกายซึ่งเป็นแหล่งสะสม Mg^{2+} ลดลงอย่างมาก จึงเป็นไปได้ว่าโอมิพราโซลจะมีผลข้างเคียงโดยรบกวนการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่ร่างกาย และ/หรือ รบกวนการทำงานของไต ที่มีหน้าที่ดูดกลับ Mg^{2+} เข้าสู่กระแสเลือดเพื่อรักษาระดับ Mg^{2+} ในร่างกายให้เป็นปกติ

โอมิพราโซลกับการทำงานของลำไส้ และ ไต

ในแต่ละวันจะมี Mg^{2+} ถูกกรองเข้าสู่ท่อไตสูงถึง 80% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดในกระแสเลือด หากไตทำงานผิดปกติ

ย่อมทำให้ร่างกายสูญเสีย Mg^{2+} ไปกับปัสสาวะเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำจากการใช้โอมิพราโซลเป็นเวลานานพบว่าการทำงานของไตในการจัดการ Mg^{2+} ของผู้ป่วยเหล่านั้นเป็นปกติ มิได้มีการสูญเสีย Mg^{2+} ไปกับปัสสาวะแต่อย่างใด (Cundy & Dissanayaki, 2008; Shabajee *et al*., 2008; Broeren *et al*., 2009) บ่งชี้ได้ว่าภาวะปริมาณ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำอาจเกิดจากโอมิพราโซลมีผลยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} ที่ลำไส้

ถึงแม้ว่าข้อมูลจากรายงานหลายฉบับจะสนับสนุนสมติฐานที่ว่าโอมิพราโซลน่าจะมีผลยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} ที่ลำไส้ แต่ยังไม่มีรายงานฉบับใดที่ศึกษาผลของโอมิพราโซลต่อการดูดซึม Mg^{2+} ที่ลำไส้โดยตรง อย่างไรก็ตามรายงานเหล่านั้นก็ให้ข้อมูลที่สำคัญคือการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะปริมาณของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดต่ำโดยการให้ Mg^{2+} ปริมาณสูงเสริมทางการรับประทานเพื่อให้ลำไส้ดูดซึม Mg^{2+} เข้าสู่กระแสเลือดนั้นไม่สามารถรักษาระดับของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้ ในทางตรงกันข้ามการให้ Mg^{2+} เสริมทางหลอดเลือดดำโดยตรง และการหยุดใช้โอมิพราโซลกลับทำให้ระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติได้ (Epstein *et al*., 2006; Shabajee *et al*., 2008) แสดงว่าโอมิพราโซลมีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ (Epstein *et al*., 2006; Cundy & Dissanayaki, 2008; Shabajee *et al*., 2008; Broeren *et al*., 2009) ซึ่งถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ เนื่องจากที่ผ่านมานั้นเชื่อกันว่าการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้นั้นขึ้นกับปริมาณของ Mg^{2+} ที่รับประทานเข้าไปเป็นหลัก และไม่มีกลไกหรือปัจจัยอื่นควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ แต่จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นกลับแสดงให้เห็นได้ว่าการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้สามารถถูกควบคุมภายใต้อิทธิพลของโอมิพราโซล ส่วนกลไกการควบคุมการดูดซึม Mg^{2+} โดยโอมิพราโซลนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

การศึกษาผลของโอมิพราโซลต่อการดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้

การศึกษาการดูดซึมสารต่างๆ ในลำไส้นั้นนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เนื่องจากเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีคุณลักษณะสำคัญของลำไส้มนุษย์ไม่ว่าจะเป็นด้านโครงสร้าง หรือด้านการทำงานที่มีการดูดซึมสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นยา และ สารอาหาร คล้ายคลึงกับลำไส้เล็กของมนุษย์ (Pinto *et al*., 1983; Chantret *et al*., 1988; Lennernas *et al*.,1996; Yee, 1997; Hidalgo, 1989) ยิ่งไปกว่านั้นแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ซึ่งเพาะเลี้ยงบน polyester filter ในสภาวะที่เหมาะสมจนกระทั่งเซลล์สร้าง tight junction และกลายเป็นแผ่น epithelium ก็เป็นแบบจำลองที่เหมาะสมและนิยมใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการขนส่งไอออนในลำไส้ อาทิเช่น แคลเซียม (Ca^{2+}) (Charoenphandhu *et al*., 2009; Jantarajit *et al*., 2007; Nakkrasae *et al*., 2010; Thongon *et al*., 2008; 2009) และ Mg^{2+} (Ekmekcioglu *et al*., 2000)

จากการศึกษาของ Thongon and Krishnamra (2010) แสดงให้เห็นว่าการขนส่ง Mg^{2+} ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 นั้นมีความคล้ายคลึงกับดูดซึม Mg^{2+} ในลำไส้ของมนุษย์ คือประกอบด้วยการดูดซึมแบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ เมื่อแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ถูกบ่มด้วยโอมิพราโซลส่งผลยับยั้งการขนส่ง Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์โดยขึ้นกับระยะเวลาและความเข้มข้นของโอมิพราโซลที่ได้รับ โดยแผ่นเซลล์ที่ได้รับโอมิพราโซลเป็นเวลานานกว่าและความเข้มข้นมากกว่าจะมีผลลดการขนส่ง Mg^{2+} ได้มากกว่าแผ่นเซลล์ที่ได้รับโอมิพราโซลเป็นเวลาสั้นกว่าและความเข้มข้นน้อยกว่า อย่างไรก็ดีโอมิพราโซลไม่มีผลต่อการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านเซลล์ เป็นการยืนยันรายงานในผู้ป่วยซึ่งการรักษาโดยให้ Mg^{2+} เสริมปริมาณสูงทางการรับประทานไม่สามารถเพิ่มระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือดให้เป็นปกติได้ นอกจากนั้นการศึกษาของ Thongon and Krishnamra (2010) ยังแสดงให้เห็นว่าโอมิพราโซลออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการยอมให้ไอออนต่างๆ รวมถึง Mg^{2+} ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 และดังที่ได้กล่าวในข้างต้นว่าการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์เกี่ยวข้องกับการดูดซึม Mg^{2+} ประมาณ 90% ของปริมาณ Mg^{2+} ทั้งหมดที่ดูดซึมโดยลำไส้ (Quamme, 2008) ดังนั้นผลของโอมิพราโซลในการยับยั้งการดูดซึม Mg^{2+} แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลำไส้จึงน่าจะเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลร้ายแรงต่อปริมาณของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับโอมิพราโซลเป็นเวลานาน ส่งผลให้ปริมาณของ Mg^{2+} ในกระแสเลือด และในแหล่งสะสมของร่างกาย ได้แก่ เซลล์ทั่วร่างกาย และกระดูกลดลง จนนำไปสู่ปัญหาทางด้านสุขภาพมากมาย

สรุป

การได้รับโอมิพราโซลติดต่อกันมากกว่า 1 ปี อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงคือยับยั้งการทำงานของลำไส้ในการดูดซึม Mg^{2+} และส่งผลให้ปริมาณของ Mg^{2+} ในร่างกายลดลง จนนำไปสู่

ปัญหาทางด้านสุขภาพต่างๆมากมาย ดังนั้นในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องใช้โอมิพราโซลติดต่อกันเป็นเวลานานควรมีการติดตามระดับ Mg^{2+} ในกระแสเลือด ซึ่งหากพบว่าปริมาณของ Mg^{2+} ในกระแสเลือดลดลง การหยุดใช้โอมิพราโซลและยาตัวอื่นๆ ในกลุ่ม PPIs หรือการให้ Mg^{2+} เสริมทางหลอดเลือดดำ อาจจะเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการรักษาผลข้างเคียงของโอมิพราโซลในผู้ป่วยดังกล่าว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศ.ดร. นทีทิพย์ กฤษณามระ และ รศ.นพ. ดร. นรัตถพล เจริญพันธุ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. มหิดล การศึกษาทั้งหมดนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (MRG5380003) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะกรรมการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Boparai, V., Rajagopalan, J., & Triadafilopoulos, G. (2008). Guide to the use of proton pump inhibitors in adult patients. *Drugs, 68*, 925-947.

Broeren, M.A., Geerdink, E.A., Vader, H.L., & van den Wall Bake, A.W. (2009). Hypomagnesemia induced by several proton-pump inhibitors. *Annal of Internal Medecine, 151*, 755-756.

Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G., & Zweibaum, A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Research, 48*, 1936-1942.

Charoenphandhu, N., Nakkrasae, L., Kraidith, K., Teerapornpuntakit, J., Thongchote, K., Thongon, N., & Krishnamra, N. (2009). Two-step stimulation of intestinal Ca^{2+} absorption during lactation by long-term prolactin (PRL) exposure and suckling-induced PRL surge. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism, 297*, E609–E619.

Cundy, T., & Dissanayake, A. (2008). Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol, 69*, 338–341.

Delva, P. (2003). Magnesium and cardiac arrhythmias. *Molecular Aspects of Medecine, 24*, 53-62.

Durlach, J. (1990). Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Magnesium Research, 3*, 217-218

Ekmekcioglu, C., Ekmekcioglu, A., & Marktl, W. (2000). Magnesium transport from aqueous solutions across Caco-2 cells--an experimental model for intestinal bioavailability studies. Physiological considerations and recommendations. *Magnesium Research, 13*, 93-102.

Epstein, M., McGrath, S., & Law, F. (2006). Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. *The New England Journal of Medecine, 355*, 1834-1836.

Hoenderop, J.G., & Bindels, R.J. (2008). Calciotropic and magnesiotropic TRP channels. *The Journal of Physiology, 23*, 32-40.

Fine, K.D., Ana, C.A.S., Porter, J.L., & Fordtran, J.S. (1991). Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *The Journal of Clinical Investigation, 88*, 396-402.

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

Hoorn, E.J., van der Hoek, J., de Man, R.A., Kuipers, E.J., Bolwerk, C., & Zietse, R. (2010). A case series of proton pump inhibitor-induced hypomagnesemia. *Am J Kidney Dis*, doi:10.1053/j.ajkd.2009.11.019

Jantarajit, W., Thongon, N., Pandaranandaka, J., Teerapornpuntakit, J., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. (2007). Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism, 293*, E372-E384.

Konrad, M., Schlingmann, K.P., & Gudermann, T. (2004). Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiology, 286*, F599-F605.

Lennernas, H., Palm, K., Fagerholm, U., & Artursson, P. (1996). Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Internation Journal of Pharmaceutics*, *127*, 103-107.

McCarthy, J.M., & Kumar, R. (1999). Divalent cation metabilism: Magnesium, In: Glassock RJ, Cohen AH, Grunfeld JP (Eds). *The Schrier Atlas of Diseases of the Kidney*. (pp 4.1-4.12). Philadaphia: Current Medicine Inc.

Nakkrasae, L., Thongon, N., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. (2010). Transepithelial calcium transport in prolactin-exposed intestine-like Caco-2 monolayer after combinatorial knockdown of TRPV5, TRPV6 and Cav1.3. *The Journal of Physiological Scienecs*, *60*, 9-17.

Olbe, L., Carlsson, E., & Lindberg, P. (2008). A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nature Reviews Drug Discovery, 2*, 132-139.

Pinto, M., Robin-Leon, S., Appay, M.D., Kedinger, M., Triadow, N., & Dussaulx, E. (1983). Enerocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcionma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell, 47*, 323-330

Quamme, G.A., & de Rouffignac, C. (2000). Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Frontiers in Bioscience, 5*, D694-D711

Quamme, G.A. (2008). Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Current Opinion in Gastroenterology, 24*, 230-235.

Romani, A. (2007). Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 458*, 90-102.

Rude, R.K. (1998). Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research, 13*, 749-758.

Rude, R.K., & Gruber, H.E. (2004). Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *The Journal of Nutrition Biochemistry, 15*, 710-716.

Shabajee, N., Lamb, E.J., Sturgess, I., & Sumathipala, R.W. (2008). *Omeprazole and refractory hypomagnesaemia. BMJ Journal, 337*, a425-a425.

Thongon, N., Nakkrasae, L.I., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. (2008). Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways. *Am J Physiol Cell Physiology*, *294*, C1158–C1168.

Thongon, N., Nakkrasae, L., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. (2009). Enhancement of calcium transport in Caco-2 monolayer through PKC_{ζ}-dependent Cav1.3-mediated transcellular and rectifying paracellular pathways by prolactin. *Am J Physiol Cell Physiology*, *296*, C1373–C1382.

Thongon, N., & Krishnamra, N. (2010). Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World Journal of Gastroenterology*, (accepted).

Touyz, R.M. (2003). Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med, 24*, 107-136.

Vormann, J. (2003). Magnesium: nutrition and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine, 24*, 27-37.

Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man: fact or myth. *Pharmaceutical Research, 14*, 763-766.

Yang, Y.X., Lewis, J.D., Epstein, S., & Metz, D.C. (2006). Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. *The Journal of the Amercian Medical Association, 296*, 2947-2953.

Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg^{2+} absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers.

Narongrit Thongon[1,3], Nateetip Krishmanra[2]

[1]Facuty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

[2]Department of Physiology and Consortium for calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Sciences, Bangkok 10400, Thailand

[3]To whom correspondence should be addressed:

Narongrit Thongon, PhD,

Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University,

169 Long-Hard Bangsaen Rd., Saensook, Muang,

Chonburi 20131, Thailand.

Email; narongritt@buu.ac.th

Tel. & Fax.: +66-38-393497

Abbreviations: CaSR, calcium sensing receptor: Cldn, claudin: EC_{50}, half maximal effective concentration: CMA, chronic metabolic acidosis: ECL1, extracellular loop 1: P_{Mg}, magnesium permeability: PPI, proton pump inhibitor: r^2, coefficient of determination: TEER, trans-epithelial electrical resistance: RIPA Buffer, radio-immunoprecipitation assay buffer

Running title: Apical acidity normalized omeprazole effects

Abstract

Clinical studies report hypomagnesaemia in long-term omeprazole usage that probably due to intestinal Mg^{2+} wasting. Our previous report demonstrated the inhibitory effect of omeprazole on passive Mg^{2+} ransport across Caco-2 monolayers. The present study aimed to identify the underlying mechanism of omeprazole suppressed passive Mg^{2+} absorption. By using Caco-2 monolayers, we demonstrated a potent inhibitory effect of omeprazole on passive Mg^{2+}, but not Ca^{2+}, transport across Caco-2 monolayers. Omeprazole shitted the % maximum passive Mg^{2+} transport – Mg^{2+} concentration curves to the right and increased half maximal effective concentration (EC_{50}) of those dose – respond curves, indicated a lower Mg^{2+} affinity of paracellular channel. By continually motoring the apical pH, we showed that omeprazole suppressed apical acid accumulation. Neomycin and spermine had no effect on passive Mg^{2+} transport of control and omeprazole treated monolayers, indicated that omeprazole suppressed passive Mg^{2+} transport in calcium sensing receptor (CaSR) – independent mechanism. The results of westernblot analysis showed that omeprazole significantly suppressed claudin (Cldn)-7 and -12, but not -2, expression in Caco-2 cells. By using apical solution at pH 5.5, 6.0, 6.5, and 7.0, we found that apical acidity markedly increased passive Mg^{2+} transport, Mg^{2+} affinity of paracellular channel, and Cldn-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers. Apical acidity normalized the inhibitory effect of omeprazole on passive Mg^{2+} transport and Cldn-7 and -12 expression. Our results provided the evidence for the regulation of intestinal passive Mg^{2+} absorption in luminal acidity – Cldn-7 and -12 dependent mechanisms.

Keywords: claudin, intestine, luminal acidity, magnesium absorption, proton pump inhibitor

Introduction

Magnesium (Mg^{2+}) is an essential co-factor of at least 300 critical enzymatic reactions in the human body. The maintenance of normal Mg^{2+} homeostasis is tightly regulated by the harmony function of intestinal absorption and renal excretion (Konrad *et al*., 2004; Quamme, 2008). Since dietary intake is the solely source of Mg^{2+} store in human (McCarthy and Kumar, 1999), intestinal absorption plays a vital role for normal Mg^{2+} balance. In intestinal tract, duodenum absorbs dietary Mg^{2+} for 11%, jejunum 22%, ileum 56%, and large intestine for 11% of total intestinal Mg^{2+} absorption (McCarthy and Kumar, 1999). Paracellular passive Mg^{2+} transport is the major mechanism, which implicates about 90% of total intestinal Mg^{2+} absorption (Quamme, 2008)

Previous case reports demonstrated the severe hypomagnesemia in patients with long-term used of proton pump inhibitor (PPI) probably due to the intestinal, but not renal, Mg^{2+} wasting (Broeren *et al*., 2009; Cundy and Dissanayake, 2009; Epstein *et al*., 2006; Hoorn *et al*., 2010; Kuipers *et al*., 2009; Mackay and Bladon, 2010; Shabajee *et al*., 2008). Previously, we reported the inhibitory effect of the popular PPI omeprazole on paracellular passive, but not active, Mg^{2+} transport in human enterocyte-like Caco-2 monolayers (Thongon and Krishnamra, 2011). Omeprazole also decreased paracellular Na^{+} permeability and increased paracellular Cl^{-} permeability (Thongon and Krishnamra, 2011). However the underlying cellular mechanism of omeprazole action on paracellular channel is still undiscovered.

The acidic gastric contents were emptied into intestinal lumen, the luminal acidity presented in entire human small bowel (pH 5.5 – 7.0) (Nugent *et al*., 2001). Depression of luminal pH increased ileal Mg^{2+} absorption (Heijnen *et al*., 1993). On the other hand, elevation of extracellular pH increased the sensitivity of CaSR (Doroszewicz *et al*., 2005; Quinn *et al*., 2004), activation of which suppressed paracellular passive Mg^{2+} transport (Ikari *et al*., 2008). Thus, omeprazole suppressed paracellular passive Mg^{2+} absorption probably due to luminal acidity disturbance-CaSR dependent mechanism (Thongon and Krishnamra, 2011).

Cldn is a ~24 members of the integral membrane protein of the tight junction which expressed in tissue specific characteristic (Furuse and Tsukita, 2006). Monomeric and

heteromeric combination of Cldn in each epithelium creates an unique paracellular channel for paracellular ion transport (Tang and Goodenough, 2003; Krause *et al*., 2008). Cldn-2 and -12 were reported as the paracellular channel of divalent cation (Fujita *et al*., 2008). In addition, paracellular Cldn-7 channel was highly permeable to Na^+, but not Cl^- (Alexandre *et al*., 2005). Our previous finding suggested that omeprazole inhibited paracellular Mg^{2+} and Na^+ channels (Thongon and Krishnamra, 2011). Therefore, omeprazole probably disturbs the expression and/or function of Cldn-2, -7, and -12, which highly expressed jejunum, ileum, and Caco-2 cells (Fujita *et al*., 2006; 2008). The present study aimed to identify the underlying mechanism of omeprazole-suppressed paracellular Mg^{2+} transport. We performed our experiment by using Caco-2 monolayer that accepted as a suitable intestinal model for studying Mg^{2+} transport (Ekmekcioglu *et al*., 2000; Thongon and Krishnamra, 2011).

Results

Omeprazole decreases passive Mg^{2+} transport acorss Caco-2 monolayers

Previous study reported the potent apoptotic effect of omeprazole (Capodicasa *et. al.,* 2008). Thus, cell viability assay was performed by incubated Caco-2 cell with the omeprazole concentration resemble to those found in human plasma, i.e., 200 and 400 ng/ml (Macek *et. al.,* 2007) as well as the supra-physiological concentration (600 ng/ml). As demonstrated in Figure 1A, neither 200, 400, nor 600 ng/ml omeprazole had cytotoxic effect on Caco-2 cells. The results of apical to basolateral Mg^{2+} transport and absolute Mg^{2+} permeability (P_{Mg}) of Caco-2 monolayers (Figure 1B, 1C) that performed in transwell transporting setup were comparable to those performed in modified Ussing chamber set up (Thongon and Krishmanra, 2011) and human intestinal absorption (Fine *et al*., 1991). Omeprazole significantly suppressed non-saturable passive Mg^{2+} transport in 20 (Figure 1D), 40 (Figure 1E), and 80 mmol/l (Figure 1F) Mg^{2+} concentration gradients. Therefore, the Mg^{2+} flux setup that used in present study was suitable for studying intestinal Mg^{2+} absorption.

The percent maximum of passive Mg^{2+} transport – apical Mg^{2+} concentration relationships of control and omeprazole treated group were compared (Figure 2A, 2B, 2C).

Omeprazole shifted the %maximun - apical Mg^{2+} concentration curves to the right. Omeprazole significantly increased the EC_{50} (35.54 ± 1.41 of 200 ng/ml, 39.39 ± 1.83 of 400 ng/ml, 39.74 ± 1.84 of 600 ng/ml) when compared with control group (30.54 ± 1.13) (Figure 2D). These results indicated that omeprazole decreased activity and efficiency of paracellular channel for passive Mg^{2+} absorption.

The effect of omeprazole on passive Ca^{2+} transport across Caco-2 monolayers also observed. The apical Ca^{2+} concentration - Ca^{2+} transport relationship was liner function (Y = (3.16 ± 0.14)X + (8.47 ± 5.34), r^2 = 0.94) (Figure 3A). In 20 (Figure 3B) and 40 mmol/l (Figure 3C) Ca^{2+} concentration gradients, omeprazole tend to, but not significant, decreased passive Ca^{2+} transport. Only 600 ng/ml omeprazole decreased passive Ca^{2+} transport in 80 mmol/l Ca^{2+} concentration gradients (Figure 3D). Indicating a lower inhibitory effect of omeprazole on passive Ca^{2+} transport than that on passive Mg^{2+} absorption.

Omeprazole disturbs apical acidity of Caco-2 monolayers

The luminal acidity modulated intestinal Mg^{2+} absorption (Heijnen *et al*., 1993). Therefore, the pH of apical culture media of control and omeprazole-treated monolayers were continually measured within 24h post refreshing culture media. In control condition, the apical pH significantly decreased from 8h to 24h post refreshing media (Figure 4A), demonstrated the apical acid secretion and accumulation. Omeprazole markedly increased apical pH in 16h (Figure 4B), 20h (Figure 4C), and 24h (Figure 4D) post refreshing media. Indicated that omeprazole suppressed apical acid secretion from Caco-2 monolayers.

Omeprazole decreases passive Mg^{2+} transport in CaSR independent mechanism

Since, increased in extracellular pH enhanced CaSR sensitivity (Doroszewicz *et al*., 2005; Quinn *et al*., 2004) and activation of CaSR decreased paracellular Mg^{2+} transport (Ikari *et al*., 2008), the involvement of CaSR activity on passive Mg^{2+} transport was studied by using the polycationic CaSR agonists neomycin and spermine (Sigma) (Ye *el. al.,* 1997). As demonstrated in Figure 4E, neither 100 μmol/l neomycin nor 300 μmol/l spermine affected passive Mg^{2+} transport in control and omeprazole-treated monolayers. Indicated that omeprazole suppressed passive Mg^{2+} transport in CaSR - independent mechanism.

Omeprazole suppresses Cldn-7 and -12 expression

It is widely accepted that paracellular Cldn channel regulates paracellular passive ion transport across transporting epithelium (Tang and Goodenough, 2003; Krause *et al*., 2008). Therefore, the expression of Cldn-2, -7, and -12 that highly expressed jejunum, ileum, and Caco-2 cells (Fujita *et al*., 2006; 2008) was studied. The results of immunoblot and densitometric analysis demonstrated that omeprazole sigmificantly suppressed Cldn-7 (Figure 5A, 5C) and Cldn-12 (Figure 5A, 5D), but not Cldn-2 (Figure 5A, 5B), expression of Caco-2 cells in concentration dependent manner. Omeprazole significantly increase TEER of Caco-2 monolayers (Figure 5E).

Apical acidity enhances passive Mg^{2+} transport and Cldn-7 and -12 expression

To study the effect of apical acidity on inteatinal Mg^{2+} absorption, Caco-2 monolayers were continually treated 2h-peroid 4 times a day with control or omeprazole-containing culture media pH 7.4, 7.0, 6.5, 6.0, and 5.5 (Figure 6A) form day 7 to day 14. In control condition, apical acidity significantly increased passive Mg^{2+} transport in 40 mmol/l Mg^{2+} concentration gradient (Figure 6B). The percent maximum of passive Mg^{2+} transport – apical Mg^{2+} concentration relationships of control condition with variation in apical pH was observed (Figure 6C). Apical ph 6.5 and 5.5 markedly shifted curve to the left (Figure 6C). Apical acidity decreased EC_{50} (28.32 $\pm$ 1.55 of pH 6.5 and 21.69 $\pm$ 1.80 of pH 5.5) when compared with pH 7.4 group (31.78 $\pm$ 1.11) (Figure 6D). In addition, apical acidity significantly increased Cldn-7 (Figure 6 E) and -12 (Figure 6F) expression in Caco-2 cells.

Apical acidity normalized omeprazole effect on Caco-2 monolayers

Since apical acidity enhanced passive Mg^{2+} transport and Cldn-7 and -12 expression in control monolayers, this experiment aimed to elucidate the effect of low apical pH on Mg^{2+} transport and Cldn expression in omeprazole exposed monolayers. Alike control condition, apical acidity markedly increased paracellular passive Mg^{2+} transport (40 mmol/l concentration gradient) of 200 (Figure 7A) and 400 ng/ml omeprazole (Figure 7D) treated monolayers. In 40 mmol/l Mg^{2+} concentration gradient, rate of passive Mg^{2+} transport of 200 ng/ml omeprazole-

treated monolayers pH 7.0 (118 ± 7.25, Figure 7A), 400 ng/ml omeprazole-treated monolayers pH 7.0 (116.60 ± 5.12, Figure 7D), and pH 6.5 (132.30 ± 6.01, Figure 7D) was not different from that of control monolayers pH 7.4 (132.20 ± 3.96, Figure 1E). Indicated that apical acidity normalized inhibitory effect of omeprzole on passive Mg^{2+} absorption. Apical acidity also shifted the dose-respond curve of 200 (Figure 7B) and 400 ng/ml omeprazole (Figure 7E) treated group to the left. The EC_{50} of of 200 (Figure 7C) and 400 ng/ml (Figure 7F) omeprazole treated monolayers also decreased according to the acidic condition. At apical pH 6.5, EC_{50} of 200 (30.99 ± 1.67, Figure 7B) and 400 ng/ml omeprazole (33.30 ± 1.99, Figure 7E) were similar to that of control monolayers pH 7.4 (Figure 6D). In addition to Mg^{2+} flux, apical acidity also normalized Cld-7 and -12 expression in 400 ng/ml omeprazole treated monolayers (Figure 8). These results indicated that apical acidity normalized inhibitory effect of omeprazole on passive Mg^{2+} transport and Cldn expression.

Discussion

PPI, a therapeutic tool for acid-related gastrointestinal diseases, binds and inhibits acid secretion form parietal cells of gastric mucosa that promotes mucosal ulcers and inflammation to heal. However, prolong PPI usage in chronic acid-gastric diseases led to hypocalcaemia and hypomagnesaemia probably due to intestinal wasting (Broeren *et al*., 2009; Cundy and Dissanayake, 2009; Epstein *et al*., 2006; Hoorn *et al*., 2010; Kuipers *et al*., 2009; Mackay and Bladon, 2010; Shabajee *et al*., 2008). While hypocalcaemia could restored by elemental Ca^{2+} supplement, hypomagnesaemia could normalized only by withdrawal of PPI (Epstein *et al*., 2006; Shabajee *et al*., 2008). In present study, we clearly showed a mainly inhibitory effect of omeprazole on passive Mg^{2+} absorption (Figure 1), but less on passive Ca^{2+} absorption (Figure 3). Therefore, omeprazole inhibited function of paracellular Mg^{2+} channel that created by Cldn in the tight junction (Simon *et al*., 1999; Tang and Goodenough, 2003). On the other hand, omeprazole probably inhibited active Ca^{2+} transport that cannot prove by the present technique.

Among all biological cation, Mg^{2+} is the most charge dense with high hydration energy about -1922 kj/mol *vs* -1592 kj/mol of Ca^{2+}. Therefore, Mg^{2+} tightly bound with 6 – 7 H_2O

molecules and has the highest hydration volume (Wolf and Cittadini, 2003; Wolf *et al*., 2003). In order to permeate transporting epithelium, Mg^{2+} must be recognized, interacted, and undergone partially or fully stripped bound hydration shell by its transporting protein (Moomaw and Maguire, 2008). The results of %maximum passive Mg^{2+} transport – Mg^{2+} concentration relationship demonstrated that omeprazole shifted curve to the right and increased EC_{50} (Figure 2), indicated the lower Mg^{2+} affinity of paracellular Mg^{2+} channel. In addition, an electrical field in parcellular pore mediated dehydration process and determined charge selectivity (Yu *et al*., 2009). Previously, omeprazole decreased negative electric field strength and cation selectivity of paracellular channel in Caco-2 monolayers (Thongon and Krishnamra, 2011). Moreover, the Arrhenius plot the higher activation energy for passive Mg^{2+} transport of omeprazole exposed monolayers (Thongon and Krishnamra, 2011). Therefore, omeprazole inhibited function of paracellular Mg^{2+} channel in intestinal epithelium by decreased Mg^{2+} affinity and disturbed dehydration process.

Electrostatic interactions in paracellular pore determined conductivity of ion transport through paracellular channel (Tang and Goodenough, 2003; Yu *et al*., 2009). Therefore, changing electrostatic interaction by lower apical pH markedly increased paracellular ion permeability (Tang and Goodenough, 2003). In gastro-intestinal tract, the luminal acidity exhibited throughout small intestine (Nugent *et al*., 2001) that required for passive Mg^{2+} absorption (Heijnen *et al*., 1993). In present study, %maximum passive Mg^{2+} transport – Mg^{2+} concentration curves were shifted to the left (Figure 6C) and EC_{50} was decreased (Figure 6D) by apical acidic condition (pH 7.0 – 5.5), which then enhanced paracellular passive Mg^{2+} absorption (Figure 6B). On the other hand, inhibition of proton pump in Caco-2 cells (Abrahamse *et al*., 1992) by omeprazole decreased apical acidity (Figure 4) and paracellular passive Mg^{2+} transport (Figure 1) across Caco-2 monolayers. Therefore, omeprazole inhibits acid-gastric secretion that disturbs luminal acidity and suppresses intestinal Mg^{2+} absorption. In long-term omeprazole usage, continually wasting of intestinal Mg^{2+} and releasing of Mg^{2+} pool gradually depletes Mg^{2+} store in the human body, which then redevelops hypomagnesaemia. However, the inhibitory effect of omeprazole on paracelluar passive Mg^{2+} transport, as well as Mg^{2+} affinity of paracellular channel, was normalized by physiological acidic condition (Figure 7).

Therefore, oral Mg^{2+} supplement using acid-containing capsule that releases Mg^{2+} and acid in distal small intestine probably resolves hypomagnesaemia in long-term omeprazole usage.

Extracellular CaSR expressed entire length of gastro-intestinal tract (Geibel and Hebert, 2009) and Caco-2 monolayers (Davies *et al*., 2008). CaSR plays a role in gastric acid secretion, intestinal fluid absorption and secretion, and colonic fluid secretion (Geibel and Hebert, 2009). In renal epithelium, CaSR activation suppressed paracellular passive Mg^{2} transport by controlling Cldn-16 function on tight junction (Ikari *et al*. 2008). In present study, CaSR gonist neomycin and apermine had no effect on passive Mg^{2+} transport in both control and omeprazole treated monolayers (Figure 4E). Our results agreed with previous study that showed a regulation of paracellular passive Ca^{2+} transport by extracellular Ca^{2+} in CaSR-independent mechanism (Davies *et al*., 2008). Therefore, omeprazole inhibited intestinal passive Mg^{2+} absorption in CaSR-independent mechanism.

Among 24 members of Cldn, Cldn-16 and -19 had been proposed as paracellular channel for Mg^{2+} channel (Simon *et al*., 1999; Hou *et al.,* 2009). However those Cldns were not detected along the intestinal tract (Fujita *et al*., 2006), suggesting that other Cldn regulated passive Mg^{2+} absorption. Since, omeprazole suppressed paracellular passive Mg^{2+} transport (Figure 1) and Cldn-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers (Figure 5), thus, monomeric or heteromeric combination of Cldn-7 and -12 contributed to intestinal paracellular Mg^{2+} absorption. Cldn contains 4 trans-membrane domains, 1 intracellular loop, and 2 extracellular loops (Krause *et al*., 2008). Paracellular channels are formed by extracellular loop 1 (ECL1), negative or positive amino acid residues of which determine charge selectivity (Yu *et al*., 2009). In ECL1, Cldn-7 contains two negatively charged residues (positions 38, and 53) and Cldn12 contains four negatively charged residues (positions 62, 66, 71 and 74) (Fujita et al., 2006), thus, both of which were paracellular cation transporting protein (Alexandre *et al*., 2005: Fujita *et al*., 2008).

Acid modulated Cldn expression had been reportd. In esophageal reflux model, vigorous apical acidity (pH 2) suppressed Cldn-4 expression in squamous epithelial (Oshima *et al*., 2012). Moreover, apical gastric acid exposure down-regulated Cldn-3 expression in the esophageal epithelium (Oguro, *et al*., 2011). Chronic metabolic acidosis (CMA) up-regulated

Cldn-2, -3, -6, -8, -11, -12, -14, -19 and -22 mRNA expression in duodenal enterocytes (Charoenphandhu *et al*., 2007). In bone lining cells, CMA suppressed Cldn-14 but increased Cldn-15 and -16 expression (Wongdee *et al*., 2010). In addition, CMA suppressed Cldn-2 expression in renal epithelium (Balkovetz *et al*., 2009), thus, acid modulated Cldn expression in tissue specific mechanism. In present study, apical acidity at physiological level (pH 6.5 and 5.5) up-regulated Cldn-7 and -12 expression in both control (Figure 6E, 6F) and omeprazole exposed epithelium (Figure 8). Since Cldn-7 and -12 were ion-permeable, luminal acidity regulated normal intestinal uptake of Mg^{2+} in Cldn-7 and -12 dependent mechanism.

Methods

Cell culture

Caco-2 cells (ATCC No. HTB-37) were grown as previously described (Thongon *et al*., 2008). For ion flux studies, the Caco-2 monolayers were developed by seeding cells (1.0×10^6 cells/cm^2) onto the permeable polyester Transwell-clear inserts (Corning, Corning, NY, USA) and maintain for 14 days. For western blot analysis, cells were plated (5.0×10^5 cells/well) on 6-well plate and maintain for 14 days. For MTT reduction assay, cells were seeded (1.0×10^4 cells/well) on 96-well plate (Corning) and maintain for 14 days. In the omeprazole-treated group, the monolayers were grown in media containing 200, 400, or 600, ng/ml omeprazole (Calbiochem, San Diego, CA, USA).

Measurement of Ca^{2+} and Mg^{2+} flux

Apical to basolateral paracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} fluxes studies were performed at a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37 ˚C. After removed the culture media, the apical and basolateral side of Caco-2 monolayers on transwell were added with apical and basolateral solution, respectively. At 1 and 2 hours, 500 µl solutions was collected from the basolateral side and subjected to measurement of Ca^{2+} or Mg^{2+} concentration. Fluxes and permeabilities of Ca^{2+} and Mg^{2+} across Caco-2 monolayers were calculated as previously described (Thongon and Krishnamra, 2011). The rate of Mg^{2+} transport – apical Mg^{2+} concenytayion relationship was

fitted with modified Michaelis-Menten equation plus linear component (Thongon and Krishnamra, 2011).

Bathing solution

For Ca^{2+} transport studies, the basolateral solution was (in mmol/l) 1 $MgCl_2$, 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 250 mannital, and 10 HEPES pH 7.4; the apical solution was (in mmol/l) 1 $MgCl_2$, 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine and 10 HEPES pH 7.4, containing either 2.5 $CaCl_2$ and 242 mannital, 5 $CaCl_2$ and 235 mannital, 10 $CaCl_2$ and 230 mannital, 20 $CaCl_2$ and 200 mannital, 40 $CaCl_2$ and 115 mannital, or 80 $CaCl_2$ and 90 mannital.

For Mg^{2+} transport studies, the basolateral solution was (in mmol/l) 1.25 $CaCl_2$, 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 250 D-mannital, and 10 HEPES pH 7.4; the apical solution was (in mmol/l) 2.5 $CaCl_2$, 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, and 10 HEPES pH 7.4, containing either 2.5 $MgCl_2$ and 242 mannital, 5 $MgCl_2$ and 235 mannital, 10 $MgCl_2$ and 230 mannital, 20 $MgCl_2$ and 200 mannital, 40 $MgCl_2$ and 115 mannital, or 80 $MgCl_2$ and 90 mannital.

For Ca^{2+}-Mg^{2+} transport studies, the basolateral solution was (in mmol/l) 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 260 D-mannital, and 10 HEPES pH 7.4; the apical solution was (in mmol/l) 20 $MgCl_2$, 20 $CaCl_2$, 4.5 KCl, 12 D-glucose, 2.5 L-glutamine, 10 HEPES pH 7.4, and 115 D-mannital.

All solutions were gassed with 5% CO_2 in 95% O_2 30 min prior to use and maintained at 37°C and had an osmolality of 290–295 mmol/kg H_2O. In pH dependent ion flux studies, HEPES pH 7.4 of apical solution was substituted with same concentration of HEPES pH 7.0, HEPES pH 6.5, HEPES pH 6.0, or HEPES pH 5.5. All chemicals were purchased from sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Measurement of Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration

Mg^{2+} concentration was determined by Xylidyl Blue colorimetric assay (pH 10.5) as previously described (Thongon and Krishnamra, 2011). Ca^{2+} concentration was determined by Arsenazo III colorimetric assay (pH 6.5) according to method of Tang and Goodenough (2003). All chemicals were purchased from sigma.

MTT reduction assay

Caco-2 cells were washed with PBS and treated with 1 mg/ml MTT solution (sigma) for 3 hours in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37 ˚C. Formazan crystal in the cells were solubilized with DMSO and subjected to clorimetric analysis using multi-mode microplate reader at 540 nM (BioTek Instruments, Inc)

Trans-epithelial electrical resistance

Trans-epithelial electrical resistance (TEER) was determine as previously described (Thongon *et al.*, 2008)

Western blot analysis

Caco-2 cells were lysed in RIPA buffer (Sigma) with gentle shook (seesaw mode) for 20 min at 4 ˚C. After scraped cells with Cell Scraper (Corning), lysates were sonicated, centrifuged at 12,000 g for 15 min, and then heated for 5 min at 95℃. Proteins (60 μg) or Cruz Marker™ Molecular Weight Standards were loaded and separated on 12.5% SDS-PAGE gel, then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Amersham, Buckinghamshire,UK). Membranes were blocked with 5% nonfat milk overnight at 4℃ and probed overnight at 4℃ with 1:500 rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) raised against human claudin-2, -7, -12. Membranes were also reprobed with 1:5,000 anti-β-actin monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology). After 2 hours incubation at 25℃ with 1:5,000 HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology), blots were visualized by Pierce ECL western blotting substrate (Thermo Scientific Pierce Protein Research, Rockford, USA) and captured on Hyperfilm™ (Amersham). Densitometric analysis was performed using ImageJ for Mac Os X (Rasband, 1997 - 2011).

Statistical analysis

Results were expressed as means ± SE. Two sets of data were compared using the unpaired Student's *t*-test. One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's posttest was employed for multiple sets of data. Linear regression was performed to obtain the passive Ca^{2+} transport – apical Ca^{2+} concentration relationship. Non-linear regression was performed to elucidate the %maximum - apical Mg^{2+} concentration relationship. The curve of P_{Mg}-

Δmagnesium relationship was obtained using one phase exponential decay equation. The level of significance was $P < 0.05$. All data were analyzed by GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.)

Acknowledgements

This study was supported by Thailand Research Fund and Higher Education Commission (No. MRG5380003) and Higher Education Commission (No.44495) to N. Thongon. We thank Dr. Siriporn Chamniansawat, Ms. Penpisut Boonthongthalerng, Mr. Phongthong Kunfai, and Ms. Onchuda Koobkratok of the Facuty of Allied Health Sciences, Burapha University for their technical assistance.

References

Abrahamse SL, Bindels RJ, van Os CH. The colon carcinoma cell line Caco-2 contains an H^+/K^+–ATPase that contributes to intracellular pH regulation. Pflügers Arch 1992;421:591–597.

Alexandre MD, Lu Q, Chen YH. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl- conductance and increases the paracellular Na^+ conductance in LLC-PK1 cells. J Cell Sci 2005;118:2683–2693.

Balkovetz DF, Chumley P, Amlal H. Downregulation of claudin-2 expression in renal epithelial cells by metabolic acidosis. Am J Physiol Renal Physiol 2009;297:F604-F611.

Broeren MA, Geerdink EA, Vader HL, van den Wall Bake AW. Hypomagnesemia induced by several proton-pump inhibitors. Ann Intern Med 2009;151:755-756.

Capodicasa E, Cornacchione P, Natalini B, Bartoli A, Coaccioli S, Marconi P, Scaringi L. Omeprazole induces apoptosis in normal human polymorphonuclear leucocytes. Int J Immunopathol Pharmacol 2008;21:73-85.

Charoenphandhu N, Wongdee K, Tudpor K, Pandaranandaka J, Krishnamra N. Chronic metabolic acidosis upregulated claudin mRNA expression in the duodenal enterocytes of female rats. Life Sci 2007;80:1729-1737.

Cundy T, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. Clin Endocrinol (Oxf) 2008;69:338–341.

Davies SL, Gibbons CE, Steward MC, Ward DT. Extracellular calcium- and magnesium-mediated regulation of passive calcium transport across Caco-2 monolayers. Biochim Biophys Acta 2008; 1778:2318-2324.

Doroszewicz J, Walderger P, Jeck N, Seyberth H, Waldegger S. pH dependence of extracellular calcium sensing receptor activity determined by a novel technique. Kidney Int 2005;67:187-192.

Ekmekcioglu C, Ekmekcioglu A, Marktl W. Magnesium transport from aqueous solutions across Caco-2 cells--an experimental model for intestinal bioavailability studies. Physiological considerations and recommendations. Magnes Res. 2000;13:93-102.

Epstein M, McGrath S, Law F. Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. N Engl J Med 2006;355:1834-1836.

Fine KD, Ana CAS, Porter JL, Fordtran JS. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. J Clin Invest 1991;88:396–402.

Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, Kojima T, Yamashita T, Sawada N. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. J Histochem Cytochem 2006;54:933-944.

Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca^{2+} absorption between enterocytes. Mol Biol Cell 2008;19:1912–1921.

Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. Trends Cell Biol 2006;16:181-188.

Geibel JP, Hebert SC. The functions and roles of the extracellular Ca^{2+}-sensing receptor along the gastrointestinal tract. Ann Rev Physiol 2009;71:20.1–20.13.

Heijnen AM, Brink EJ, Lemmens AG, Beynen AC. Ileal pH and apparent absorption of magnesium in rats fed on diets containing either lactose or lactulose. Br J Nutr 1993;70(3):747–756.

Hoorn EJ, van der Hoek J, de Man RA, Kuipers EJ, Bolwerk C, Zietse R. A case series of proton pump inhibitor-induced hypomagnesemia. Am J Kidney Dis 2010;56:112–116.

Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(36):15350-15355.

Ikari A, Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M. Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. Biochim Biophys Acta 2008;1778: 283-290.

Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. Am J Physiol Renal Physiol 2004;286:F599-F605.

Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. Biochim Biophys Acta 2008;1778: 631-645.

Kuipers MT, Thang HD, Arntzenius AB. Hypomagnesaemia due to use of proton pump inhibitors--a review. Neth J Med 2009;67:169–172.

Macek J, Klíma J, Ptácek P. Rapid determination of omeprazole in human plasma by protein precipitation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007;852:282-287.

Mackay JD, Bladon PT. Hypomagnesaemia due to proton-pump inhibitor therapy: a clinical case series. QJM 2010;103(6):387-395.

McCarthy JM, Kumar R (1999). Divalent cation metabilism: Magnesium, In: Glassock RJ, Cohen AH, Grunfeld JP (Eds). The Schrier Atlas of Diseases of the Kidney. (pp 4.1-4.12). Philadaphia: Current Medicine Inc.

Moomaw AS, Maguire ME. The unique nature of Mg^{+} channels. Physiology 2008;23:275-285.

Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. Gut 2001;48:571-577.

Oguro M, Koike M, Ueno T, Asaoka D, Mori H, Nagahara A, Uchiyama Y, Watanabe S. Dissociation and dispersion of claudin-3 from the tight junction could be one of the most sensitive indicators of reflux esophagitis in a rat model of the disease. J Gastroenterol 2011;46:629-638.

Oshima T, Koseki J, Chen X, Matsumoto T, Miwa H. Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. Lab Invest 2012;92: 22-31.

Quamme GA. Recent developments in intestinal magnesium absorption. Curr Opin Gastroenterol 2008;24:230-235.

Quinn SJ, Bai M, Brown EM. pH Sensing by the Calcium-sensing Receptor. J Biol Chem 2004;279:37241-37249.

Rasband WS. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/,1997-2011.

Shabajee N, Lamb EJ, Sturgess I, Sumathipala RW. Omeprazole and refractory hypomagnesaemia. BMJ 2008;337:a425.

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Prega M, Casari G, Bettiniel A, Colussi G, Rodiguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. Science 1999;285:103-106.

Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. Biophys J. 2003; 84:1660-1673.

Thongon N, Nakkrasae LI, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways. Am J Physiol Cell Physiol 2008;294: C1158-1C168.

Thongon N, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. World J Gastroenterol 2011;17:1574-1583.

Wolf FI, Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium. Mol Aspects Med 2003;24:3-9.

Wolf FI, Torsello A, Fasanella S, Cittadini A. Cell physiology of magnesium. Mol Aspects Med 2003;24:11-26.

Wongdee K, Riengrojpitak S, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Claudin expression in the bone-lining cells of female rats exposed to long-standing acidemia. Exp Mol Pathol. 2010;88:305-310

Ye C, Ho-Pao CL, Kanazirska M, Quinn S, Seidman CE, Seidman JG, Brown EM, Vassilev PM. Deficient cation channel regulation in neurons from mice with targeted disruption of the extracellular Ca^{2+}- sensing receptor gene. Brain Res Bull 1997;44:75-84.

Yu ASL, Cheng MH, Angelow S, Gunzel D, Kanzawa SA, Scheeberger EE, Fromm M, Coalson RD. Molecular basis for cation selectivity in claudin-2 base paracellular pore: Identification of electrostatic site. J Gen Physiol 2009;133:111-127.

Figures legends

Figure 1. Omeprazole suppressed passive Mg^{2+} transport across Caco-2 monolayers. Relative cell viability of omeprazole – treated cells (A). Apical to basolateral Mg^{2+} transport of control monolayers (B). Light solid lines represent the saturable active component. Dash lines represent the non-saturable passive component. Paracelluar P_{Mg} of control monolayers (C). Δ represent Mg^{2+} concentration gradient of apical and basolateral solution. Paracellular passive Mg^{2+} transport under 20 (D), 40 (E), or 80 (F) mmol/l Mg^{2+} concentration gradient. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ *vs* control group. For each data point, $n = 6$.

Figure 2. Omeprazole decreased Mg^{2+} affinity of paracellular channel. %maximum passive Mg^{2+} transport – Mg^{2+} concentration curve of control and 200 (A), 400 (B), or 600 (C) ng/ml omeprazole exposure monolayers. EC_{50} of dose – respond curve of control and omeprazole trated monolayers. $***P < 0.001$ *vs* control group. For each data point, $n = 6$.

Figure 3. Omeprazole has no effect on paracellular passive Ca^{2+} transport across Caco-2 monolayers. Passive Ca^{2+} transport of control monolayers (A). Paracellular passive Ca^{2+} transport under 20 (B), 40 (C), or 80 (D) mmol/l Ca^{2+} concentration gradient. $*P < 0.05$ *vs* control group. For each data point, $n = 10$.

Figure 4. Omeprazole disturbs apical acidic accumulation of Caco-2 monolayers. Apical pH at varies time after refreshing media of 14d control cells (A). Apical pH of contol and omeprazole exposed Caco-2 cells at 16h (B), 20h (C), and 24h (D) after refreshing media. Passive Mg^{2+} transport (40 mmol/l concentration gradient) of control and omeprazole-treated groups that incubated with CaSR agonist neomycin or spermine (E). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ *vs* control group. For each data point, $n = 6$.

Figure 5. Omeprazole decreases Cldn-7 and -12 expression. The quantitative immunobloting analysis of Cldn-2, -7 , and -12 in control and omeprazole exposed cells (A). Representative densitometric analysis of Cldn-2 (B), -7 (C), and -12 expression in control and omeprazole

exposed cells. Trans-epithelial electric resistant of control and omeprazole exposed monolayers (E). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$ *vs* control group. For each data point, $n = 5$

Figure 6. Apical acidity enhances passive Mg^{2+} absorption and Cld-7 and -12 expression. Representative time line for apical acidic meadia treatment (A). Passive Mg^{2+} transport (40 mmol/l concentration gradient) of control and omeprazole-treated monolayers (B). %maximum passive Mg^{2+} transport – Mg^{2+} concentration curve at pH 7.4, 6.5, and 5.5 of control monolayers (C). EC_{50} of dose – respond curve at pH 7.4, 6.5, and 5.5 of control monolayers (D). For each data point, $n = 6$. Immunobloting and densitometric analysis of Cldn-7 (E) and -12 (F). For each data point, $n = 5$. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$ *vs* control group (n = 5)

Figure 7. Apical acidity decreases omeprazole effect on passive Mg^{2+} absorption. Passive Mg^{2+} transport (40 mmol/l concentration gradient) in varies apical pH of 200 (A) or 400 ng/ml omeprazole exposed monolayers (D). %maximum passive Mg^{2+} transport – Mg^{2+} concentration curve at pH 7.4, 6.5, and 5.5 of 200 (B) or 400 ng/ml omeprazole exposed monolayers (E). EC_{50} of dose – respond curve at pH 7.4, 6.5, and 5.5 of 200 (C) or 400 ng/ml omeprazole exposed monolayers (F). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$ *vs* control group. For each data point, $n = 6$.

Figure 8. Apical acidity decreases omeprazole effect on Cldn-7 and -12 expression. Immunobloting and densitometric analysis of Cldn-7 (A) and -12 (B) of control and 400 ng/ml omeprazole exposed cells. ***$P < 0.001$ *vs* control group, $n = 5$.

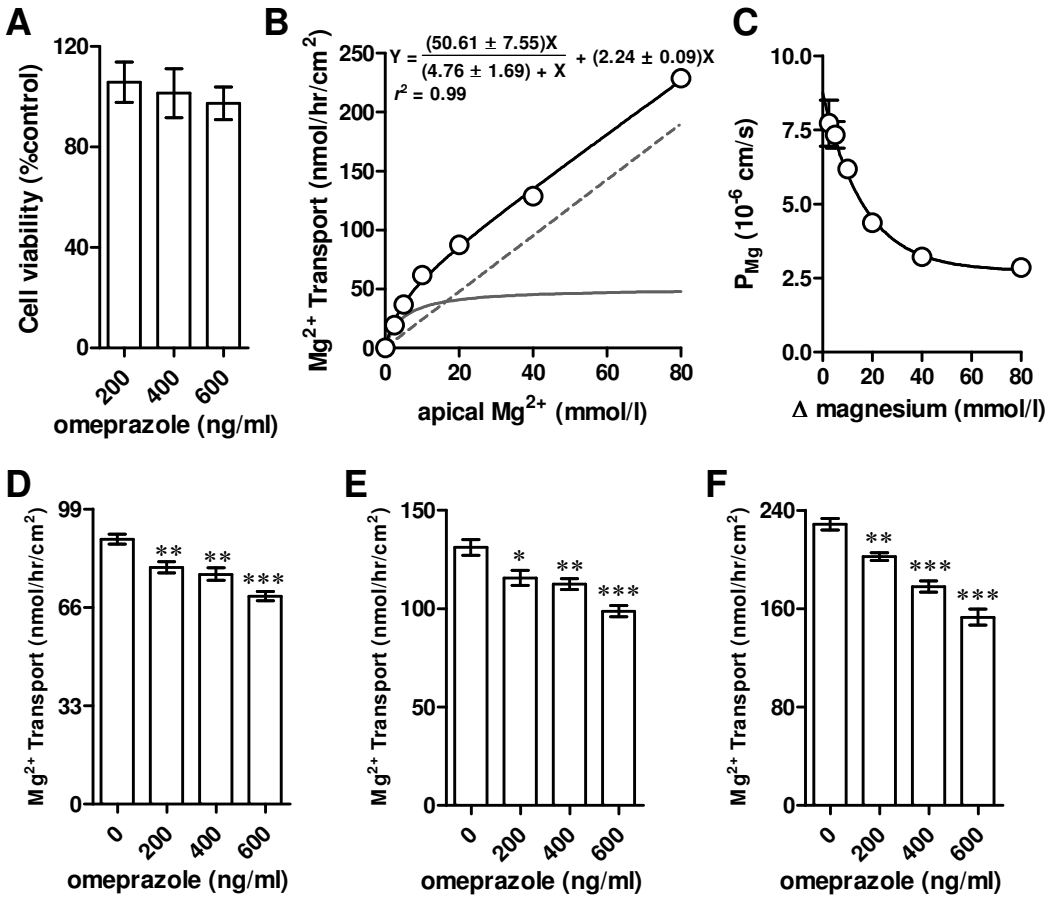

A
Cell viability (%control)
120
80
40
0
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
B
Mg2+ Transport (nmol/hr/cm2)
Y = (50.61 ± 7.55)X / (4.76 ± 1.69) + X + (2.24 ± 0.09)X
r2 = 0.99
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
apical Mg2+ (mmol/l)
C
PMg (10-6 cm/s)
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
0
20
40
60
80
Δ magnesium (mmol/l)
D
Mg2+ Transport (nmol/hr/cm2)
99
66
33
0
**
**
***
0
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
E
Mg2+ Transport (nmol/hr/cm2)
150
100
50
0
*
**
***
0
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
F
Mg2+ Transport (nmol/hr/cm2)
240
160
80
0
**
***
***
0
200
400
600
omeprazole (ng/ml)

Figure 1

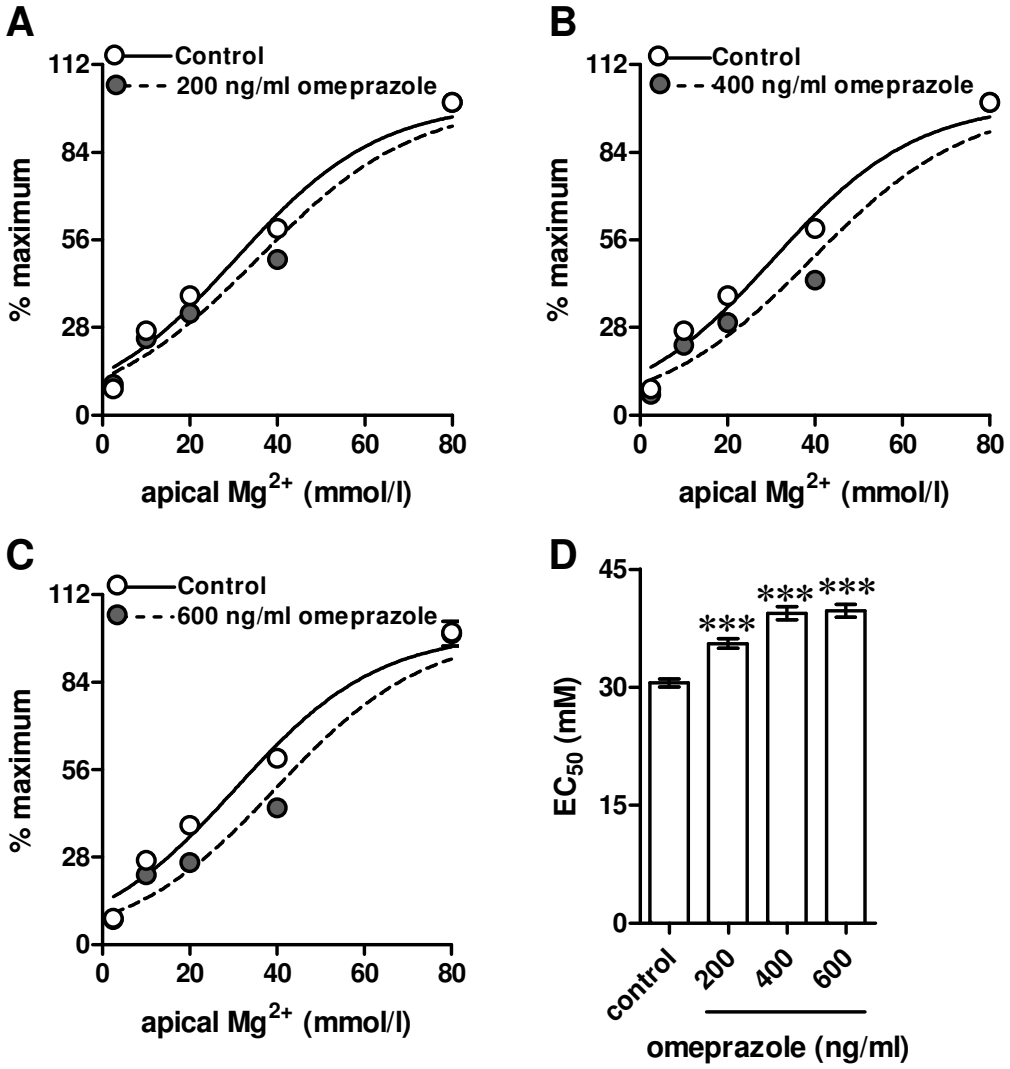

A
Control
200 ng/ml omeprazole
% maximum
apical Mg2+ (mmol/l)
B
Control
400 ng/ml omeprazole
% maximum
apical Mg2+ (mmol/l)
C
Control
600 ng/ml omeprazole
% maximum
apical Mg2+ (mmol/l)
D
EC50 (mM)
***
***
***
control
200
400
600
omeprazole (ng/ml)

Figure 2

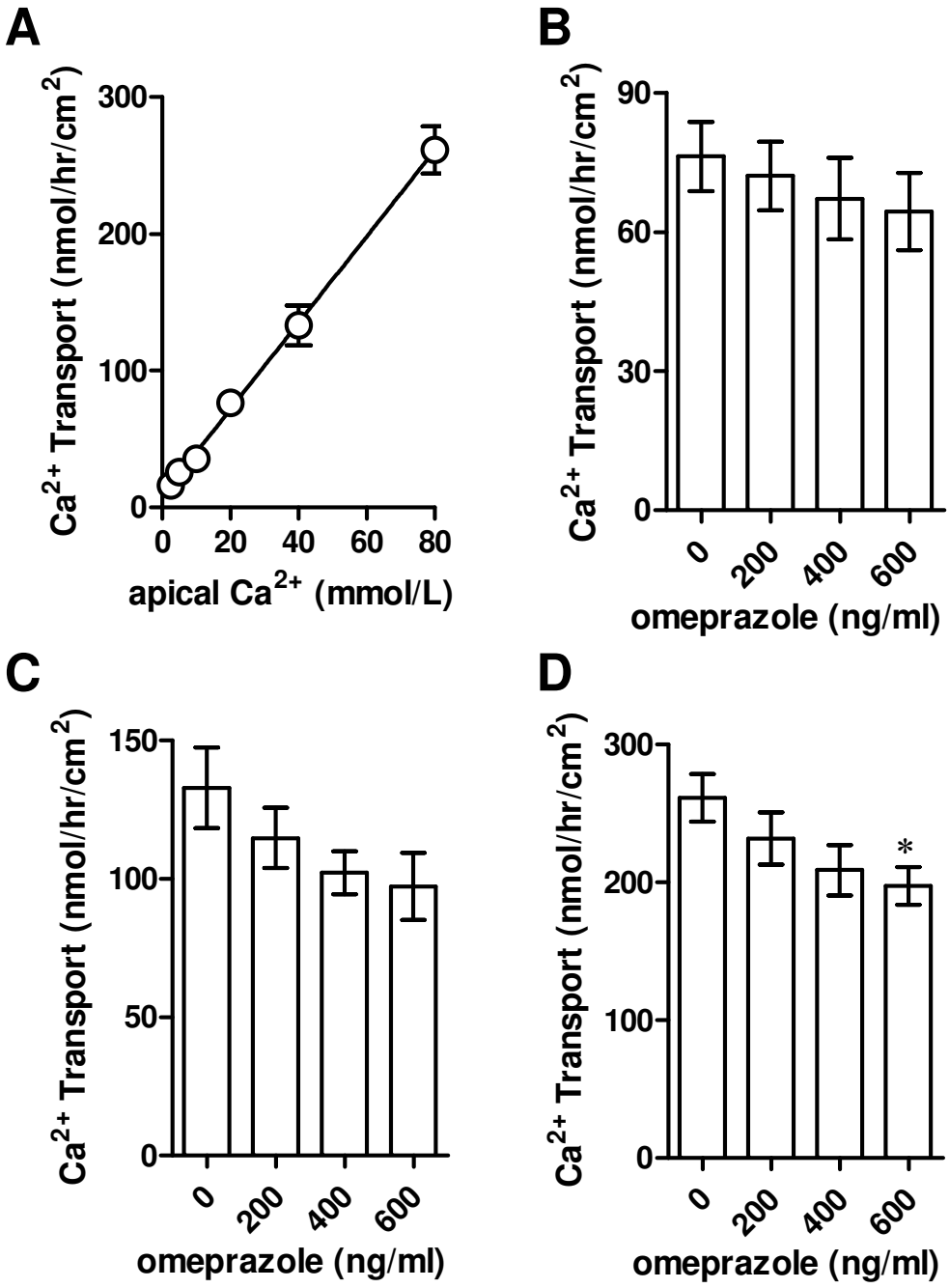

A
Ca2+ Transport (nmol/hr/cm2)
300
200
100
0
0
20
40
60
80
apical Ca2+ (mmol/L)
B
Ca2+ Transport (nmol/hr/cm2)
90
60
30
0
0
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
C
Ca2+ Transport (nmol/hr/cm2)
150
100
50
0
0
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
D
Ca2+ Transport (nmol/hr/cm2)
300
200
100
0
*
0
200
400
600
omeprazole (ng/ml)

Figure 3

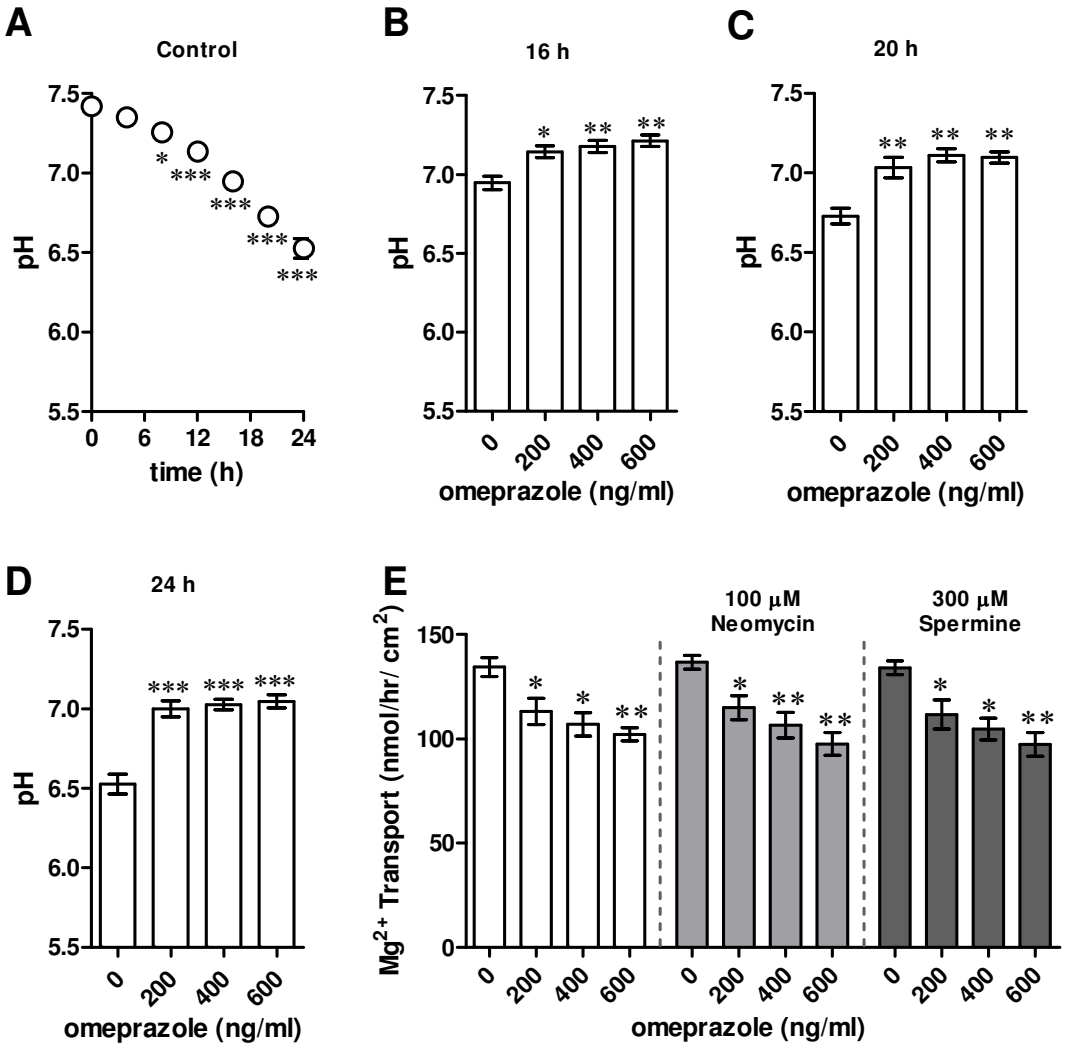

A
Control
pH
time (h)
B
16 h
pH
omeprazole (ng/ml)
C
20 h
pH
omeprazole (ng/ml)
D
24 h
pH
omeprazole (ng/ml)
E
100 μM
Neomycin
300 μM
Spermine
Mg2+ Transport (nmol/hr/ cm2)
omeprazole (ng/ml)

Figure 4

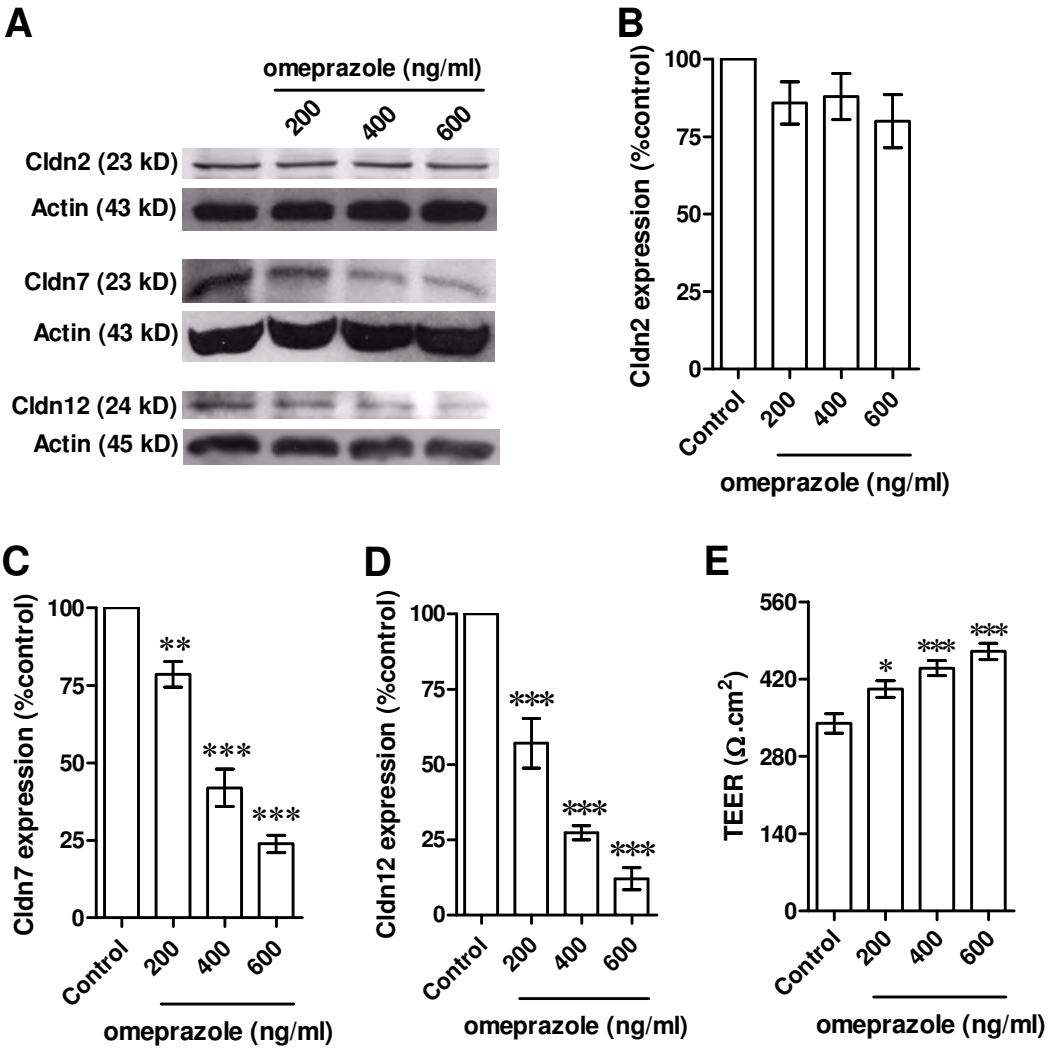

A
omeprazole (ng/ml)
200
400
600
Cldn2 (23 kD)
Actin (43 kD)
Cldn7 (23 kD)
Actin (43 kD)
Cldn12 (24 kD)
Actin (45 kD)
B
Cldn2 expression (%control)
100
75
50
25
0
Control
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
C
Cldn7 expression (%control)
100
75
50
25
0
**
***
***
Control
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
D
Cldn12 expression (%control)
100
75
50
25
0
***
***
***
Control
200
400
600
omeprazole (ng/ml)
E
TEER (Ω.cm2)
560
420
280
140
0
*
***
***
Control
200
400
600
omeprazole (ng/ml)

Figure 5

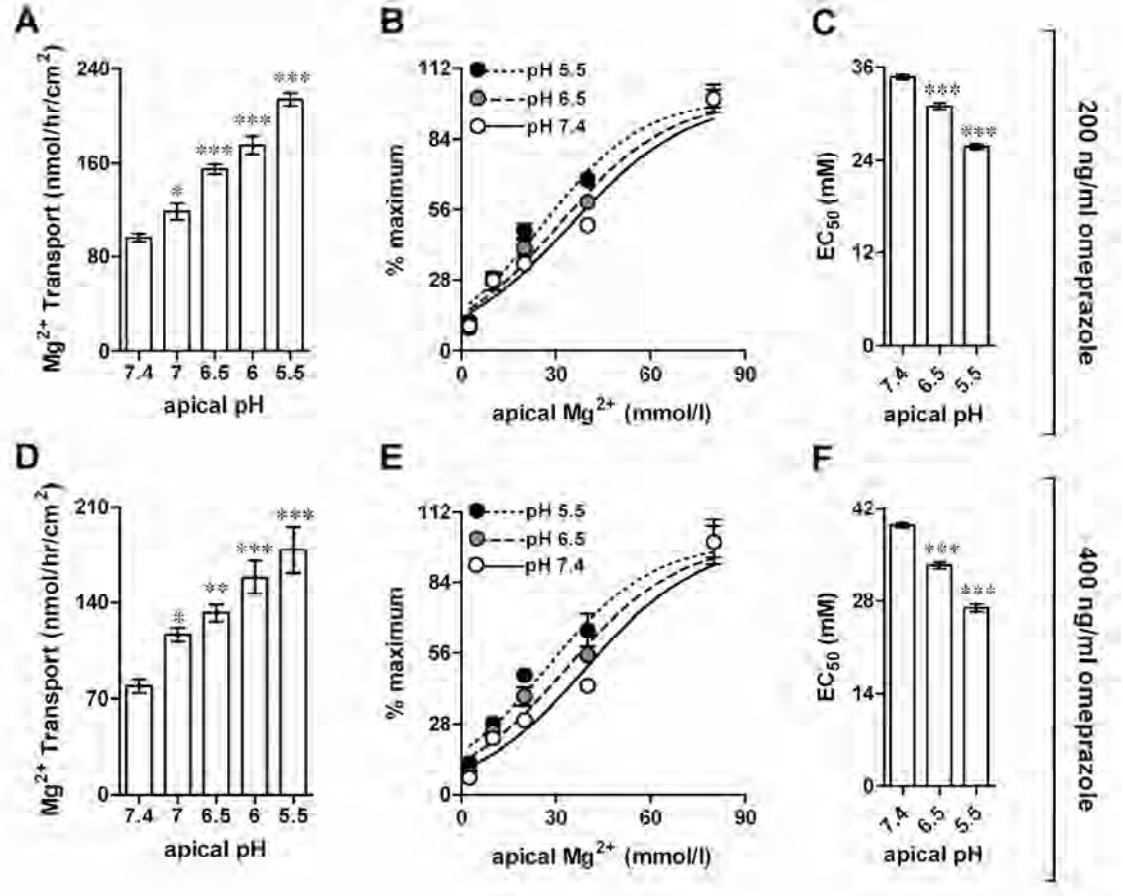

A
B
C
D
E
F
Mg^{2+} Transport (nmol/hr/cm^2)
apical pH
7.4
7
6.5
6
5.5
% maximum
apical Mg^{2+} (mmol/l)
pH 5.5
pH 6.5
pH 7.4
EC_{50} (mM)
200 ng/ml omeprazole
400 ng/ml omeprazole

Figure 7

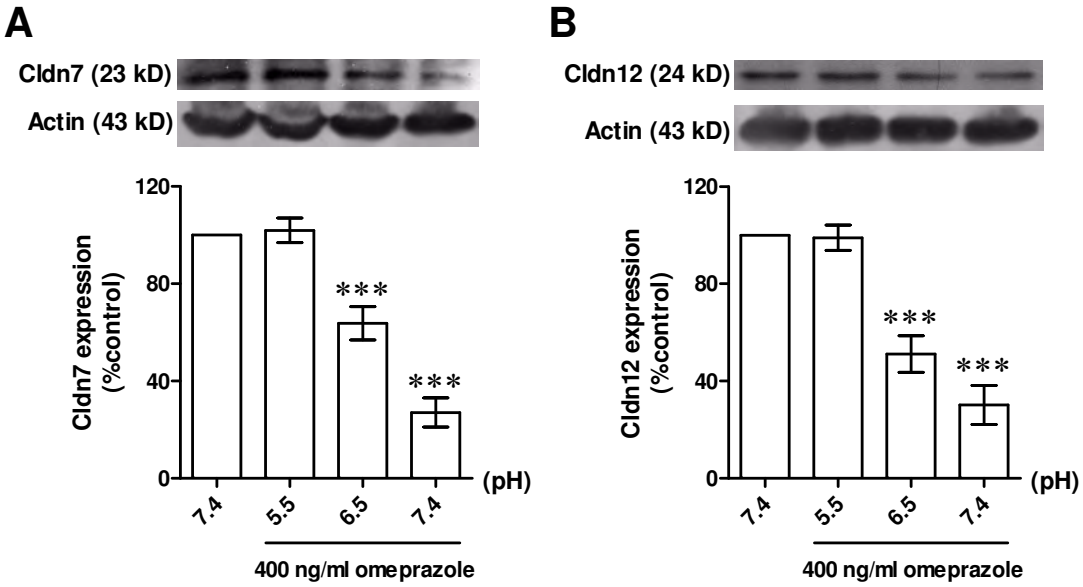

A
Cldn7 (23 kD)
Actin (43 kD)
Cldn7 expression (%control)
120
80
40
0
***
***
7.4
5.5
6.5
7.4
(pH)
400 ng/ml omeprazole
B
Cldn12 (24 kD)
Actin (43 kD)
Cldn12 expression (%control)
120
80
40
0
***
***
7.4
5.5
6.5
7.4
(pH)
400 ng/ml omeprazole

Figure 8