

ผลของสิ่งสกัดแอลกอฮอล์ของ *P. palatiferum* และ β -sitosterol กับ CYP3A4 ในเซลล์ตับมนุษย์
เพาะเลี้ยง HepG2

นางสาวกรรรัตน์ รัตนวัฒนาธร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECT OF ALCOHOLIC EXTRACT OF *PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* (NEES)
RADLK AND β -SITOSTEROL ON CYP3A4 IN HUMAN HEPATOMA HEPG2 CELL

Miss Kornrat Rattanawattanathorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสิ่งสกัดแอลกอฮอล์ของ *P. palatiferum* และ β -sitosterol กับ CYP3A4 ในเซลล์ตับมนุษย์เพาะเลี้ยง HepG2

โดย

นางสาวกรรรัตน์ รัตนวัฒนาธร

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวีรัตน์ พรธาดาวิทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบุญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรี ลิ้มปณิธิกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวีรัตน์ พรธาดาวิทย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง พันตำรวจโทหญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรา วัฒนพิทยกุล)

กรรรัตน รัตนวัฒนาภร : ผลของสิ่งสกัดแอลกอฮอล์ของ *P. palatiferum* และ β -sitosterol กับ CYP3A4 ในเซลล์ตับมนุษย์เพาะเลี้ยงHepG2. (EFFECT OF ALCOHOLIC EXTRACT OF *PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* (NEES) RADLK AND β -SITOSTEROL ON CYP4503A4 IN HUMAN HEPATOMA HEPG2 CELL) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. สุวีรัตน์ พรธาดาวิทย์, 96 หน้า

Pseuderanthemum palatiferum หรือว่านพญาวัน เป็นสมุนไพรที่นิยมนำมารักษาโรคต่างๆ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพรเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจาก CYP3A4 เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยาหลายชนิด วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาในเชิงปริมาณของ CYP3A4 โดยตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์, ระดับโปรตีนและการแสดงออกของ mRNA ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งสกัดและสาร β -sitosterol ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1-100 μ g/ml และสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.1-1 μ M ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน ทำการทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4 ด้วยชุด P450-Glo assay ใน เซลล์ที่ทดสอบด้วยสิ่งสกัดและสาร β -sitosterol พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทดสอบการแสดงออกของ mRNA CYP3A4 ด้วยวิธี real time-PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะ และตรวจปริมาณโปรตีนด้วยวิธี western blot เมื่อทดสอบเซลล์กับสิ่งสกัดและหรือ β -sitosterol เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA เพิ่มขึ้น และลดลงเมื่อทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหลังจากทดสอบสารเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง เมื่อเทียบปริมาณโปรตีน CYP3A4 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสิ่งสกัดและสาร β -sitosterol นั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน จากการศึกษาสรุปได้ว่า การให้สิ่งสกัดอาจทำให้เกิดการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA เพิ่มขึ้นในช่วงแรกและเกิดการยับยั้งเมื่อได้รับเป็นเวลานาน พบว่ามีความสอดคล้องกันระหว่างปริมาณโปรตีนและสมรรถนะของ CYP3A4 เมื่อทดสอบที่เวลาเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ไม่มีความสอดคล้องกันระหว่างการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA และสมรรถนะของเอนไซม์ รวมถึงปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น

สาขาวิชา เกษษัตริย์วิทยา ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5287101720 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : CYP3A4 / HEPG2 CELLS / *PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* (NEES)
RADLK / β -SITOSTEROL

KORNRAT RATTANAWATTANATHORN: EFFECT OF ALCOHOLIC EXTRACT OF
PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM (NEES) RADLK AND β -SITOSTEROL ON CYP3A4
IN HUMAN HEPATOMA HEPG2 CELL. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPATRA
SRICHAIRAT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUREERUT PORNTADAVITY, Ph.D.,
96 pp.

Pseuderanthemum palatiferum or Hoan-Ngoc is widely used as traditional medicine for treatment of many chronic diseases. Interaction between herbs and drugs used concomitantly is of great interest. As CYP3A4 is responsible for most of drug metabolism, this study was aimed to investigate the quantification of CYP3A4 by investigating its metabolic activity, protein level and mRNA expression. The cytotoxicity of the alcoholic extract of *P. palatiferum* and β -sitosterol were determined by MTT assay. 0.1-100 μ g/ml of the extract and 0.1-1 μ M β -sitosterol did not toxic to cells after 24, 48 and 72 hr of incubation. Compared to the solvent group at the same period of incubation, the HepG2 cell treated with the extract or β -sitosterol did not cause a significant difference in CYP3A4 metabolic activity determined by using P450-Glo assay. Expression of CYP3A4 mRNA was determined by real time-PCR with its primer specific and western blot analysis was used to assess the level of CYP3A4 protein. It was shown that incubation of cells in the presence of the extract or β -sitosterol for 12 hr resulted in a significant increase in CYP3A4 mRNA. After 24 hr of incubation, the observed CYP3A4 mRNA of the treated groups were decreased. The results showed that after 24-72 hr of incubation, protein level of CYP3A4 were not differentially expressed between the extract and β -sitosterol treated groups and their control groups. In conclusion, these finding suggested that administration of the extract may result in initial induction CYP3A4 mRNA expression followed by mild inhibition with prolonged administration. At the same time of incubation, the protein level of CYP3A4 was correlated with its metabolic activity. However, there is no correlation between CYP3A4 mRNA expression and its activity as well as the protein level.

Field of Study: ...Pharmacology..... Student's Signature

Academic Year: 2011..... Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรรัตน์ พรรธนาวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำและปรึกษาปัญหาต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้จนสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เกษัษฐกร ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการสกัดสารเพื่อใช้ในการทดลองในครั้งนี้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา ที่กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำ HPLC

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิร ลิมปนสิทธิกุล ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ เกษัษฐกรหญิง พันตำรวจโทหญิง ดร. สมทรง ลาวัณย์ ประเสริฐ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวรา วัฒนพิทยกุล ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบทุกท่านที่กรุณาสละเวลาและให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการเอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับทำการวิจัย และขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตและขอขอบพระคุณผู้เกี่ยวข้องที่มีได้เอื้อนามไว้ในที่นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 <i>P. palatiferum</i>	4
2.2 Apigenin.....	9
2.3 Kaempferol.....	10
2.4 β -sitosterol.....	11
2.5 กระบวนการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอม.....	13
2.6 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา.....	20
2.7 อันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพร.....	26
2.8 การศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยา.....	28
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	30
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	33

บทที่	หน้า
3.2.1 การเตรียมสิ่งสกัด.....	33
3.2.2 การตรวจสอบคุณสมบัติของสิ่งสกัด.....	33
3.2.2.1 การหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก.....	33
3.2.2.2 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	34
3.2.2.3 การหาปริมาณสาร β -sitosterol ในสิ่งสกัดด้วยเครื่อง GC.....	34
3.2.2.4 การทำ Fingerprint ของสารสกัด ด้วยเครื่อง HPLC.....	35
3.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบ.....	36
3.2.4 การทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4.....	37
3.2.5 การหาปริมาณ CYP3A4 mRNA โดยวิธี Real time-PCR.....	38
3.2.6 การหาปริมาณโปรตีน CYP3A4 โดยวิธี Western blot analysis.....	39
3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ.....	40
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	41
4.1 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของสิ่งสกัด.....	41
4.1.1 ผลการหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก.....	41
4.1.2 ผลการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	42
4.1.3 ผลการหาปริมาณสาร β -sitosterol ในสิ่งสกัดด้วยเครื่อง GC.....	43
4.1.4 ผลการทำ Fingerprint ของสารสกัด ด้วยเครื่อง HPLC.....	44
4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบ.....	45
4.3 ผลการทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4.....	49
4.4 ผลการหาปริมาณ CYP3A4 mRNA โดยวิธี Real time-PCR.....	51
4.5 ผล การหาปริมาณโปรตีน CYP3A4 โดยวิธี Western blot analysis.....	53
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	56
รายการอ้างอิง.....	61
ภาคผนวก.....	73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แฟมิลี CYP ของมนุษย์และหน้าที่หลัก.....	16
2 ยาที่มีผลทำให้เกิดอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้องกับ เอนไซม์ CYP3A4.....	18
3 สารที่เป็นซับสเตรทของ CYP3A4.....	19
4 อันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรรและยาแผนปัจจุบัน.....	27
5 แสดงลำดับเบสของ CYP3A4 และ Beta-actin primer.....	39
6 ปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสิ่งสกัด.....	41
7 ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสิ่งสกัด.....	42
8 ปริมาณของสาร β -sitosterol ในสารละลายสิ่งสกัด.....	43
9 ผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	84
10 ผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	85
11 ผลของสาร dexamethasone ต่อสมรรถนะของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	87
12 ผลของสิ่งสกัดต่อสมรรถนะของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	88
13 ผลของสาร β -sitosterol ต่อสมรรถนะของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	89
14 ผลของสาร dexamethasone ต่อการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง.....	92
15 ผลของสิ่งสกัดต่อการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง.....	93
16 ผลของสาร β -sitosterol ต่อการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง.....	93
17 ผลของสาร dexamethasone ต่อปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ที่ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	94
18 ผลของสิ่งสกัดต่อปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	94
19 ผลของสาร β -sitosterol ต่อปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	95

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 <i>P. palatiferum</i>	4
2 โครงสร้างของ Apigenin.....	9
3 โครงสร้างของ kaempferol.....	10
4 โครงสร้างของ β -sitosterol.....	11
5 เส้นทางที่ยาเปลี่ยนแปลงภายในร่างกาย.....	14
6 โครงสร้าง x-ray ของ CYP.....	15
7 เส้นทางกำจัดยาของยา 200 ตัว ที่นิยมใช้ในโอสถภายในปี 2002.....	17
8 การเหนี่ยวนำ CYP.....	21
9 การจับกันระหว่างยาและการกระตุ้น PXR ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ CYP3A4.....	22
10 ประเภทของการยับยั้งแบบผันกลับ.....	25
11 Morphology ของเซลล์ human hepatoma HepG2 cell line.....	29
12 โครมาโตแกรม Fingerprint ของสารสกัด.....	44
13 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	45
14 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	46
15 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง.....	46
16 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น ต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	47
17 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น ต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	47
18 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น ต่างๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง.....	48

ภาพที่	หน้า
19 กราฟแสดงผลของการเหนี่ยวนำสมรรถนะ CYP3A4 ของสาร dexamethasone ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	49
20 กราฟแสดงผลสมรรถนะ CYP3A4 ของสิ่งสกัดในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	50
21 กราฟแสดงผลสมรรถนะ CYP3A4 ของสาร β -sitosterol ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	50
22 กราฟแสดงผลการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ของสาร dexamethasone ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง.....	51
23 กราฟแสดงผลการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ของสิ่งสกัดในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง.....	52
24 กราฟแสดงผลการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ของสาร β -sitosterol ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง.....	52
25 แสดงแถบโปรตีน CYP3A4 และ Actin ของสารทดสอบ.....	53
26 กราฟแสดงผลการเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน CYP3A4 ของสาร dexamethasone ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	54
27 กราฟแสดงผลการแสดงออกของโปรตีน CYP3A4 ของสิ่งสกัดในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	54
28 กราฟแสดงผลการแสดงออกของโปรตีน CYP3A4 ของสาร β -sitosterol ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	55
29 กราฟมาตรฐานของสาร Gallic acid.....	81
30 กราฟมาตรฐานของสาร Catechin.....	82
31 กราฟมาตรฐานของสาร β -sitosterol.....	83
32 กราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการเรืองแสง.....	87
33 กราฟ Melt Curve CYP3A4 และ negative CYP3A4.....	90
34 กราฟ Melt Curve β -actin และ negative β -actin.....	90
35 กราฟ Amplification ของ CYP3A4 และ negative CYP3A4.....	91
36 กราฟ Amplification ของ β -actin และ negative β -actin.....	91
37 Agarose gel electrophoresis ของ mRNA CYP3A4 และ mRNA β -actin.....	92

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AchE	Acetylcholinesterase
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AUC	Area under curve
CAR	Constitutive androstane receptor
CCRP	Cytoplasmic CAR-retaining protein
Cdks	Cyclin-dependent kinases
CPR	NADPH-cytochrome P450 reductase
CYP	Cytochrome P450
DDI	Drug-drug interaction
DEX	dexamethasone
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FID	Flame Ionization Detector
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GFP	Green fluorescent protein
GR	Glucocorticoid receptor
HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell line
HSP	Heat shock proteins
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
LC ₅₀	lethal concentration 50
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester
MRP1	Multidrug resistance protein 1
Mrps	Multidrug resistance associated proteins
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NR11	Nuclear receptor 11

Oatp2	Organic anion-transporting polypeptide 2
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PDK2	Pyruvate dehydrogenase kinase 2
PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase 4
P-gp	P-glycoprotein
PLD	Phospholipase D
PP 2A	Protein phosphatase 2A
PXR	Pregnane X receptor
RIF	Rifampicin
RXR α	Retinoid X receptor alpha
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	Serum glutamic pyruvic transferase
TLC	Thin Layer Chromatography
VCAM-1	Vascular adhesion molecule 1
VDR	Vitamin D receptor

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Cytochrome P450 (CYP) เป็น hemoprotein ที่เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาในระยะ 1 (phase I metabolism) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงสารที่มีอยู่แล้วภายในร่างกาย (endogenous substances) และรับเข้ามาจากภายนอก (xenobiotics) (Badyal & Dadhich, 2001) การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา (drug-drug interactions) ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาระยะที่ 1 ซึ่งมีระบบเอนไซม์ CYP เกี่ยวข้องเป็นพื้นฐาน การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาส่งผลใหญ่เป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำและการยับยั้งเอนไซม์ CYP มีผลทำให้เพิ่มหรือลดระดับยาในเลือดของยาอื่นที่ผู้ป่วยรับประทานเข้าไปร่วมกัน อาจมีผลทำให้เกิดผลข้างเคียงหรือลดประสิทธิผลของยา ยาที่ยับยั้งเอนไซม์ CYP ได้อย่างจำเพาะเจาะจงทำให้การขจัดยาอื่นที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์นั้นลดลง ในทางตรงกันข้ามผลจากการยับยั้งเอนไซม์ CYP ของยาที่ต้องอาศัยเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปเป็นสารออกฤทธิ์ (prodrug) มีผลทำให้ active metabolite ของยาเหล่านั้นลดลง ส่งผลให้ประสิทธิผลในการรักษาของยานั้นลดลงด้วย ที่สำคัญในบางครั้งยังมีผลทำให้เกิดฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ของยาโดยที่ส่วนใหญ่แล้วเป็นยาที่มีค่า therapeutic index แคบ (Ioannidis, 2008) ในกรณีที่ยามีผลเหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP3A4 อาจทำให้ประสิทธิผลของยาที่เป็นซับสเตรตเดียวกับของ CYP ลดลงเนื่องจาก CYP3A4 เป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณมากที่สุดในตับ (ประมาณ 30%) และมีบทบาทในการเมแทบอลิซึมยามากที่สุด โดยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยาที่แตกต่างกันมากกว่า 120 ตัว (Bibi, 2008) ทำให้การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่ CYP3A4

ปัจจุบันพืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการรักษาสุขภาพเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความเชื่อที่ว่าสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมี มีการใช้สมุนไพร ร่วมกับการใช้ยาแผนปัจจุบันมากขึ้นและในความเป็นจริงที่ว่าสมุนไพรบางชนิดมีฤทธิ์เหนี่ยวนำหรือยับยั้งเอนไซม์ CYP ในตับอาจมีผลทำให้ฤทธิ์ของยาแผนปัจจุบันที่ได้อยู่ก่อนแล้วลดลง หรือในทางตรงข้ามอาจเพิ่มความเป็นพิษหรือทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ของยาแผนปัจจุบันได้

งานพญาวานร มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เป็นไม้พุ่ม สูง 1-2 เมตร กระจายทั่วไปในป่าของเวียดนาม, ลาว และ จีน ปลูกไว้เพื่อใช้เป็นยาหรือเป็นไม้ประดับ จากการศึกษาในพื้นที่แถบ Mekong Delta ของเวียดนาม

พบว่า นิยมปลูกเพื่อใช้ในการรักษามากกว่าใช้ในการป้องกันโรค ทั้งในคนและสัตว์ การแพทย์พื้นบ้านของเวียดนามระบุว่าใช้ใบสดของพืชนี้ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น โรคความดันโลหิตสูง, มะเร็ง, ไช้ข้ออักเสบ เป็นต้น (Dieu *et.al.*, 2005) ในประเทศไทยมีการนำพืชชนิดนี้มาใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคกระเพาะ, โรคมะเร็ง, โรคเบาหวาน, โรคไตอักเสบ และโรคอุจจาระร่วง (พีรวิชญ์ พาตี และคณะ, 2552) โดยรับประทานใบสดหรือนำใบสดมาคั้นน้ำ ขนาดที่ใช้ประมาณ 7-9 ใบขึ้นอยู่กับอาการ ระยะเวลาในการรับประทานประมาณตั้งแต่ 1 วัน ถึงต่อเนื่อง (Dieu *et.al.*, 2005) จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสิ่งสกัดเอทานอล *P. Palatiferum* ในสัตว์ทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสิ่งสกัดดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษหรือทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิต (พีรวิชญ์ พาตี และคณะ, 2009) การตรวจสอบทางพฤกษเคมี (phytochemical) ในใบของพืชชนิดนี้พบว่ามีสารประกอบจำพวก saponins, ไขมัน, ฟลาโวนอยด์ และ ไฟโตสเตอรอล (phytosterols) (Giang *et.al.*, 2003) ฟลาโวนอยด์ที่พบอยู่มากในใบของพืชชนิดนี้ ได้แก่ สาร kaempferol และ apigenin จากการศึกษาที่ผ่านมาไม่นานนี้พบว่าทั้ง kaempferol และ apigenin มีผลเหนี่ยวนำ CYP3A4 โดยที่ kaempferol กระตุ้นกระบวนการเลียนแบบสร้างสาย RNA (transcription) ของ CYP3A4 ที่ผ่านทาง pregnane X receptor (PXR) เพิ่มขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 (Liu *et.al.*, 2006) ส่วนสาร apigenin กระตุ้นที่ CYP3A4 promoter ผ่านทางกระบวนการอื่นที่ไม่ผ่านทาง PXR (Dong *et.al.*, 2010) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการยับยั้ง CYP3A4 ของมนุษย์ ด้วยวิธี fluorometric microtitre plate assay พบว่า β -sitosterol ซึ่งเป็นสารไฟโตสเตอรอล ที่มีอยู่ในใบของพืชชนิดนี้ไม่มีผลยับยั้ง CYP3A4 (Nair *et.al.*, 2007)

ปัจจุบันมีผู้สนใจนำว่านพญาวานมาใช้รักษาโรคเพิ่มมากขึ้น โดยรับประทานเสริมกับยารักษาโรคปัจจุบัน ถึงแม้ว่ามีการรายงานถึงฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP3A4 ของสารออกฤทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในว่านพญาวาน แต่ยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยนี้ที่ทำอย่างเป็นระบบของสารสกัดหยาบที่มีอยู่ในใบของพืชชนิดนี้และ β -sitosterol ซึ่งเป็นสารหลักอีกตัวหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสิ่งสกัดแอลกอฮอล์จากใบของ *P. palatiferum* และ β -sitosterol ต่อสมรรถนะของ cytochrome P450 3A4 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 โดยวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ ปริมาณ RNA และ ปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น

สมมติฐานของงานวิจัย

สิ่งสกัดแอลกอฮอล์จากใบของ *P. palatiferum* และ β -sitosterol มีผลต่อสมรรถนะ CYP3A4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ข้อมูลผลของสิ่งสกัดแอลกอฮอล์จากใบ *P. Palatiferum* และ β -sitosterol ต่อเอนไซม์ CYP3A4 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

P. palatiferum

ว่านพญาพานร (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกอื่น คือ ฮว่านง็อก มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศเวียดนาม ค้นพบในป่าแถบเวียดนามเหนือ ได้มีการปลูกขยายใช้เป็นพืชสมุนไพรและไม้ประดับ ว่านพญาพานรนำเข้ามาในไทยโดยกลุ่มทหารผ่านศึกสมัยสงครามเวียดนาม ลักษณะต้นมีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ขนาดเล็ก สูงประมาณ 1-3 เมตร ใบอ่อนปลายแหลม ส่วนล่างของใบหยาบสีเขียวเข้ม ด้านบนสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 1) เจริญเติบโตได้ดีในที่ร่มหรือแดดรำไร ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยม เปลือกต้นผิวเรียบสีเขียว ดอกเป็นช่อสีชมพู น้ำเงินม่วงหรือเกือบดำ (วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล และ อรุณญา ศรีบุศราคม, 2551)



ภาพที่ 1 *P. palatiferum*

(<http://www.kroobannok.com/blog/14906>)

ผลการศึกษาจาก Mekong Delta ของเวียดนาม พบว่าครอบครัวในเมืองปลูกว่านพญาพานรมากกว่าที่ชนเมือง ครอบครัวในเมืองทุกพื้นที่จะนิยมใช้ใบในการรักษามากกว่าการป้องกัน ขนาดที่ใช้เพื่อป้องกันส่วนใหญ่ใช้ 3-6 ใบต่อวัน สำหรับการรักษาจะใช้ 7-9 ใบ ใบของ *P. palatiferum* ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในคน และสัตว์ ระบุว่านำมาใช้ในโรคทั้งหมด 25 ชนิด เช่น ความดัน, ท้องเสีย, โรคไขข้ออักเสบ, การอักเสบในลำคอ และอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ความถี่ในการใช้ใบเพื่อรักษาและป้องกันโรคในสัตว์นั้นน้อยกว่าในคน และนิยมใช้

เพื่อการรักษามากกว่าป้องกันโรคเช่นกัน โรคที่มีการนำมาใช้ ได้แก่ ท้องเสียในหมู แผลในไก่ อหิวาตกโรคในสัตว์ปีก และอาการถ่ายเป็นเลือดในสุนัข พืชนี้สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วในเวียดนามใต้เหมือนกับที่ในเวียดนามเหนือ สามารถปลูกได้ง่ายและโตเร็วทำให้ช่วยขยายการปลูกและการประยุกต์ใช้ในบริเวณ Mekong Delta เพิ่มมากขึ้น (Dieu *et.al.*, 2005)

ส่วนประกอบทางพฤกษเคมี

จากการศึกษาด้านพฤกษเคมี (phytochemical) พบว่าในใบของ *P. Palatiferum* มีสารประกอบต่างๆดังนี้ ไฟโตสเตอรอล, ไขมัน, ฟลาโวนอยด์ และ saponins เมื่อหาด้วยวิธีทดสอบการเปลี่ยนแปลงของสีในเชิงคุณภาพ (qualitative colour reactions) จากการแยกเป็น fraction ต่างๆด้วยวิธี Silica gel chromatography และวิเคราะห์ส่วนประกอบด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่หลากหลาย พบว่ามี β -sitosterol, stigmasterol, kaempferol และ apigenin (Giang *et.al.*, 2003) จากการศึกษาของ Hung และคณะ, 2004 ที่ได้การศึกษาส่วนประกอบของพืชชนิดนี้เพิ่มเติม พบว่า ในใบของ *P. palatiferum* ที่เคยรายงานไว้ว่ามี ฟลาโวนอยด์, β -sitosterol, stigmasterol, kaempferol, apigenin, แล้วยังมี triterpenoid saponins, phytol, palmitic acid และ salicylic acid เป็นองค์ประกอบร่วมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ามีกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น lysine, methionine และ threonine พบแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม, โพแทสเซียม, แมกนีเซียม และ เหล็ก (Dieu *et al.*, 2005)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ *P. palatiferum*

1. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ในปี 2551 วงศ์สถิตย์ ชั่วกุล และ อรัญญา ศรีบุศราคม ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดยใช้ blood peroxidase model พบว่า สิ่งสกัดเอทิลอะซีเตทและบิวทานอลจากใบของ *P. palatiferum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด เมื่อทดสอบด้วยวิธี standard disc diffusion method โดยที่สิ่งสกัดเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella typhi* 158, *Shigella flexneri* และ *Escherichia coli* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Candida stellatoidea* และ การศึกษาของ บงกช นพผล และคณะ 2552 ในการศึกษาฤทธิ์ต้านและฆ่าเชื้อซัลโมเนลลา 8 สายพันธุ์ โดยวิธี broth microdilution โดยการเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น สุราขาว 40 ดีกรี และ เอทานอล 95% พบว่า สิ่งสกัดที่ละลายด้วยน้ำกลั่น มีฤทธิ์ในการต้านและ

ฆ่าเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่าตัวทำลายอื่น นอกจากนี้ในปี 2553 สมหมาย ปะติตั้งโช ได้ทำการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ FRAP โดยใช้ใบแห้งของ *P. palatiferum* ที่สกัดด้วยตัวทำลายต่างชนิดกัน คือ อินทรีย์เฮกเซน (hexane), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate), เมทานอล (methanol) และเอทานอล พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของ *P. palatiferum* มีการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] สูงที่สุด ส่วนการทดลองโดยวิธี FRAP พบว่า สิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และ เอทิลแอซิเตต สามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สิ่งสกัดจากเมทานอล

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยหาค่า LC_{50} ในเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์ HepG2 และ Hela และ เซลล์ปกติจากไตของลิง โดยใช้สิ่งสกัดจากใบของ *P. palatiferum* พบว่า ค่า LC_{50} ในเซลล์ HepG2 และ Hela มีค่าเท่ากับ 0.9 $\mu\text{g/ml}$ และไม่มีผลต่อเซลล์ปกติจากไตของลิง (เบญจพรศรีสุวรรณ และคณะ, 2552)

3. การศึกษาการเจริญเติบโตและอาการท้องเสียของลูกหมู

ศึกษาโดยใช้ใบสดหรือผงจากใบแห้งของ *P. Palatiferum* โดยป้อนใบสดหรือผงใบแห้งของ *P. palatiferum* ที่ขนาดและระยะเวลาต่างกันในลูกหมูที่หย่านมและไม่หย่านม พบว่าทำให้อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น อาการท้องเสียและอัตราการตายลดลง จำนวนหมูและระยะเวลาที่เกิดท้องเสียลดลงเช่นกัน อาจเนื่องมาจากสารประกอบทางเคมีในพืช เช่น β -sitosterol, triterpenoid saponin, I-triacontanol และสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางตัวมีผลต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของลูกหมู ทั้งนี้พบว่าใบสดและผงจากใบแห้งของ *P. palatiferum* มีประสิทธิภาพเท่ากัน (Dieu *et.al.*, 2006) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพใบแห้งของ *P. palatiferum* ในการรักษาหมูที่ท้องเสียกับยาต้านจุลชีพ (antibiotic) คือ Coli-norgen และ Cotrimoxazole พบว่า หลังได้รับการรักษาสามวัน อัตราการกลับคืนสู่สภาพเดิมของลูกหมูที่ได้รับการรักษาด้วย *P. palatiferum* มีมากที่สุด ส่วนอัตราการกลับมาท้องเสียอีกครั้งและระยะเวลาที่หมูท้องเสีย สิ่งสกัดจาก *P. palatiferum* ทำให้อาการท้องเสียกลับมาอีกน้อยที่สุดและระยะเวลาที่ลูกหมูแสดงอาการท้องเสียสั้นกว่าที่ใช้ยา Coli-norgen แต่ใช้เวลานานกว่า Cotrimoxazol ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นผงแห้งของใบของ *P. palatiferum* มีประสิทธิภาพในการรักษาอาการท้องเสีย เทียบเท่ากับ Coli-norgen และ Cotrimoxazole (Dieu & Hoa, 2003)

4. การศึกษาการลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือดในหนูเบาหวาน

จากการศึกษาของ วัชรวิวรรณ จันทรอาสา ในปี 2551 โดยให้สิ่งสกัดด้วยน้ำของ *P. palatiferum* ที่ความเข้มข้น 20, 60 และ 100 mg/ml แก่หนูขาวสายพันธุ์วิสต้าที่ทำให้เป็นเบาหวานโดยใช้ streptozotocin วัดระดับน้ำตาลและปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดของวันที่ 15 และ 30 พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มที่ได้สิ่งสกัดความเข้มข้น 60 mg/ml มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่าวันแรกอย่างมีนัยสำคัญ สิ่งสกัดความเข้มข้น 60 และ 100 mg/ml ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ผลจากการการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของตับอ่อนแสดงให้เห็นว่า สิ่งสกัดความเข้มข้น 20, 60 และ 100 mg/ml ทำให้ Islets of Langerhans มีขนาดใหญ่ขึ้นและเห็นนิวเคลียสชัดเจนโดยสิ่งสกัดความเข้มข้น 60 mg/ml มีการฟื้นฟูสภาพของ β -cell ได้ชัดเจนสุด (วัชรวิวรรณ จันทรอาสา, 2551)

5. การศึกษาฤทธิ์ลดความดันโลหิต

เมื่อให้สิ่งสกัดด้วยน้ำจากใบของ *P. palatiferum* ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 25 mg/kg ในหนูแรทที่มีความดันปกติและหนูแรทที่เหนียวน้ำให้มีความดันโลหิตสูงด้วย L-NAME พบว่า สิ่งสกัดทั้งสามความเข้มข้นทำให้ทั้งค่าความดันเฉลี่ย (mean arterial blood pressure) และ อัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) ลดลง เมื่อทำการแยก aortic ของหนูมาทดสอบกับสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นระหว่าง 50 ถึง 200 μ g/ml พบว่า สิ่งสกัดช่วยทำให้หลอดเลือดคลายตัวตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (concentration dependent) เมื่อทำให้หดตัวด้วย norepinephrine และเมื่อให้ L-NAME และ atropine สิ่งสกัดก็ยังคงมีฤทธิ์ ทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว เมื่อทำการแยก atrium ของหนูแล้ว ทดสอบด้วยสิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 2.5 ถึง 7.5 mg/ml พบว่าช่วยลดทั้งอัตราการเต้นของหัวใจและแรงบีบตัวตามความเข้มข้นที่ได้รับ และเมื่อให้ atropine ก่อนให้สิ่งสกัด ฤทธิ์ดังกล่าวของสิ่งสกัดยังไม่เปลี่ยนแปลง (Khonsung *et.al.*, 2011)

6. การยับยั้ง Acetylcholinesterase (AChE) ในหนูแรท

ศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยน้ำจากใบของ *P. palatiferum* ต่อการยับยั้ง AChE ในหนูแรทสายพันธุ์ albino เพศผู้ โดยดูถึงสมรรถนะของ AChE ใน hippocampus ซีรัม และ เม็ดเลือดแดง โดยการให้สิ่งสกัดความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.0 g/kg ของน้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน พบว่าสมรรถนะของ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 0.7 และ 1.0 g/kg ของน้ำหนักตัว ใน

hippocampus แต่ใน ซีรัม และ เม็ดเลือดแดงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ได้รับสิ่งสกปรกและกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น (Buncharoen *et.al.*, 2010)

7. การศึกษาความเป็นพิษ

ในการทดสอบความเป็นพิษในหนูขาว เมื่อให้สิ่งสกปรกด้วยน้ำของ *P. palatiferum* ที่ขนาด 0.3, 0.7 และ 1.0 g/kg ต่อวันแก่หนูแรท พบว่าหนูที่ได้รับสิ่งสกปรกมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นและไม่พบว่ามีผลผิดปกติของเนื้อเยื่อตับและไต ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาพบว่าปริมาณของฮีโมโกลบิน ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและเม็ดเลือดแดงโดยรวมของหนูที่ได้รับสิ่งสกปรก ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งสกปรกขนาดตั้งแต่ 0.3 g/kg มีผลทำให้เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิดพบว่าหนูทุกกลุ่มมีเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในจำนวนที่ไม่แตกต่างกัน ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสิ่งสกปรกด้วยน้ำของ *P. palatiferum* ไม่มีพิษต่อเม็ดเลือดแดงและขาว (สุพัตรา อินตะ, 2552)

นอกจากนี้ในปี 2552 พีรวิชญ์ พาดี และคณะ ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (african green monkey kidney) ด้วยวิธี green fluorescent protein (GFP) พบว่าสิ่งสกปรกเอทานอลจากใบของ *P. palatiferum* ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ Vero และจากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาวสายพันธุ์วิสตา พบว่าไม่มีหนูที่ตายและแสดงความเป็นพิษหลังจากได้รับสิ่งสกปรกภายใน 24 ชั่วโมงและนาน 14 วัน เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองพบว่ามีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน พบว่าไม่มีหนูตายและแสดงความเป็นพิษหลังจากได้รับสิ่งสกปรกนาน 14 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับสารชีวเคมีโลหิต ยกเว้นระดับ Blood urea nitrogen ของสิ่งสกปรกขนาด 500 และ 1000 mg/kg ที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้หนูกลุ่มที่ได้รับ *P. Palatiferum* มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม

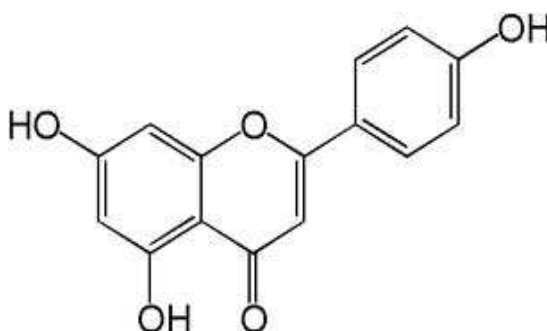
8. การศึกษาสารพฤกษเคมีที่พบในใบของ *P. palatiferum* ต่อสมรรถนะของ CYP3A4

งานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับสารพฤกษเคมีที่พบในใบของพืชชนิดนี้เกี่ยวกับการเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง CYP3A4 พบว่าสารฟลาโวนอยด์ kaempferol และ apigenin ต่างมีผลเหนี่ยวนำ CYP3A4 ในเซลล์ HepG2 โดยที่ kaempferol จะเหนี่ยวนำ CYP3A4 ผ่านทาง PXR (Liu *et.al.*, 2006) แต่ apigenin เหนี่ยวนำ CYP3A4 ผ่านทางการยับยั้ง cyclin-dependent kinases (Cdks) (Dong *et.al.*, 2010) โดยที่ผ่านมามีการศึกษาผลของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่เป็น

สารพฤกษเคมีสำคัญที่พบในใบของพืชชนิดนี้กับ CYP3A4 แล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารไฟโตสเตอรอลที่เกี่ยวข้องกับ CYP3A4 ในเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาผลของสาร β -sitosterol ต่อสมรรถนะของ CYP ในเซลล์ HepG2 ด้วยเช่นกัน

Apigenin

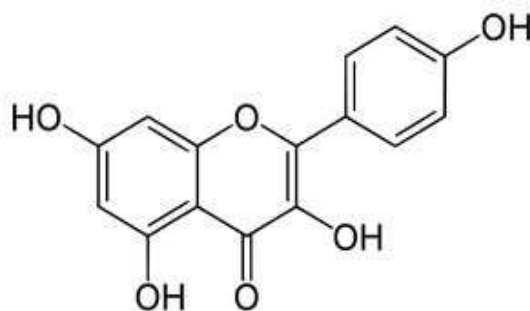
เป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่มของ Flavone (ภาพที่ 2) พบมากในผักและผลไม้ เช่น หัวหอม, ส้ม, ชา เป็นต้น (Birt *et.al.*, 2001, Surh, 2003, Manach *et.al.*, 2004, Yang *et.al.*, 2001) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Apigenin เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 เมื่อเหนี่ยวนำโดย phorbol 12-myristate 13-acetate ในเซลล์เต้านม (Lau & Leung, 2010) และยังป้องกันการเกิด lipid peroxidation และปกป้องระบบการต้านอนุมูลอิสระเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย *N*-nitroso-diethylamine และกระตุ้นด้วย Phenobarbital ในเซลล์มะเร็งตับ (Singh *et.al.*, 2004) เมื่อทำการทดสอบในเซลล์ HepG2 พบว่า เมื่อทดสอบด้วยสารนี้ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดลดลงขึ้นกับขนาดและระยะเวลา (dose- and time-dependent) และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ซึ่งอาจเกิดจาก H_2O_2 -dependent pathway (Valdameri *et.al.*, 20011) ในการทดลองของ Chiang *et.al.*, 2006 พบว่า Apigenin เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ผ่านทาง p53-dependent pathway และเหนี่ยวนำการแสดงออกของ p21 ในเซลล์ HepG2 นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ช่วยลดความเป็นพิษต่อยีน (antigenotoxic) เมื่อเหนี่ยวนำโดย mitomycin C และ cyclophosphamide (Siddique *et.al.*, 2008) และมีฤทธิ์คล้ายกับยารักษาโรคซึมเศร้า (antidepressant) เมื่อทดสอบในหนูสายพันธุ์วิสตาเพศผู้ที่เป็น chronic mild stress (Yi *et.al.*, 2008) และ apigenin สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของมะเร็งตับอ่อนของมนุษย์ โดยผ่านทางกลไกการลดการแสดงออกของ Bcl-2 และเพิ่มการแสดงออกของ Bax (Ma *et.al.*, 2007)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Apigenin (Wang *et.al.*, 1999)

Kaempferol

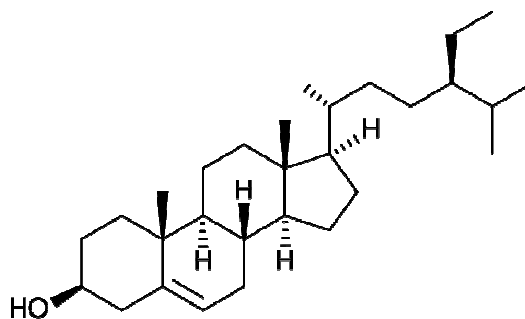
เป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม Flavonols (ภาพที่ 3) พบได้ใน ชา, บล๊อคโคลี, น้ำเกรฟฟรุ๊ต, กะหล่ำดาว และแอปเปิ้ล (Nirmala & Ramanathan, 2011) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ kaempferol ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (anti-diabetic) เนื่องจากปกป้องเซลล์ตับอ่อน β -cell ให้ตายน้อยลงและทำงานในสภาวะที่เป็นเบาหวานได้ดีขึ้น (Zhang & Liu, 2011) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิด lipid peroxidation ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนูเมื่อเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งด้วย 1,2-dimethyl hydrazine (Nirmala & Ramanathan, 2011) และพบว่า มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ ไนตริกออกไซด์ (Mahat *et.al.*, 2010) และพบว่า kaempferol ยังเป็น inverse agonist ของ estrogen-related receptor α และ γ รวมถึงยับยั้งการแสดงออกของ PDK2 และ PDK4 (Wang *et.al.*, 2009) kaempferol ยังเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งรังไข่ให้ตายแบบ apoptosis ผ่านทางการควบคุม pro-apoptotic และการแสดงออกของ anti-apoptotic protein ผ่านทาง intrinsic apoptosis pathway (Luo *et.al.*, 2011) และยังเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis ผ่านทาง antioxidant pathway (Leung *et.al.*, 2007) นอกจากนี้ยังเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งลำไส้ HCT116 ตายแบบ apoptosis ผ่านทาง p53 pathway (Li *et.al.*, 2009) เมื่อทดลองในเซลล์มะเร็งสมองพบว่า kaempferol ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ผ่านทาง oxidative stress (Sharma *et.al.*, 2007) นอกจากนี้เมื่อทดสอบ kaempferol ในเซลล์ osteoblasts ยังพบว่า มีฤทธิ์กระตุ้น osteogenic differentiation ผ่านทาง estrogen receptor (Guo *et.al.*, 2012)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ kaempferol (Wang *et.al.*, 1999)

β -sitosterol

β -sitosterol เป็นสารในกลุ่มไฟโตสเตอรอล ซึ่งเป็นส่วนประกอบภายในพืช มีโครงสร้างคล้ายกับ คอเรสเตอรอล (ภาพที่ 4) มีรายงานเกี่ยวกับไฟโตสเตอรอล มากกว่า 100 ชนิด ที่พบในพืชแต่ที่มีมากที่สุดมี 3 ชนิด คือ sitosterol, stigmasterol และ campesterol (Fernandes & Cabral, 2007) ที่พบมากในอาหารหลายๆอย่าง คือ sitosterol รองลงมาเป็น campesterol และ stigmasterol ตามลำดับ (Richard & Ostlund, 2002)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ β -sitosterol (Bottger *et.al.*, 2012)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ β -sitosterol

1. การศึกษาการเหนี่ยวนำการตายในเซลล์มะเร็ง

ศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (MDA-MB-231 cells) พบว่า β -sitosterol ที่ 16 μ M ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลังจากให้เป็นเวลา 3 วันและเพิ่มการตายแบบ apoptosis เมื่อเปรียบเทียบกับคอเรสเตอรอล (Awad *et.al.*, 2000) จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (LNCaP cells) พบว่า β -sitosterol ที่ความเข้มข้นเดียวกันทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลงและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis (Holtz *et.al.*, 1998) รวมทั้งเพิ่มสมรรถนะของ protein phosphatase 2A (PP 2A) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ PP 2A ในระดับโปรตีน และเพิ่มสมรรถนะของ phospholipase D (PLD) อย่างมีนัยสำคัญ (Awad *et.al.*, 2000)

2. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ลดไข้

โดยทำการทดลองในหนูขาว พบว่า มีฤทธิ์ในด้านการอักเสบ เหมือนกับยาลดการอักเสบ hydrocortisone และ oxyphenbutazone และมีฤทธิ์ลดไข้เหมือนยา aspirin แต่ไม่มีฤทธิ์แก้ปวด (Gupta *et.al.*, 1980) ผลของการศึกษาการด้านการอักเสบในเซลล์ endothelial พบว่า β -sitosterol ช่วยลดการแสดงออกของ vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) และ intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) อย่างมีนัยสำคัญแบบ dose dependent และยับยั้งปฏิกิริยา phosphorylation ของ NF κ B p65 อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน (Loizou *et.al.*, 2010)

3. การศึกษาฤทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน

พบว่า β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 50 μ M ในเซลล์ Murine RAW 264.7 macrophages พบว่า β -sitosterol ช่วยเพิ่มสมรรถนะของ glutathione peroxidase และ manganese superoxide dismutase และลดสมรรถนะของ catalase โดย β -sitosterol กระตุ้นออกซิเดชันเอนไซม์ผ่านทาง estrogen receptor/PI3-kinase-dependent pathway (Vivancos & Moreno, 2005)

4. การศึกษาผลต่อ CYP และ P-glycoprotein

จากการศึกษาแบบคัดกรองในหลอดทดลองเกี่ยวกับผลยับยั้งของ β -sitosterol ต่อ CYP3A4, 3A5 และ CYP19 โดยวิธี fluorometric microtitre plate assay พบว่า β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ไม่มีผลยับยั้ง CYP ทั้ง 3 รูปแบบ เมื่อทำการทดสอบผลต่อ P-glycoprotein (P-gp) ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (CaCO-2) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่ามีผลเหนี่ยวนำ P-gp (Nair *et.al.*, 2007) และมีการศึกษาเกี่ยวกับ P-gp และ multidrug resistance protein 1 (MRP1) ในเซลล์มะเร็งของคน KB-C2 cells และในเซลล์ MRP cells ตามลำดับ พบว่า β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 50 μ M ไม่มีผลต่อการสะสมของ daunorubicin ในเซลล์ KB-C2 cells และ calcein ในเซลล์ KB /MRP cells แสดงว่า β -sitosterol ไม่มีผลต่อ P-gp หรือ MRP1 ของมนุษย์ (Nabekura *et.al.*, 2008)

5. การศึกษาฤทธิ์คุ้มกำเนิด

ทำการทดลองโดยให้ β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 mg/kg แก่หนูขาวสายพันธุ์ albino เพศผู้ ที่ระยะเวลา 16, 32 และ 48 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/kg ทำให้ปริมาณของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญและน้ำหนักของอวัยวะลดลงเมื่อให้เป็นระยะเวลา 48 วัน ส่วนที่

ความเข้มข้น 5 mg/kg ทำให้ปริมาณของอสุจิลดลงและน้ำหนักของอวัยวะลดลงที่เล็กน้อยหลังจากได้รับสารตั้งแต่ 16 วันขึ้นไป เมื่อหยุดให้สารทดสอบ พบว่า ปริมาณของอสุจิและน้ำหนักของอวัยวะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (Malini & Vanithakumari, 1991) แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ในตัวมิงค์ (American mink) เพศผู้และเพศเมีย โดยให้ β -sitosterol ทางปาก ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 50 mg/kg ทุกวัน เป็นระยะเวลา 10 เดือน พบว่าไม่เป็นอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างมีนัยสำคัญ (Nieminen *et.al.*, 2008)

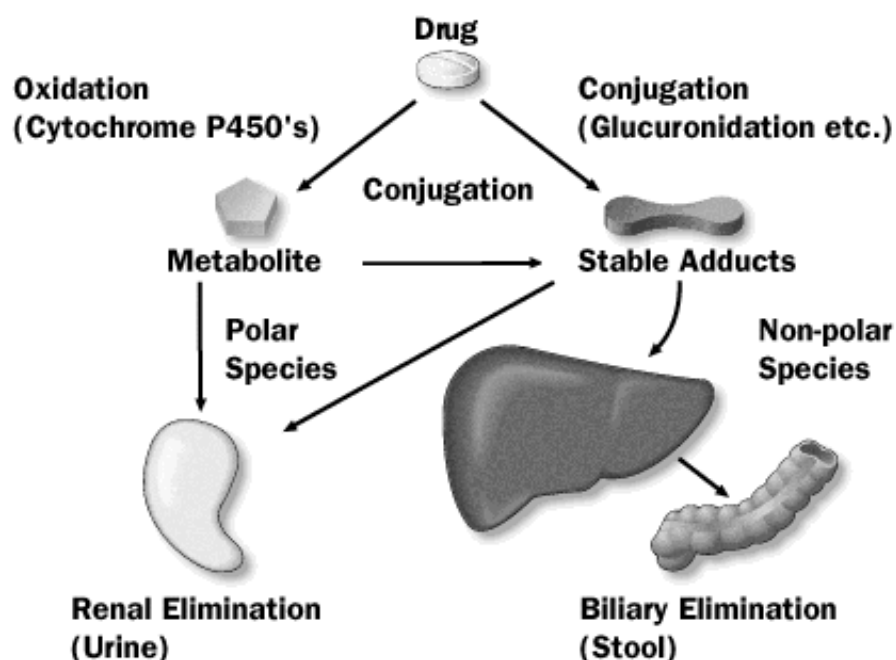
6. การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง

ทำการทดลอง โดยฉีด β -sitosterol ในหนูขาวสายพันธุ์ albino เพศผู้และเพศเมีย ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mg/kg เข้าได้ผิวหนังทุกวันเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า ไม่มีหนูตายในการทดลอง น้ำหนักของหนูลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้นที่ได้รับทั้งสองกลุ่ม ตับและไตเป็นปกติ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ SGOT หรือ SGPT ในตับและไต และไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับฮีโมโกลบิน น้ำตาลในเลือด และความเข้มข้นของ serum bilirubin และสมรรถนะของเอนไซม์ SGPT และ SGOT ที่ทุกความเข้มข้น ระดับของคอเรสเตอรอลที่ลดลงในหนูทั้งสองเพศและลดลงแบบ dose dependent (Malini & Vanithakumari, 1990)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอม (Xenobiotic)

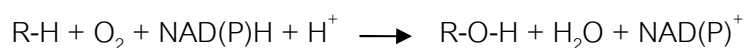
สารที่เข้าสู่ร่างกายทั้งอาหาร เครื่องดื่ม และยา นั้นรวมเรียกว่า สารแปลกปลอม (Xenobiotic) บางชนิดไม่มีอันตรายแต่บางชนิดทำให้เกิดการตอบสนองของร่างกายที่เป็นพิษ ดังนั้นร่างกายจึงมีกลไกในการกำจัดสารแปลกปลอมโดยการเปลี่ยนแปลงหรือเมแทบอลิซึมสารเหล่านั้น ซึ่งเรียกว่า กระบวนการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารแปลกปลอม ภายหลังจากยาเข้าสู่ร่างกาย ส่วนใหญ่ตับจะเป็นอวัยวะสำคัญในการเปลี่ยนแปลงยา สามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงยาได้ออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (phase I reaction) เป็นระยะที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาได้แก่ ปฏิกริยา oxidation, reduction และ hydrolysis (Glue & Clement., 1997) การเกิดปฏิกริยา oxidation, reduction และ hydrolysis ทำให้ยาหรือสารนั้นมีขั้วมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจมีฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือพร้อมที่จะเข้าทำปฏิกริยาในระยะที่ 2 (phase II) คือ conjugation phase ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์สารหรือรวมตัวสารที่ได้จากระยะที่ 1 กับสารที่ละลายน้ำได้ดีและมีอยู่ภายในร่างกาย ได้แก่ glucuronic acid, sulfate, acetyl เป็นต้น (ภาพที่ 5) เพื่อได้สารที่ละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้นจนขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น เอนไซม์ใน

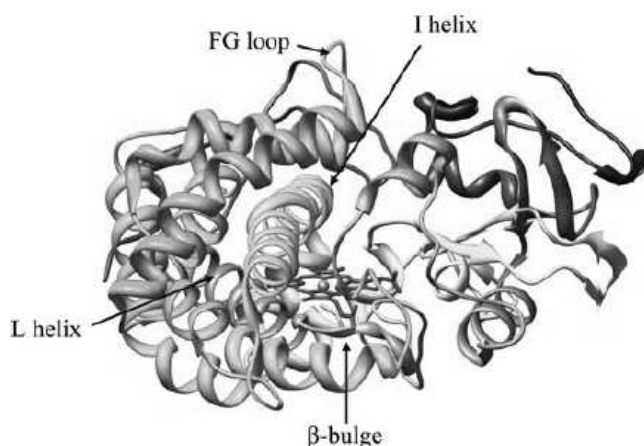
phase I พบในส่วน endoplasmic reticulum และเอนไซม์ใน phase II ซึ่งเป็น conjugation enzymes จะอยู่ในส่วนของเหลวภายในเซลล์ (Xu *et al.*, 2005)



ภาพที่ 5 เส้นทางที่ยาเปลี่ยนแปลงภายในร่างกาย (Anderson., 2005)

CYP เป็นโปรตีนที่มี heme (heme-containing protein) (ภาพที่ 6) การที่ได้รับการเรียกชื่อ ว่า P450 เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เมื่อถูกกรีดิวซ์ และจับกับคาร์บอนโมโนออกไซด์ (Glue & Clement., 1997) เอนไซม์ CYP กระตุ้น dioxygen เพื่อคะตะไลซ์สารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้ (Hamdane & Zhang., 2008)





ภาพที่ 6 โครงสร้าง x-ray ของ CYP (Hamdane & Zhang., 2008)

เอนไซม์ในระบบ CYP พบได้ใน endoplasmic reticulum และ mitochondria สังเคราะห์มากที่สุด พบเล็กน้อยใน ลำไส้เล็ก, ไต และส่วนอื่น (Krishna & Klotz, 1994) ในการทำงาน CYP ต้องการกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transfer chain) โดย CYP ที่พบใน endoplasmic reticulum จะรับอิเล็กตรอนจาก NADPH โดย NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) ส่วน CYP ที่พบใน mitochondria มีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจาก NADPH ไปสู่ redoxin โดยอาศัยเอนไซม์ redoxin reductase และไปสู่ CYP (Gonzalez, 1990)

เอนไซม์ CYP มีบทบาทสำคัญในการกำจัดพิษของสารเคมีแปลกปลอมและการเปลี่ยนแปลงยา ใน phase I reaction ของการเปลี่ยนแปลงยาหลายตัว (Badyal & Dadhich, 2001) CYP พบได้ในสิ่งมีชีวิตระดับต่ำ ตั้งแต่ แบคทีเรียจนถึงสิ่งมีชีวิตระดับสูง เช่น คน (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001) และเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในปฏิกิริยาพื้นฐานต่างๆ เช่น oxidation, peroxidation และ reduction ของสารประกอบกลุ่มต่างๆ ตลอดจนสารประกอบที่มีอยู่ภายในร่างกาย เช่น สเตียรอยด์, น้ำดี, ไขมัน, โพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) และ ลิโคไทรอีน (leukotrienes) รวมทั้งสารภายนอกในร่างกาย ประกอบด้วย ยา และมลพิษจากสิ่งแวดล้อม (Nelson *et al.*, 1996; Bertz & Granneman, 1997) CYP ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องในการเมแทบอลิซึมของยา และ สารแปลกปลอม (xenobiotic) คือ CYP1, CYP2 และ CYP3 (ตารางที่ 1) โดยที่ทั้ง 3 แฟมิลีนี้รวมได้ประมาณ 70% ของ CYP ทั้งหมดภายในตับ นอกนั้นอยู่ในแฟมิลีอื่นที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของสารภายในร่างกาย (Hukkanen, 2000) ปัจจัยที่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ CYP ได้แก่ อายุ, เพศ, พันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ CYP ในแต่ละบุคคล (Glue & Clement., 1997)

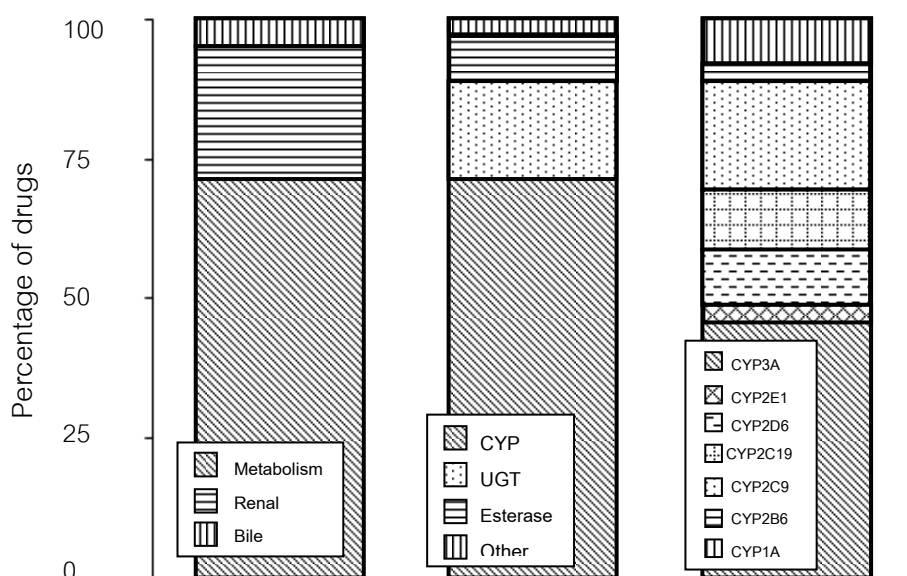
ตารางที่ 1 CYP ของมนุษย์และหน้าที่หลัก (Abhilash *et al.*, 2009)

Cytochrome family	Main functions
CYP1	Xenobiotic metabolism
CYP2	Xenobiotic metabolism Arachidonic acid metabolism
CYP3	Xenobiotic and steroid metabolism
CYP4	Fatty acid hydroxylation
CYP5	Thromboxane synthesis
CYP7	Cholesterol 7 α -hydroxylation
CYP8	Prostacyclin synthesis
CYP11	Cholesterol side-chain cleavage Steroid 11 β -hydroxylation Aldosterone synthesis
CYP17	Steroid 17 α -hydroxylation
CYP19	Androgen aromatization
CYP21	Steroid 21-hydroxylation
CYP24	Steroid 24-hydroxylation
CYP26	Retinoic acid hydroxylation
CYP27	Steroid 27- hydroxylation
CYP39	Unknown
CYP46	Cholesterol 24-hydroxylation
CYP51	Sterol biosynthesis

CYP3A

CYP3A นั้นประกอบด้วย CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 และ CYP3A43 โดยพบ CYP3A4 มากที่สุดในตับ CYP3A5 พบอยู่ในเนื้อเยื่ออื่นๆ นอกตับ และพบ CYP3A7 มากในตับของทารก การแสดงออกของ CYP3A4 นั้นควบคุมโดย PXR , constitutive androstane receptor (CAR) และ glucocorticoid receptor (GR) (Urquhart *et al.*, 2007) CYP3A4 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในการเมแทบอลิซึมยาในตับของมนุษย์ โดยมีประมาณ 30-40% ของปริมาณ CYP ทั้งหมด (ภาพที่ 7) (Shimada *et al.*, 1994; Imaoka *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังพบในลำไส้เล็กอีกด้วย (Kolars *et al.*, 1992) ไม่เพียงแต่มีปริมาณมากเท่านั้น CYP3A4 ยังเป็นเอนไซม์ที่เมแทบอลิซึมยาเป็นหลัก ประมาณ 50% ของยาที่เมแทบอลิซึมโดย CYP นั้นเมแทบอลิซึม

ไลท์โดย CYP3A4 (Bertz & Granneman, 1997) การที่ CYP3A4 นั้นสามารถเมแทบอลไลต์ยาได้กว้าง จึงอาจทำให้เกิด drug-drug interaction (DDI) ได้มาก (ตารางที่ 2) เช่น การให้ยาที่ยับยั้ง CYP3A4 พร้อมกับยาที่มี therapeutic แคบ ทำให้ระดับยาอีกตัวเข้าใกล้หรือเหนือกว่าระดับที่ปลอดภัย นอกจากนี้พบความเป็นไปได้ว่า ยาตัวแรกเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP3A4 ให้มีสมรรถนะสูงซึ่งจนมีผลทำให้การเมแทบอลไลซ์ยาตัวที่สองเพิ่มมากขึ้นไปด้วย มีผลทำให้ระดับยาอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าระดับการรักษา (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001) ยาที่เป็นยับยั้งของเอนไซม์นี้ประกอบด้วย quinidine, nifedipine, diltiazem, lidocaine, lovastatin, erythromycin เป็นต้น นอกจากนี้แล้วสารภายในร่างกาย เช่น testosterone, progesterone และ androstenedione ยังเป็นยับยั้งของ CYP3A4 ด้วย (ตารางที่ 3) (Pelkonen *et al.*, 1998; Guengerich, 1999) พบว่า CYP3A4 ยังมีผลกระตุ้นสารแปลกปลอมให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น aflatoxin B₁, PAHs, NNK และ 6-aminochrysene การทดลองภายนอกร่างกายพบว่า ยาที่มีผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ CYP3A4 ใน human hepatocytes ได้แก่ rifampicin, dexamethasone และ phenobarbital (Hukkanen, 2000)



ภาพที่ 7 เส้นทางการขจัดยาของยา 200 ตัว ที่นิยมใช้ในใบสั่งยาในปี 2002 (Wienkers & Heath, 2005)

ตารางที่ 2 ยาที่มีผลทำให้เกิดอันตรกิริยาที่เกี่ยวข้องกับ เอนไซม์ CYP3A4 (Badyal & Dadhich, 2001)

Drugs affected (substrates)	
INHIBITORS	
AZole antifungals:	Midazolam ⁸ , tacrolimus ¹⁵ , terfenadine ¹⁶ , triazolam ¹⁷
Itraconazole	Cisapride ¹⁸ , quinidine ¹⁹ , astemizole ²⁰ , methylprednisolone ²¹ , buspirone ²² , felodipine ²³ , vincristine ²⁴ , atorvastatin ²⁵
Ketoconazole	Terfenadine ¹⁶ , astemizole ²⁰ , cyclosporine ⁹ , triazolam, alprazolam ²⁶
Fluconazole	Terfenadine ¹⁶ , triazolam ¹⁷
Macrolide antimicrobials:	Tacrolimus ¹⁵ , astemizole ²⁰
Erythromycin	Carbamazepine ³ , triazolam ¹⁷ , buspirone ²² , terfenadine ²⁷ , simvastatin ²⁸
Clarithromycin	Pimozide ²⁹ , cyclosporin ³⁰ , midazolam ³¹
Selective serotonin re-uptake	Midazolam ⁴ , cisapride ³²
Inhibitors (SSRIs):	
Fluoxetine	Diazepam, alprazolam ³³ , midazolam ⁸ , terfenadine ^{34,35}
Paroxetine	Alprazolam ³³
Calcium channel blockers:	
Verapamil	Simvastatin ²⁸ , carbamazepine, cyclosporine ³⁶
Diltiazem	Triazolam ¹⁷ , carbamazepine, cyclosporine ³⁶ , quinidine, simvastatin ³⁷ , midazolam, alfentanil ³⁸
Nifedipine	Midazolam ⁴
Protease inhibitors	Terfenadine, astemizole, cisapride ³⁹ , midazolam ⁴⁰
Ciprofloxacin	Tacrolimus ⁴⁶
Cimetidine	Carbamazepine ³ , quinidine ¹⁹ , cyclosporine, calcium channel blockers, benzodiazepines ⁴⁷
Propofol	Midazolam ⁴⁸
Nafimidone, pmprepzole	Carbamazepine ^{3,49}
INDUCERS	
Rifampicin	Protease inhibitors ⁹ , diazepam, triazolam, midazolam ¹⁷ , estradiol, norgestero ⁵⁰ , lidocaine ⁵¹ , zopiclone, zolpidem ⁵² , ondansetron ⁵³
Rifabutin	Protease inhibitors ⁹ , estradiol, norgestero ⁵⁰
Carbamazepine	Protease inhibitors ⁹ , midazolam ¹⁷ , Itraconazole ⁵⁴ , vincristine ⁵⁵
Phenytoin, Phenobarbitone	Midazolam ¹⁷ , vincristine ⁵⁵ , carbamazepine ⁵⁶

ตารางที่ 3 สารที่เป็นซับสเตรตของ CYP3A4 (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001)

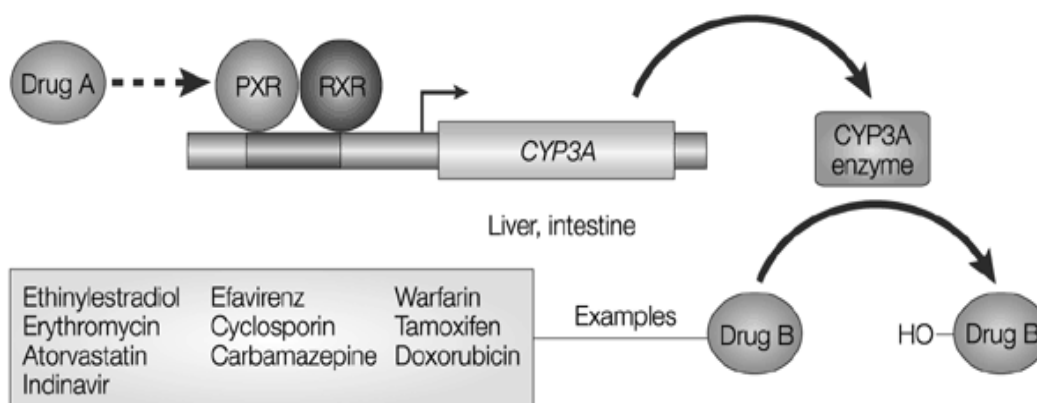
Acetaminophen (paracetamol)	Felodipine	Proquanyl
Alfentanil	Finasteride	Quinidine
Alpidem	Flutamide	Rapamycin
Alprazolam	Gallopamil	Retinoic acid (Tretinoin)
Ambroxol	Gestodene	Rifabutin
Amitriptyline	Granisetron	Ritonavir
Astemizole	Haloperidol	Ropivacain
Atorvastatin	Hypericum extract	Sameterol
Benzphetamine	Ifosphamide	Sequenavir
Bupivacaine	Imipramine	Sertindole
Brotizolam	Indinavir	Simvastatin
Budesonide	Irinotecan	Sulfamethoxazole
Buprenorphine	Ivermectin	Sulfentanil
Carbamazepine	Lansoprazole	Tacrolimus
Citalopram	Lidocine	Tamoxifen
Cisapride	Lisuride	Teniposide
Clarithromycin	Loratidine	Terfenadine
Clozapine	Losartan	Terguride
Codeine	Lovastatin	Testosterone
Colchicine	Meloxicam	Tetrahydrocannabinol
Cyclobenzaprine	Methadone	Theophylline
Cyclophosphamide	Mibefradil	Tolterodine
Cyclosporin A, G	Mifepristone	Triazolam
Dapsone	N-hydroxyarginine	Trimethadone
Dehydroepiandrosterone	Nevaripine	Troglitazone
Delaviridine	Nicardipine	Troleandomycin
Dextromethorphan	Nifedipine	Verapamil
Diazepam	Niludipine	Vinblastine
Digitoxin	Nimodipine	Warfarin (R-)
Diltiazem	Nisoldipine	Zatosetron
Docetaxel	Nitrendipine	Zonisamide
17 β -estradiol	Omeprazole	Zopiclone
Erythromycin	Oxodipine	
Ethinylestradiol	Paclitaxel (Taxol)	
Ethylmorphine	Pantoprazole	
Etoposide	Progesterone	

การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา

การให้ยาร่วมกันนั้นเป็นสิ่งที่จะต้องเฝ้าระวังเนื่องจากอาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างยา ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจทำให้เกิดผลเสียเนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาที่ให้เข้าไปร่วมด้วยได้ ดังนั้นจึงทำให้เสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงของยาและประสิทธิผลของยา (effectiveness) ในบางกรณีการเกิดอันตรกิริยาทำให้เกิดปัญหาในการรักษาที่รุนแรงจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ดังนั้นในระหว่างกระบวนการค้นคว้าหายาใหม่ การทดสอบเกี่ยวกับการเกิดอันตรกิริยาจึงมีความสำคัญและเป็นขั้นตอนเบื้องต้นในกระบวนการผลิตยาใหม่ ซึ่งกลไกทั่วไปของการเกิดอันตรกิริยานั้นคือ การยับยั้งและการเหนี่ยวนำเอนไซม์ในกระบวนการขจัดยา (Kozawa *et.al.*, 2009)

การเหนี่ยวนำเอนไซม์ (enzyme induction)

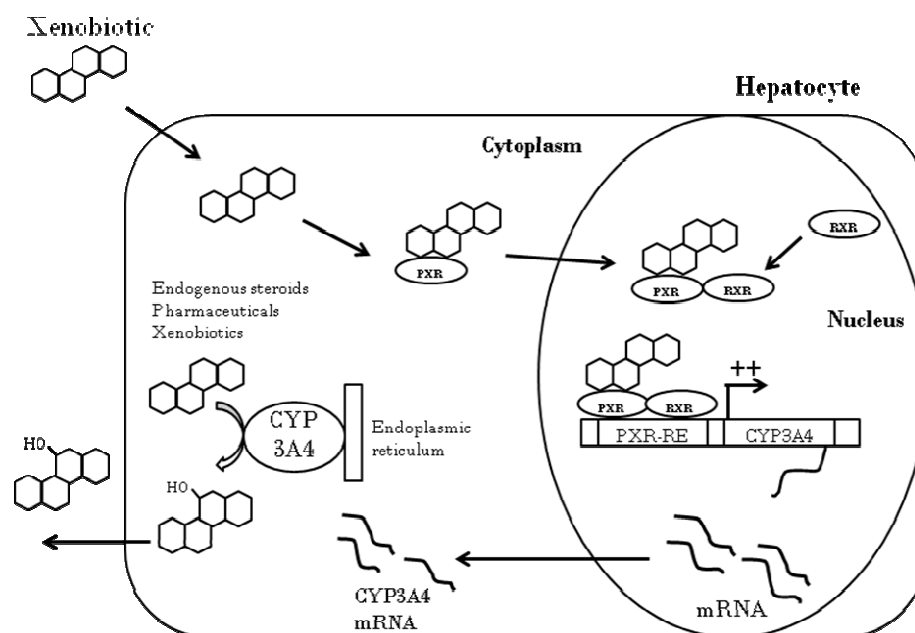
ยาหรือสารบางชนิด สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ CYP ให้เพิ่มมากขึ้นจนมีผลทำให้เกิดการแปรสภาพภายในร่างกาย (biotransformation) ของยาอีกชนิดเพิ่มมากขึ้น เป็นผลทำให้ยาอีกชนิดมีฤทธิ์ลดลงหรือมีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 8) การที่ยาไปเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ CYP เพิ่มขึ้นอาจทำให้ยาดังนั้นเองถูกเมแทบอลไลต์เพิ่มขึ้นด้วย เรียกว่า autoinduction (Buxton, 2006) การเหนี่ยวนำ CYP enzyme โดยสารภายนอกในร่างกายนั้นเกี่ยวข้องกับกำเริบระดับการเมแทบอลไลต์ของยาและสารภายในร่างกาย การเหนี่ยวนำ CYP เป็นผลทำให้ยาในเลือดมีระดับลดลง ในกรณีที่ผู้ป่วยมีระดับของยาในเลือดลดลงนั้นอาจทำให้สูญเสียประสิทธิภาพในการรักษา และในทางตรงกันข้าม ถ้ายานั้นต้องเปลี่ยนเป็น active metabolite ก่อน สมรรถนะของ CYP ที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจทำให้เกิด active metabolite เพิ่มมากขึ้นและอาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษได้ มี CYP หลายตัวที่ถูกเหนี่ยวนำได้ เช่น CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A สารหลายตัวที่ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ได้แก่ ยา, สารประกอบทางเคมี, ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และเอทานอล (ethanol) การเหนี่ยวนำ CYP เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง RNA ขึ้นมาใหม่ (de novo RNA) และการสังเคราะห์โปรตีน ผลจากการศึกษาที่ทำการยับยั้งการเลียนแบบสร้างสาย RNA (transcription) และการแปลรหัส (translation) ได้พิสูจน์แล้วว่าการเหนี่ยวนำของ CYP หลายตัวนั้นเกิดโดยกลไกที่คล้ายคลึงกัน คือมีการกระตุ้นตัวรับที่เป็น transcription factor ที่มีคุณสมบัติและความจำเพาะต่อ ligand ที่แตกต่างกัน ดังนี้ PXR, CAR, aryl hydrocarbon receptor (AhR) ทำให้กระบวนการ transcription เพิ่มขึ้น (Tompkins & Wallace, 2007)



ภาพที่ 8 การเหนี่ยวนำ CYP (Willson & Kliewer, 2002)

Pregnane X receptor

PXR อยู่ในแฟมิลี nuclear receptor ซึ่งประกอบด้วย functional domains คือ DNA-binding domain และ ligand-binding domain ซึ่งมีความคล้ายกับ vitamin D receptor (VDR) (Tompkins & Wallace, 2007) ligand ของตัวรับชนิดนี้ ได้แก่ สารภายในและสารภายนอก ร่างกาย เช่น สเตียรอยด์ ฮอร์โมน และเมแทบอลิท์ของสเตียรอยด์ เช่น โพรเจสเทอโรน และ เอสโตรเจน เป็นต้น สารประกอบที่มีอยู่ในอาหาร เช่น coumestrol และ carotenoid ยาที่สามารถกระตุ้น PXR เช่น rifampicin, phenobarbital, nifedipine, clotrimazole, mifepristone เป็นต้น ในสภาวะปกติ PXR จะอยู่ใน cytosol แต่เมื่อมี ligand เข้ามาจับ PXR จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสแล้วจับกับ retinoid X receptor alpha (RXR α) เป็น heterodimer แล้วจับกับ DNA บริเวณ PXR response elements (ภาพที่ 9) ทำให้เกิดกระบวนการ transcription CYP3A4 mRNA target gene ของ PXR ไม่ได้ประกอบด้วยสมาชิกในแฟมิลีของ CYP 3A, 2B และ 2C เท่านั้น แต่ยังมี metabolic protein เช่น glutathione S-transferase, multidrug resistance gene ที่ encodes P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated proteins (Mrps) และ organic anion-transporting polypeptide 2 (oatp2) (Tompkins & Wallace, 2007)



ภาพที่ 9 การจับกันระหว่างยาและการกระตุ้น PXR ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ CYP3A4 (Tompkins & Wallace, 2007)

Constitutive androstane receptor

CAR อยู่ในแฟมิลี nuclear receptor ชั้นแฟมิลี NR1I ตัวรับชนิดนี้พบมากที่ตับและไต (Hukkanen, 2000) ligand ที่เป็นสารภายในร่างกายของตัวรับนี้ เช่น เมแทบอลิทซ์ของ androgen, androstanol และ androstenol ซึ่งสามารถทำงานตรงข้ามกับ agonists ได้ด้วย นั่นคือสามารถยับยั้งสมรรถนะของ CAR ได้ (Forman *et.al.*, 1998) ในสภาวะที่ไม่มี ligand ตัวรับนี้จะอยู่ในไซโทพลาสซึมโดยจับกับ Chaperone protein HSP90, cytoplasmic CAR-retaining protein (CCRP) และ PPP1R16A เมื่อมียาหรือสารแปลกปลอม CAR จะ dephosphorylate และแยกออกจาก cytoplasmic complex แล้วเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและจับกับ RXR (Kachaylo *et.al.*, 2011)

Glucocorticoid receptor

GR อยู่ในแฟมิลี nuclear receptor ยาที่สามารถกระตุ้น GR ได้แก่ dexamethasone (Hukkanen, 2000) CYP2C9 และ CYP3A4 ถูกเหนี่ยวนำได้โดย glucocorticoids ผ่านทาง PXR-independent pathway GR มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น PXR ในเซลล์มนุษย์ โดย

พบว่า CAR และ PXR น่าจะถูกควบคุมโดย GR เมื่อทดสอบใน human hepatocytes พบว่า mRNA ของ PXR และ RXR แสดงออกมากขึ้นเมื่อให้ dexamethasone และการเพิ่มขึ้นของ mRNA PXR และ CAR เนื่องจาก dexamethasone นั้นจะลดลงเมื่อให้ glucocorticoid antagonist หรือถูกยับยั้งเมื่อให้ actinomycin D (Lin, 2006) จากการที่ PXR และ RXR สามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดย GR เป็นผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการจับกันของ PXR และ RXR ทำให้เพิ่มการเหนี่ยวนำ CYP3A4 โดยสารภายในและสารภายนอกร่างกาย (Hukkanen, 2000) ในสภาวะปกติ GR จะอยู่ใน cytosol ซึ่งจะจับกับ chaperone proteins ได้แก่ HSP90 และ HSP70 เมื่อมี ligand เข้ามาจับ GR จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสแล้วจับกับ GR เป็น homodimer แล้วเข้าจับกับ DNA บริเวณ glucocorticoid responsive element (GRE) (Dvorak & Pavek, 2010)

การยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibition)

การยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิทยาามีผลทำให้มีปริมาณยาในเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการสะสมจนอาจทำให้เกิดพิษของยาได้ (Buxton, 2006) นอกจากนี้ยังเป็นผลทำให้ยาขจัดออกจากร่างกายได้ช้ากว่าปกติ ในกรณีที่ยาบางตัวกลายเป็นยาที่มีฤทธิ์หลังการเมแทบอลิท์ การยับยั้งเอนไซม์จึงมีผลทำให้ยามีฤทธิ์ลดลงเมื่อ CYP ที่เกี่ยวข้องถูกยับยั้ง ดังนั้นการยับยั้ง CYP ทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยามีผลทำให้เกิดความเป็นพิษหรือประสิทธิภาพของยาลดลง (Pelkonen *et.al.*, 2008)

การยับยั้งเกิดขึ้นได้ทั้งแบบผันกลับ (Reversible inhibition) และไม่ผันกลับ (Mechanism-based inhibition) การยับยั้งแบบไม่ผันกลับเกิดจากการที่ตัวยับยั้งเกิดการแปรสภาพในร่างกาย แต่การยับยั้งแบบผันกลับนั้นเกิดขึ้นโดยตรง และที่ไม่ผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงในร่างกาย ส่วนใหญ่การยับยั้งเอนไซม์เป็นแบบผันกลับ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) และยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) (Pelkonen *et.al.*, 2008)

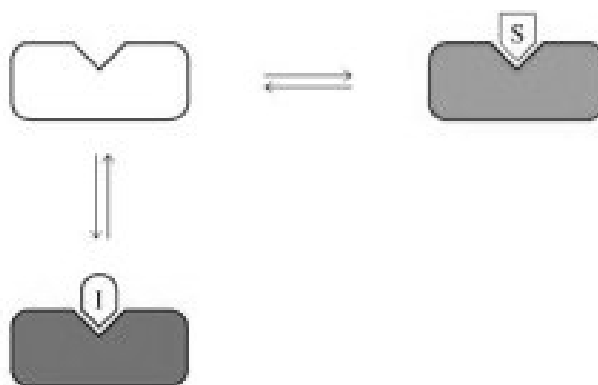
การยับยั้งแบบไม่ผันกลับ (Mechanism-based inhibition หรือ Irreversible inhibition)

การยับยั้งแบบไม่ผันกลับเกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการที่มี metabolite intermediate complexes เกิดขึ้นทำให้มีการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่าง reactive intermediates กับโปรตีนหรือ heme ของ CYP ปัจจัยสำคัญของการเกิดการยับยั้งแบบนี้คือ เวลา, ความเข้มข้น และ NADPH ที่เกี่ยวข้องรวมทั้งเอนไซม์ที่ทำให้ยาหมดฤทธิ์ (enzyme inactivation) (Halpert,

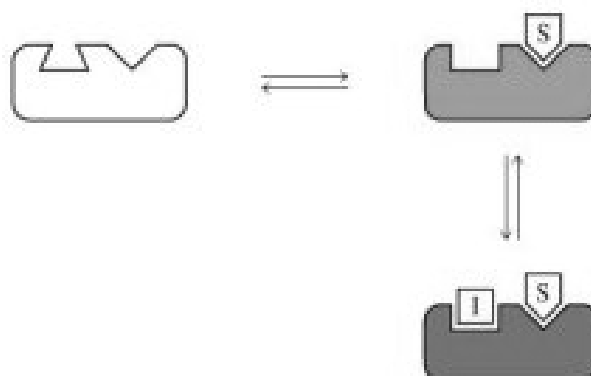
1995; Lin & Lu, 1998) การสิ้นสุดของการยับยั้งแบบนี้เกิดขึ้นเมื่อมีการสังเคราะห์เอนไซม์ขึ้นมาใหม่ ปกติแล้วใช้ระยะเวลาสั้น ในบางครั้งผลึกภัณฑ์ที่เกิดจากการเมแทบอลิฟิชั่นอาจยับยั้งเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างของ Mechanism-based inhibition เช่น การยับยั้ง CYP1A2 ของ furafylline หรือการยับยั้ง CYP3A4 โดย gestodene (Pelkonen *et al.*, 2008)

การยับยั้งแบบผันกลับ (Reversible inhibition)

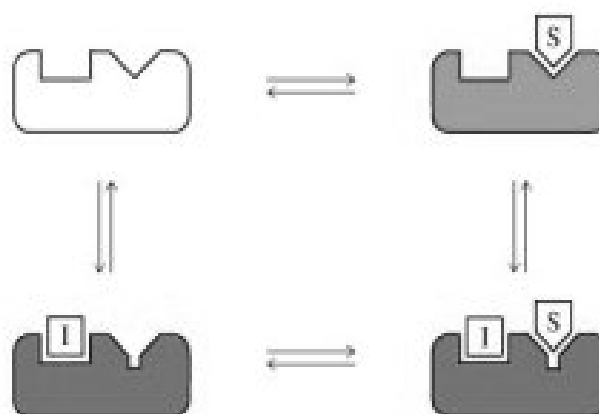
การยับยั้งแบบผันกลับเป็นผลมาจากการแย่งจับกันที่ active site ของเอนไซม์ด้วยพันธะที่อ่อนทำให้ง่ายต่อปลดปล่อยหลังการจับ การยับยั้งแบบผันกลับเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ไม่ถาวร และเอนไซม์ไม่ถูกทำลาย ในการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) เป็นการแย่งจับของซับสเตรตและตัวยับยั้งที่ active site ของเอนไซม์ ส่วนการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) ตัวยับยั้งจับที่ allosteric site ของเอนไซม์แต่ไม่แย่งจับที่ active site ของซับสเตรตแล้วทำให้โครงสร้างเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป และการยับยั้งแบบ uncompetitive inhibition ตัวยับยั้งจะจับกับ enzyme-substrate complex ไม่ไปจับกับเอนไซม์อิสระโดยตรง (ภาพที่ 10) นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งแบบผสม (mix-type) ซึ่งเป็นการยับยั้งทั้งแบบแข่งขันและไม่แข่งขัน (Pelkonen *et al.*, 2008)



(a) competitive inhibition



(b) uncompetitive inhibition



(c) noncompetitive inhibition

ภาพที่ 10 ประเภทของการการยับยั้งแบบผันกลับ

(<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Enzyme9.html>)

อันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพร (Herb –Drug Interactions)

นอกจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาแล้ว การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและอาหารนั้นก็อาจเกิดขึ้นได้ ส่วนประกอบในอาหารบางชนิดมีผลกับยาที่ผู้ป่วยรับประทานอยู่เป็นประจำ เช่นกัน เช่น น้ำเกรฟฟรุต มีผลทำให้ค่าระดับยาสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) และ พื้นที่ใต้กราฟของระดับยาในพลาสมา (AUC) ของยาที่ยับยั้งตัวรับเบต้ากลุ่ม dihydropyridine (dihydropyridine β -blocking agent) มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในน้ำองุ่นยับยั้ง CYP3A4 (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001) นอกจากนี้การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพรก็เป็นอีกสิ่งหนึ่งที่พึงระวังเช่นกัน เนื่องจากปัจจุบันการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคนั้นเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้นเนื่องจากเป็นสารธรรมชาติและปลอดภัย โดยส่วนใหญ่มักใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบัน ทำให้อาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพรได้ เนื่องจากสมุนไพรนั้นมีส่วนประกอบหลายอย่าง ดังนั้นการใช้สมุนไพรร่วมกับยาแผนปัจจุบันนั้นเป็นสิ่งที่ควรระวัง โดยเฉพาะยาที่มีค่า therapeutic index แคบ จากการรายงานที่ผ่านมาพบว่าสมุนไพรที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายที่ทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยา แสดงในตารางที่ 4 โดยมีรายละเอียด ดังนี้

- St John's wort (*Hypericum perforatum*) เป็นสมุนไพรที่นิยมใช้ในการรักษาโรคซึมเศร้า (depressin) โดยมี hyperforin เป็นส่วนประกอบหลัก เมื่อให้สมุนไพรนี้ในการรักษาเป็นยาเดี่ยว (monotherapy) พบว่ามีความปลอดภัย แต่เมื่อให้ร่วมกับยาอื่นพบว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาแผนปัจจุบันเนื่องจาก St John's wort นั้นเหนี่ยวนำ CYP3A4, CYP2E1 และ CYP2C19 แต่ไม่มีผลต่อ CYP1A2, CYP2D6 หรือ CYP2C9
- Ginkgo (*Ginkgo biloba*) เป็นสมุนไพรที่นิยมใช้ในด้านเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำและมีฤทธิ์ในการต้านเกร็ดเลือด โดยทำให้เกิดเลือดไหลไม่หยุด (bleeding) เมื่อให้ร่วมกับยา warfarin, ibuprofen, rofecoxib หรือ aspirin หรือทำให้เกิดอาการโคม่าเมื่อทานร่วมกับยา trazodone เมื่อทดลองให้สารสกัดจากแปะก๊วยในหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าทำให้ปริมาณของ CYP เพิ่มขึ้นตามขนาดและเวลาที่ให้สารสกัดและทำให้การแสดงออกของ CYP2B1, 2B2, 3A1 และ 3A2 ในตับเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้แปะก๊วยยังสามารถเหนี่ยวนำ CYP2C19
- Ginseng (*Panax ginseng*) นิยมใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีสรรพคุณหลายอย่าง เช่น ช่วยลดความดัน (antihypertension), ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation), ช่วยป้องกันเซลล์สมอง (neuroprotection), ช่วยเพิ่มความจำ, ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน เป็นต้น พบว่า ginseng มีผลต่อการทำงานของเกร็ดเลือด หรือทำให้เปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์และ

เภสัชพลศาสตร์ จนทำให้เกิดการเป็นพิษของยา warfarin นอกจากนี้ยังทำให้เกิดอาการนอนไม่หลับ (insomnia), ปวดหัว, อารมณ์แปรปรวน (mania) เมื่อทานร่วมกับยา Phenelzine ซึ่งเป็นยารักษาอาการซึมเศร้า (antidepressant drug) เมื่อทำการศึกษาในมนุษย์ พบว่าไซมไม่มีผลต่อ CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1 และ CYP2D6 แต่มีผลยับยั้ง CYP2D6

- *Garlic (Allium sativum)* เป็นสมุนไพรที่ช่วยรักษาภาวะไขมันในเลือดสูง (hypercholesterolemia), ป้องกันภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (arteriosclerosis), ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน ควรระวังในการรับประทานกระเทียมร่วมกับยาที่เป็นยับยั้งของ CYP 2E1 หรือทานร่วมกับยาต้านรีโทรไวรัส (antiretroviral drugs) จากการทดสอบในอาสาสมัครสุขภาพดีพบว่ากระเทียมทำให้ลดระดับยาในเลือด (plasma concentration) ของยา Saquinavir หลังจากทานกระเทียมเป็นเวลา 3 อาทิตย์ นอกจากนี้ยังพบว่ากระเทียมยับยั้ง CYP2E1 แต่ไม่มีผลต่อ CYP1A2, CYP3A4 หรือ CYP2D6

(Hu et.al., 2005; Izzo & Ernst., 2009; Zhou et.al., 2003)

ตารางที่ 4 อันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรและยาแผนปัจจุบัน (Hu et.al., 2005)

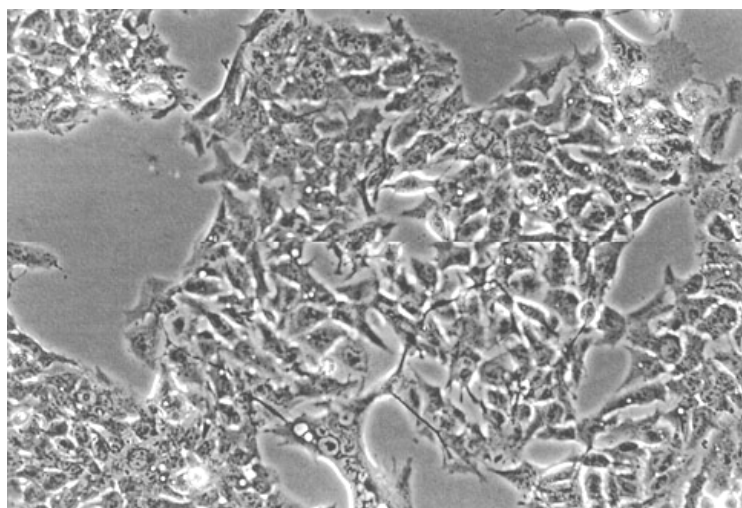
Herbal medicine	Prescribe drug
St John's wort (<i>Hypericum perforatum</i>)	Amitriptyline, Alprazolam, Midazolam, Carbamazepine, Cyclosporin, Dextromethorphan, Digoxin, Fexofenadine, Imatinib, Irinotecan, Methadone, Protease Inhibitors, Oral Contraceptives, Quazepam, Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, Simvastatin, Pravastatin, Tacrolimus, Theophylline, Mycophenolate Mofetil, Warfarin, Phenprocoumon
Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>)	Trazodone, Warfarin, Aspirin, Ibuprofen, Digoxin, Omeprazole, Antihypertensive Agents, CNS Drugs, Antihyperglycaemics
Ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	Alcohol (Ethanol), Phenelzine, Warfarin, Vaccines
Garlic (<i>Allium sativum</i>)	Dextromethorphan, Alprazolam, Midazolam, Saquinavir, Ritonavir, Warfarin, Chlorpropamide, Paracetamol

การศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยา

ในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงยาของสารทดสอบสามารถหาได้จากการวัดอัตราการหายไปของซับสเตรตหรือการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารเมแทบอไลต์ ซึ่งทดสอบได้ด้วยการบ่มสารทดสอบกับเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับซับสเตรตที่จำเพาะเจาะจงกับ CYP นั้น หรือบ่มสารทดสอบกับเนื้อเยื่อที่ทำการโคลนหรือมีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP แล้วประเมินการเมแทบอไลต์ หรือเติมตัวยับยั้งที่เจาะจงกับ CYP นั้นๆ แล้วดูการเปลี่ยนแปลงอัตราในการเมแทบอไลต์ ซึ่งเทคนิคการศึกษาภายนอกร่างกาย (in vitro) ที่ใช้ศึกษาเอนไซม์ CYP 450 ที่เกี่ยวข้องอย่างจำเพาะเจาะจงในการเมแทบอไลต์ยาที่ทดสอบหรือประเมินความเป็นไปได้ในการเป็นตัวยับยั้งหรือตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ในการทดสอบอาจใช้เนื้อเยื่อตับของมนุษย์หรือสัตว์ทั้งในรูปแบบ liver slices จนถึงเซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐภูมิของมนุษย์ หรือ subcellular fractions ของเนื้อเยื่อตับ รวมทั้งการโคลนเซลล์ยีสต์, แบคทีเรีย หรือแมลง ที่มีเอนไซม์จำเพาะของ CYP 450 (Glue & Clement, 1999)

รูปแบบการศึกษาศมรรถนะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงยาที่นิยมใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในเซลล์ทดลอง human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line (ภาพที่ 11) ซึ่งได้มาจากมะเร็งตับของมนุษย์ชาวคอเคเซียน (Caucasian human hepatoblastoma) ที่ทำการพัฒนามาเพื่อใช้ทดแทนเซลล์ตับของมนุษย์ (fresh human hepatocyte) เซลล์นี้ถูกเพาะเลี้ยงขึ้นครั้งแรกในปี 1979 (Brandon *et.al.*, 2003) เพื่อใช้ในการทดสอบแบบคัดกรอง (screening) ด้านพิษวิทยา รวมถึงใช้ในการศึกษาการวัดเมแทบอลิซึมและความเป็นพิษของยา (Hewitt & Hewitt, 2004) เซลล์ HepG2 มีเอนไซม์ทั้งใน Phase I (cytochrome P450-dependent monooxygenase) และ Phase II (glucuronic- และ sulfate-conjugation) (Dehn *et.al.*, 2004) จากการศึกษาที่นำเอาเซลล์นี้มาใช้ตรวจความเป็นพิษของเซลล์ (cytotoxicity) พบว่า 70% ของสารที่ทราบว่าเป็นพิษทั้งการศึกษาภายนอกร่างกายที่ทดลองเซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐภูมิ และการศึกษาภายในร่างกาย (in vivo) ที่ทดลองในหนูแรทหรือในการทดสอบระยะก่อนคลินิก (pre-clinical study) สามารถตรวจพบได้ในเซลล์ HepG2 เช่นกัน (Westerink & Schoonen, 2007) อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะของการเลี้ยงเซลล์ทั่วไป ระดับการทำงานของ CYP ภายในเซลล์มีน้อยมากแทบจะไม่สามารถวัดได้ CYP หลาย isoform สามารถเหนี่ยวนำโดยการ pretreatment ด้วยสารที่ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ (inducing agent) เช่น เมื่อทำการเหนี่ยวนำด้วย rifampicin มีผลทำให้ระดับของ CYP 3A เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (Brandon *et.al.*, 2003) อย่างไรก็ตามสมรรถนะของเอนไซม์นั้นยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา

ของเซลล์และสภาวะการเลี้ยงเซลล์ (Hewitt & Hewitt, 2004) รวมทั้งส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญด้วยเช่นเดียวกัน ข้อดีของการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงตับเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐมภูมิของมนุษย์ (primary hepatocytes) คือ เซลล์เพาะเลี้ยงง่ายกว่า และเอนไซม์มีปริมาณที่คงที่กว่า (Brandon *et.al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงตับมีเอนไซม์ที่ CYP ต้องการเพื่อช่วยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสาร คือ NADPH CYP reductase และ cytochrome b5 (Hashizume *et.al.*, 2010) ส่วนด้านข้อเสีย คือ การแสดงออกของเอนไซม์ CYP นั้นมีน้อยซึ่งจะเป็นตัวจำกัดในการใช้งาน (Otto *et.al.*, 2008)



ภาพที่ 11 Morphology ของเซลล์ human hepatoma HepG2 cell line

(<http://akatsukiotoko.blogspot.com/2010/03/i-and-hepg2.html#!/2010/03/i-and-hepg2.html>)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

- 1. สิ่งสกัด :** ใบว่านพญาวานร ซึ่งได้จากสวนว่านพญาวานร จังหวัดปทุมธานี ทำการสกัดในห้องปฏิบัติการเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับคำแนะนำจากรศ. ดร. ชัยโย ชัยชาญพิทยุทธ
- 2. เซลล์ทดสอบ :** เซลล์ HepG2
- 3. สารเคมี**
 - Acrylamide, ammonium persulfate, agarose, bovine serum albumin (BSA), butylated hydroxytoluene, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), dihydrocoumarin (DHC), dimethylsulfoxide (DMSO), ethidium bromide (EtBr), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), rifampicin (RIF), ponceau S, sodium bicarbonate, sodium citrate, sodium hydroxide, sodium phosphate dibasic anhydrous, sodium phosphate dibasic heptahydrate, sodium phosphate monobasic anhydrous, tris [hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride, triton X-100, β -sitosterol (BSS) (Sigma, USA)
 - chloroform, disodium hydrogen phosphate, ethanol, glycerol, hydrochloric acid, isopropanol, methanol, phenyl acetate, potassium chloride, sodium chloride, sodium dodecyl sulfate (SDS), trichloroacetic acid, tween 20 (Merck, Germany)
 - Potassium dihydrogen phosphate, di-potassium hydrogen phosphate (Fluka, Switzerland)
 - Fetal bovine serum, L-glutamine, penicillin & streptomycin, Protein kit assay และ Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (GIBCO, USA)
 - mouse monoclonal β -actin antibody, goat anti mouse peroxidase-conjugated secondary antibody, mouse monoclonal CYP3A4 antibody (Santa Cruz, USA)
 - SuperSignal[®] West Pico chemilluminiscent substrate (ThermoScientific, USA)

- Taq DNA polymerase (500 U/ul), Page RulerTM Prestained Protein Ladder, GeneRulerTM 100 bp DNA ladder (Fermentus Life Sciences, USA)
- SYBR green I sDNA-nucleic acid gel stain dye (Bio Basic Inc, Canada)
- HybondTM-ECLTM nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences UK Limited, UK)
- Amersham HyperfilmTM ECL high performance chemiluminescence film (GE Healthcare Limited, UK)
- Carbon dioxide gas (Thai Industrial Gases Public Company, Ltd., Thailand)
- P450-Gloassay CYP3A4 substrate (Luciferin-IPA), CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA)

สารเคมีและตัวทำละลายทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้เป็น analytical grade

4. อุปกรณ์

- Adjustable pipette 1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl and 100-1000 µl (Gilson, France)
- analytical balance (Precisa, Switzerland)
- electrophoresis (Bio Rad, USA)
- cell culture dish: diameter 100 mm, 6-well cell culture plate, 96- well cell culture plate และ 24- well cell culture (Costa, USA)
- centrifuge (Beckman Microfuge, Germany)
- CO₂ incubator (ThermoForma Scientific, USA)
- conical tube: 15 & 50 ml (Corning Incorporation, USA)
- densitometry scanner (Canon, Japan) ที่มีโปรแกรม image J (HIH, Maryland)
- Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, USA)
- ELISA microplate reader (Beckman coulter, USA)
- Enhanced Chemiluminescence (ThermoScientific, USA)
- freezer -80 °C (Thermoelectron, USA)
- hemocytometer (Resistant, Germany)
- hot plate (Labnet, USA)

- light microscope (Olympus, Japan)
- Mikro 22R centrifuge (Hettich, Germany)
- millipore filter 0.22 μm (Millipore, USA)
- multichannel pipettors (Gilson, France)
- pH meter (Therma, Canada)
- real time RT-PCR with iQ TM reagent optical system software version 2.0 (Bio Rad, USA)
- serological pipette: 5 ml, 10 ml (Costar, USA)
- timer
- spectrofluorometer (Jasco Model FP-777, Germany)
- UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)
- UV transilluminator gel documentation (Syngene, UK)
- Vortex mixer (CT Laboratory Clay Adams, USA)
- Horizontal electrophoresis (Bio Rad, USA)
- Vertical electrophoresis (Bio Rad, USA)
- power supply (Bio Rad, USA)
- Vertical laminar flow cabinet (Microflow, UK).
- Syringe Filter

5. สถานที่ดำเนินงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมสิ่งสกัด

ตามวิธีการของ พีริชฌ์และคณะ, 2009 โดยนำมาปรับเพื่อความเหมาะสม ดังนี้

1. ใบสดของ *P. palatiferum* 5 กิโลกรัม ปั่นพร้อม 95% เอทานอล ปริมาตร 10 ลิตร
2. หมัก (maceration) ในถังหมัก เป็นเวลา 7 วัน
3. กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator
4. เทใส่ถ้วยกระเบื้อง แล้วนำไปวางบน water bath ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 วัน
5. นำไป freeze dryer จนแห้ง แล้วทำการบดให้เป็นผง
6. เก็บสิ่งสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

2. การตรวจสอบคุณสมบัติของสิ่งสกัด

2.1 การหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Quantitative analysis of total phenolic compounds)

ใช้หลักการของ Folin-Ciocalteu method โดย Folin-Ciocalteu reagent จะทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิกได้สารประกอบ tungsten & molybdenum blue ที่มีสีน้ำเงิน (Singleton and Rossi, 1965) ทำการทดลองตามวิธีการของ Slinkard & Singleton, 1977 โดยนำมาปรับเพื่อความเหมาะสม ดังนี้

- 2.1.1 เติมสิ่งสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 20 μ l และน้ำ 1.58 ml ลงในหลอดทดลอง
- 2.1.2 เติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 μ l เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 4 นาที
- 2.1.3 เติมสารละลาย Na_2CO_3 (200 mg/ml) ปริมาตร 300 μ l เขย่าให้เข้ากัน
- 2.1.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm
- 2.1.5 ทำการคำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid แสดงผลเป็น gallic acid equivalent (mg gallic acid/g dried extract)

2.2 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Quantitative analysis of total flavonoid compounds)

ใช้หลักการของ Aluminum chloride colorimetric assay method โดยอะลูมิเนียมคลอไรด์จะจับกับ orthodihydroxyl groups ของ A- หรือ B-ring ของฟลาโวนอยด์แล้วกลายเป็นอนุพันธ์ของกรด (acid complexes) (Chang *et.al.*, 2002) ทำการทดลองตามวิธีการของ Ardestani & Yazdanparast, 2007 โดยนำมาปรับเพื่อความเหมาะสม ดังนี้

- 2.2.1 เติมสิ่งสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 0.25 ml และน้ำ 1 ml ลงในหลอดทดลอง
- 2.2.2 เติมสารละลาย 15% NaNO₂ ปริมาตร 0.075 ml ทิ้งไว้ 6 นาที
- 2.2.3 เติมสารละลาย 10% AlCl₃ ปริมาตร 0.075 ml ทิ้งไว้ 6 นาที
- 2.2.4 ทำการเติมสารละลาย 4% NaOH ปริมาตร 1 ml และน้ำ 5 ml ทันที เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาที
- 2.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ทำการคำนวณ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ catechin แสดงค่าเป็น catechin equivalent (mg catechin/g dried extract)

2.3 การหาปริมาณสาร β -sitosterol ในสิ่งสกัดด้วยเครื่อง GC (Quantitative analysis of β -sitosterol by Gas chromatography)

ตามวิธีการของ Zhang *et.al.*, 2005 โดยนำมาปรับเพื่อความเหมาะสม ดังนี้

- 2.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน β -sitosterol ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 ppm โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย
- 2.3.2 เตรียมสารละลายสิ่งสกัดความเข้มข้น 2 mg/ml โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย
- 2.3.3 กรองสารละลายสิ่งสกัดด้วยหัวกรองสำเร็จรูป (Syringe Filter)
- 2.3.4 ฉีดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างเข้าเครื่อง GC โดยสภาวะของเครื่องมีดังนี้
 - คอลัมน์ : capillary column
 - ดีเทคเตอร์ : Flame Ionization Detector (FID)
 - เฟสเคลื่อนที่ : แก๊สฮีเลียม
 - ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด : 1 μ l

2.4 การทำ Fingerprint ของสารสกัด ด้วยเครื่อง HPLC (Chromatographic fingerprint analysis of extract by high-performance liquid chromatography)

ตามวิธีการของ Thakur *et.al.*, 2009 โดยนำมาปรับเพื่อความเหมาะสม ดังนี้

- 2.4.1 เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 5 mg/ml โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย
- 2.4.2 กรองสารละลายสิ่งสกัดด้วยหัวกรองสำเร็จรูป (Syringe Filter)
- 2.4.3 ฉีดสารละลายสารสกัดเข้าเครื่อง HPLC โดยสภาวะของเครื่องมีดังนี้

- คอลัมน์ : Vertisep UPS C18 HPLC Column
- ดีเทคเตอร์ : UV-VIS Detector (370 nm.)
- เฟสเคลื่อนที่ : Methanol : Acetonitrile (25:75)
- อัตราเร็ว : 1.2 ml/min
- ระยะเวลา : 20 นาที
- ความดัน : 750 psi
- ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด : 20 μ l

การเตรียมสารละลายของสารทดสอบ

สิ่งสกัดจาก *P. palatiferum* ทำการละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสิ่งสกัดอยู่ใน 0.5% DMSO และสาร β -sitosterol ทำการละลายในเอทานอล โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสิ่งสกัดอยู่ใน 0.5% Ethanol และมี dexamethasone (DEX) เป็น positive control

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ HepG2 cell โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) ที่มี 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), 200mM L-glutamine, 10,000 units/ml penicillin และ 10,000 μ g/ml streptomycin ในตู้บัพที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C ทำการเปลี่ยน media ทุก 3-4 วัน และ subculture ทุก 4-5 วัน เมื่อเซลล์มี confluence ประมาณ 70-80%

3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบ (Cytotoxicity effect of test compound)

เพื่อหาความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสิ่งสกัดและสาร β -sitosterol โดยใช้วิธี MTT assay นำเซลล์ที่เพาะไว้นาน 24 ชั่วโมง ทดสอบกับสารทดสอบหรือตัวทำละลาย (กลุ่มควบคุม) มาทำปฏิกิริยากับ MTT โดย MTT จะเปลี่ยนเป็น formazan โดยเอนไซม์ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (Mohamed & El-Kadi, 2009) วิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Baliharova *et.al.*, 2003 ดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์ใน 96 well plates โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 22,000 cells/well
2. หลังจากนั้น 24 ชม. ทำการทดสอบเซลล์ด้วยสิ่งสกัดจาก *P. palatiferum* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$ หรือ β -sitosterol ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 และ 50 μM
3. นำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
4. เมื่อครบตามกำหนดเวลา ทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง
5. เติม DMEM แล้วจึงเติมสารละลาย MTT ใน phosphate buffer (5 mg/ml) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 mg/ml
6. นำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดเอา medium ออก แล้วเติม DMSO 100 $\mu\text{l/well}$
7. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ absorbance ที่ 570 nm. คำนวณหาค่า % control ดังนี้

$$\% \text{ control} = \frac{A_{\text{sample}} \times 100}{A_{\text{control}}}$$

หมายเหตุ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

4 การทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4 (Determination of CYP3A4 enzyme activity)

เป็นการทดสอบการเหนี่ยวนำ CYP3A4 โดยการบ่มสารทดสอบกับเซลล์แล้วเปรียบเทียบกับกลุ่ม positive control และกลุ่มควบคุม โดยทำการตรวจวัดที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการใส่ substrate ของ CYP3A4 ลงไป CYP จะเปลี่ยน substrate ไปเป็น product ซึ่งเกิดการเรืองแสงแล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง Luminometer วิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Miranda *et.al.*, 2007 ดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์ลงใน 24 well plates โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 150,000 cells/well
2. หลังจากนั้น 24 ชม. ทำการทดสอบเซลล์ด้วยสิ่งสกัดจาก *P. palatiferum* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1, 5, 10 และ 25 µg/ml หรือ β-sitosterol ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 µM หรือ DEX ความเข้มข้น 50 µM เป็น positive control
3. นำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
4. เมื่อครบตามกำหนดเวลา ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
5. ทำการวัด activity โดยใช้ P450-Glo assay ตามเอกสารที่แนะนำวิธีการตรวจวัด โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3 µM luciferin-IPA นำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชม. แล้วนำไปวัดการเรืองแสง
6. หลังจากนั้นเซลล์ที่เหลือทำการวัดจำนวนเซลล์โดยใช้ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay เพื่อ normalize CYP activity ด้วย จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต
7. คำนวณหาค่า fold induction ดังนี้

$$\text{Fold induction} = \frac{L_{\text{sample}} - L_{\text{background}}}{L_{\text{control}} - L_{\text{background}}}$$

หมายเหตุ L คือ ค่าการเรืองแสง (Luminescence values)

5 การหาปริมาณ CYP3A4 mRNA โดยวิธี Real time-PCR (Real time-PCR analysis of CYP3A4 mRNA)

เป็นการตรวจหาปริมาณ RNA ของ CYP3A4 จากเซลล์ที่บ่มด้วยสารทดสอบแล้วเปรียบเทียบกับกลุ่ม positive control และกลุ่มควบคุม โดยการตรวจและเพิ่มจำนวน RNA วิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Ohno *et.al.*, 2009 และ Sergent *et.al.*, 2009 ดังนี้

1. ทำการเลี้ยงเซลล์ใน 6 well plate โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^6 cells/well
2. หลังจากนั้น 24 ชม. ทำการทดสอบเซลล์ด้วยสิ่งสกัดจาก *P. palatiferum* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ หรือ β -sitosterol ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 μM หรือ DEX ความเข้มข้น 50 μM ซึ่งเป็น positive control บ่มเป็นเวลา 12 และ 24 ชม.
3. เมื่อครบตามกำหนดเวลา ล้างด้วย PBS ที่เย็น และทำการสกัด RNA โดยใช้ TRIzol reagent และทำการวัดปริมาณ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm. โดยใช้ spectrophotometer
4. ใช้ RNA 1 μg มาสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ iScript Select cDNA synthesis Kit ซึ่งใช้ oligo(dT) เป็น primer
5. ทำ Real-time PCR reactions โดยใช้เครื่อง iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System ใช้ SYBR[®]Green I เป็น fluorescent reporter โดยมีส่วนผสมดังนี้ 0.05 U/ μl Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTP mix, 1x reaction buffer, 2.08 mM MgCl_2 , SYBR Green I sDNA acid gel stain dye, 1 pmol/ μl of each specific primer (ตารางที่ 5) และ cDNA โดย primer CYP3A4 มาจาก Krusekopf *et.al.*, 2003 ใช้ Actin เป็น internal control
6. Amplification programs ดังนี้ ขั้นตอนการ denature ใช้อุณหภูมิ 94°C เวลา 30 วินาที, ขั้นตอนการ annealing ใช้อุณหภูมิ 56.6 °C เวลา 15 วินาที, ขั้นตอนการ extension ใช้อุณหภูมิ 72°C เวลา 40 วินาที โดยทำทั้งหมด 35 cycle normalize โดยใช้ Actin คำนวณ threshold cycle (Ct) โดยใช้ iQTM reagent optical system software version 2.0. ความจำเพาะเจาะจงของ amplification ดูได้จาก melt curve analysis.

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของ CYP3A4 และ Beta-actin primer

	Primer sequence
CYP3A4	Forward: 5' - GCC TGG TGC TCC TCT ATC TA -3' Reverse: 5' - GGC TGT TGA CCA TCA TAA AAG -3' Product length: 187 bp (Krusekopf <i>et.al.</i> , 2003)
Beta-actin	Forward: 5' -GCTCGTCGTCGACAACGGCT-3' Reverse: 5' -CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3' Product length: 353 bp (Sreenivasulu, Vijayalakshmi and Sambasivarao, 2010)

6 การหาปริมาณโปรตีน CYP3A4 โดยวิธี Western blot analysis (Western blot analysis of CYP3A4 protein)

เป็นการตรวจหาปริมาณโปรตีน CYP3A4 จากเซลล์ที่บ่มด้วยสารทดสอบแล้วเปรียบเทียบกับกลุ่ม positive control และกลุ่มควบคุม โดยการแยกโปรตีนบนแผ่น SDS-PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วทำการย้ายไปที่แผ่น nitrocellulose หลังจากนั้นจึงทำการตรวจหาโปรตีนโดยใช้ antibody ที่จำเพาะกับ cytochrome P450 3A4 วิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Mohamed & El-Kadi, 2009 ดังนี้

1. ทำการเลี้ยงเซลล์ลงใน petri dishes 100 mm. โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 5×10^6 cells/dishes
2. หลังจากนั้น 24 ชม. ทำการทดสอบเซลล์ด้วยสิ่งสกัดจาก *P. palatiferum* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1 และ 25 $\mu\text{g/ml}$ หรือ β -sitosterol ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 μM หรือ DEX ความเข้มข้น 50 μM ซึ่งเป็น positive control ทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชม.
3. เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำเซลล์มาล้างสองครั้งด้วย PBS ที่เย็น

4. ทำเซลล์แตกเพื่อให้ได้เซลล์ lysate ด้วยวิธีการปั่นด้วย hand held homogenizer วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยใช้ Bradford reagent ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็น standard
5. โปรตีน 100 µg ผสมกับ 2x Sample buffer นำไป denature ที่ 95°C นาน 5 นาที
6. ทำการแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
7. ย้ายโปรตีนที่แยกออกมาไปที่แผ่น nitrocellulose โดยใช้กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
8. แล้วย่นำมาแช่ใน 5% non-fat dry milk ใน Tris buffer saline Tween 20 (TBST) ซ้ำมคืนที่อุณหภูมิ 4°C
9. หลังจากนั้นจึงบ่มด้วย mouse monoclonal CYP3A4 antibody (1:200) ที่จำเพาะเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง 3 ครั้งด้วย TBST
10. แล้วย่นบ่มด้วย goat anti mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5,000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
11. ทำให้มองเห็น band ด้วยวิธี chemiluminescence method วัดความเข้มของ band โดยใช้ ImageJ software โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ Actin เป็น internal control

7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean \pm Standard error of the mean) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) แล้วทดสอบด้วย Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองที่ 1 การตรวจสอบคุณสมบัติของสิ่งสกัด

1.1 ผลการหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Quantitative analysis of total phenolic compounds)

จากการหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu method พบว่า ในสิ่งสกัดมีปริมาณ โดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 205.80 ± 6.95 mg gallic acid/g dried extract ดังตารางที่ 6 โดยมีสมการ $y = 0.899x + 0.017$ จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid ($R^2 = 0.999$)

ตารางที่ 6 ปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสิ่งสกัด (n=3)

ครั้งที่	ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (mg gallic acid/g dried extract)
1	192.44
2	215.80
3	209.12
ค่าเฉลี่ย	205.80
SEM	6.95

1.2 ผลการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Quantitative analysis of total flavonoid compounds)

จากการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay method พบว่าในสิ่งสกัดมีปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 117.47 ± 0.49 mg catechin/g dried extract ดังตารางที่ 7 โดยมีสมการ $y = 2.043x + 0.014$ จากกราฟมาตรฐานของ catechin ($R^2 = 0.998$)

ตารางที่ 7 ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสิ่งสกัด (n=3)

ครั้งที่	ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (mg catechin/g dried extract)
1	117.96
2	116.50
3	117.96
ค่าเฉลี่ย	117.47
SEM	0.49

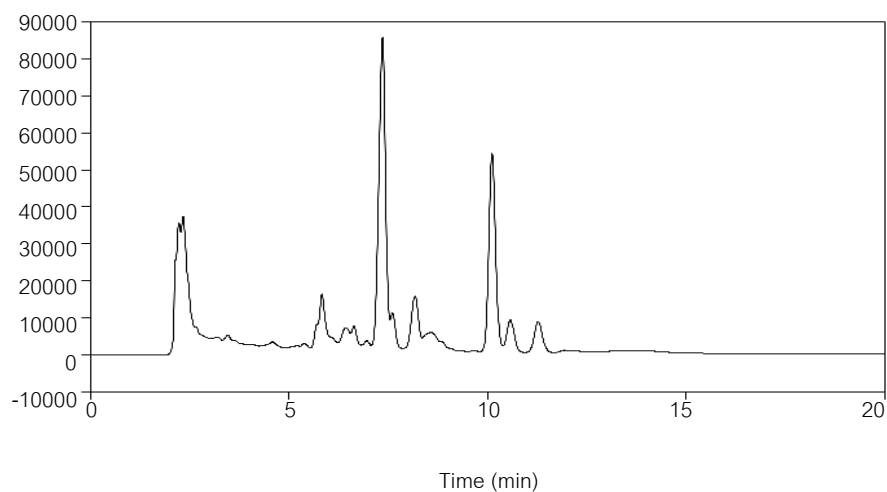
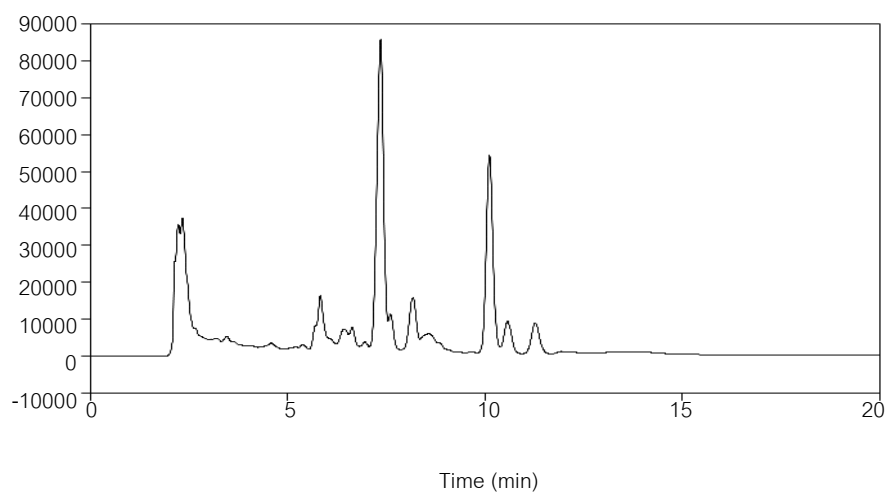
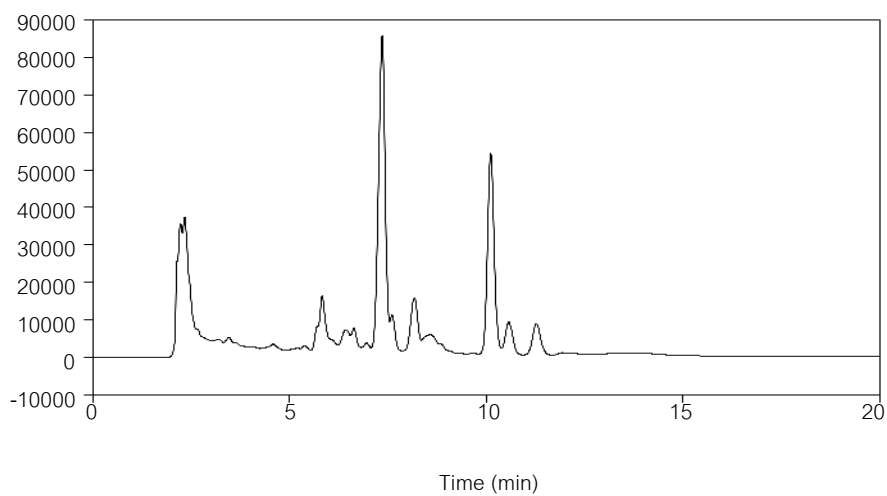
1.3 ผลการหาปริมาณสาร β -sitosterol ในสิ่งสกัดด้วย เครื่อง GC (Quantitative analysis of β -sitosterol by Gas chromatography)

จากการหาปริมาณของสาร β -sitosterol ด้วยเครื่อง GC พบว่าในสิ่งสกัดมีปริมาณของสาร β -sitosterol เท่ากับ 42.39 ± 4.22 mg /g dried extract ดังตารางที่ 8 โดยมีสมการ $y = 476.9x - 3760$ จากกราฟมาตรฐานของ β -sitosterol ($R^2 = 0.988$)

ตารางที่ 8 ปริมาณของสาร β -sitosterol ในสารละลายสิ่งสกัด (n=3)

ครั้งที่	ปริมาณของสาร β -sitosterol (mg /g dried extract)
1	39.86
2	36.69
3	50.63
ค่าเฉลี่ย	42.39
SEM	4.22

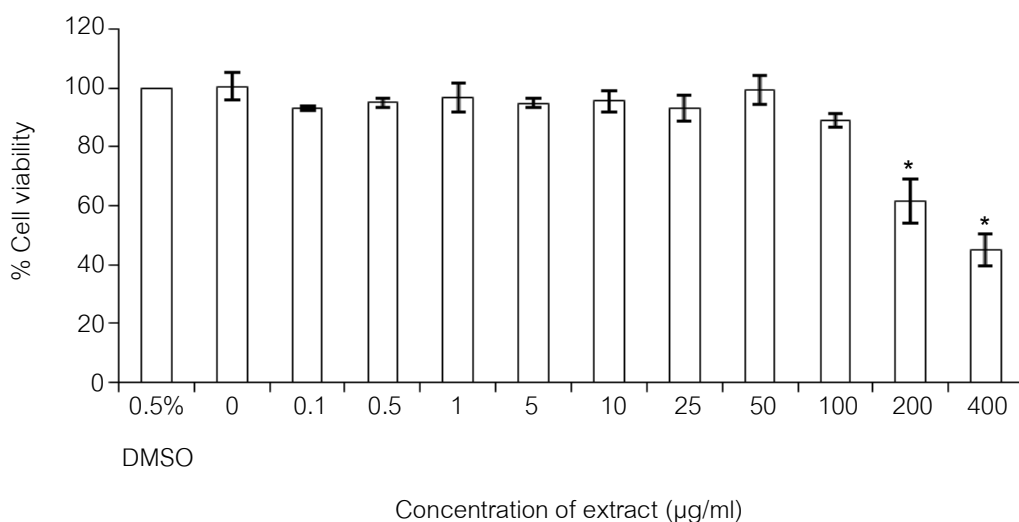
1.4 ผลการทำ Fingerprint ของสิ่งสกัด ด้วยเครื่อง HPLC (Chromatographic fingerprint analysis of extract by high-performance liquid chromatography)



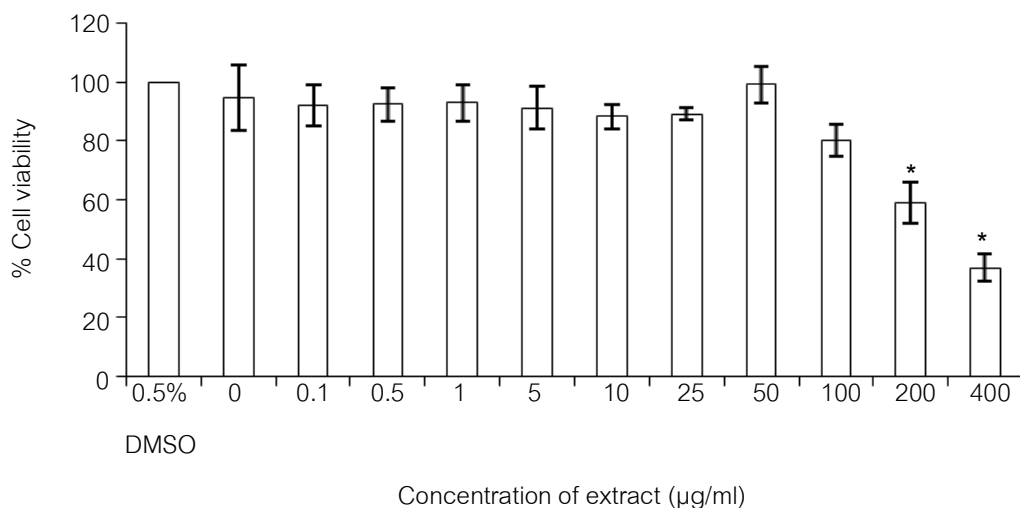
ภาพที่ 12 โครมาโตแกรม Fingerprint ของสิ่งสกัด (n=3)

ผลการทดลองที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบ (Cytotoxicity effect of test compound)

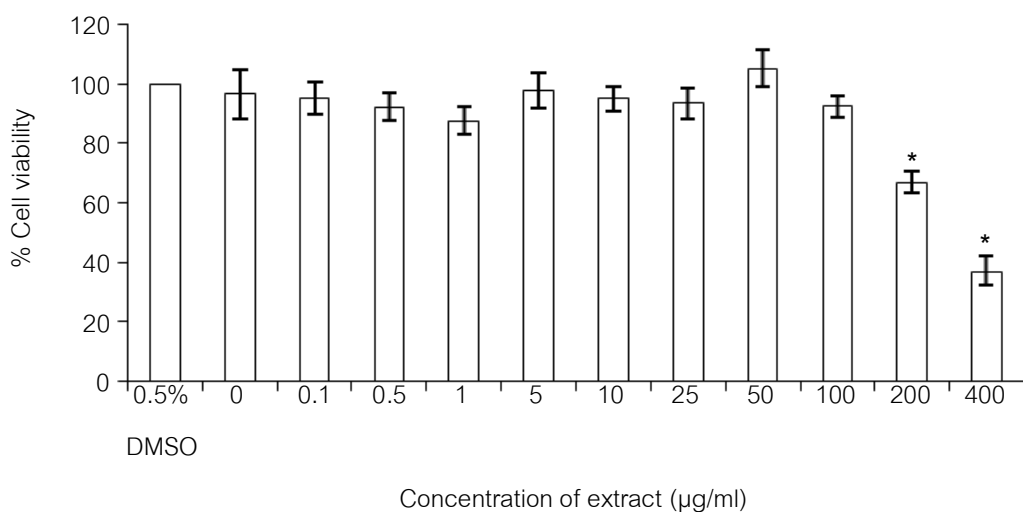
จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 0.1- 100 $\mu\text{g/ml}$ และสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.1 – 1 μM ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 5 μM ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีเซลล์ที่รอดชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 200- 400 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 5 μM ที่เวลา 72 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 10-25 μM ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าทำให้เซลล์มีชีวิตรอดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 13 - 18) โดยจะเห็นได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของสิ่งสกัดและสาร β -sitosterol เพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้เซลล์ที่มีชีวิตรอดลดลง



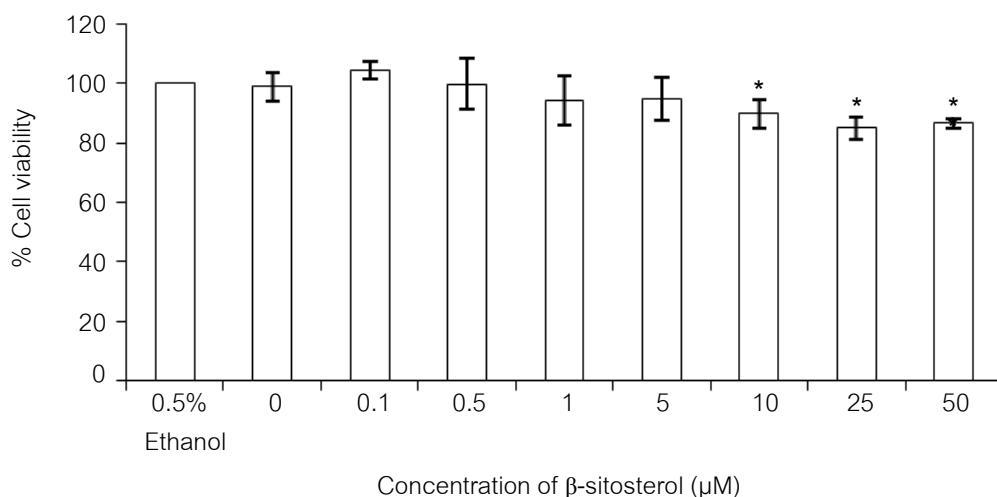
ภาพที่ 13 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 4)
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



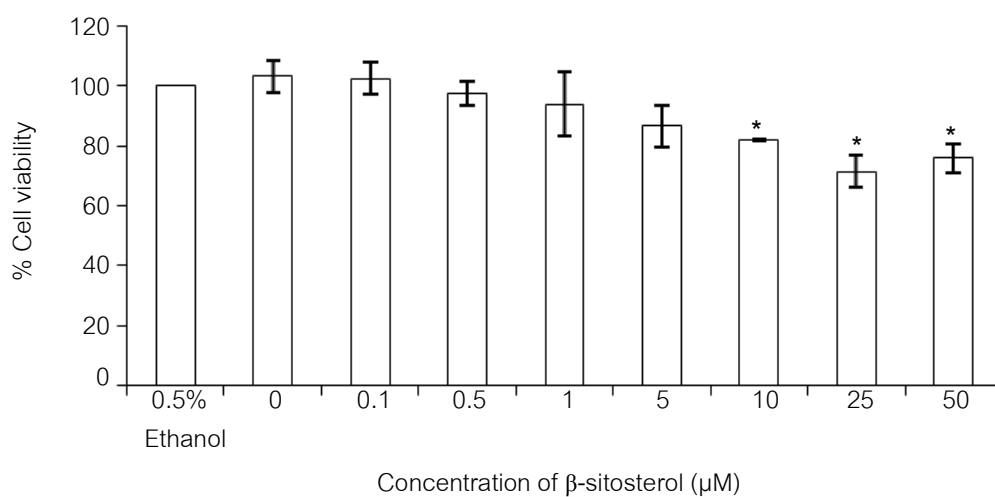
ภาพที่ 14 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 4)
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



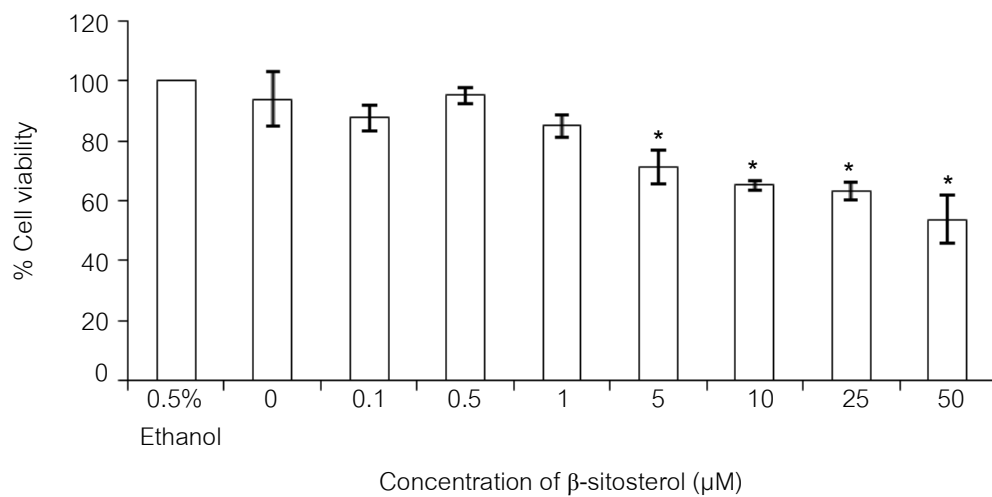
ภาพที่ 15 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 4)
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 16 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



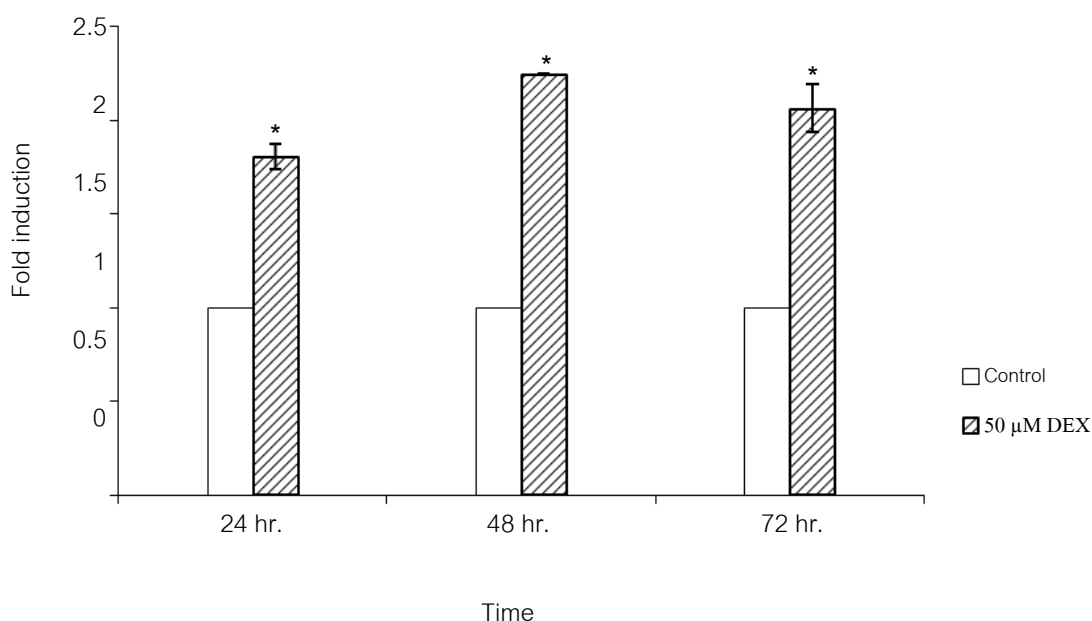
ภาพที่ 17 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



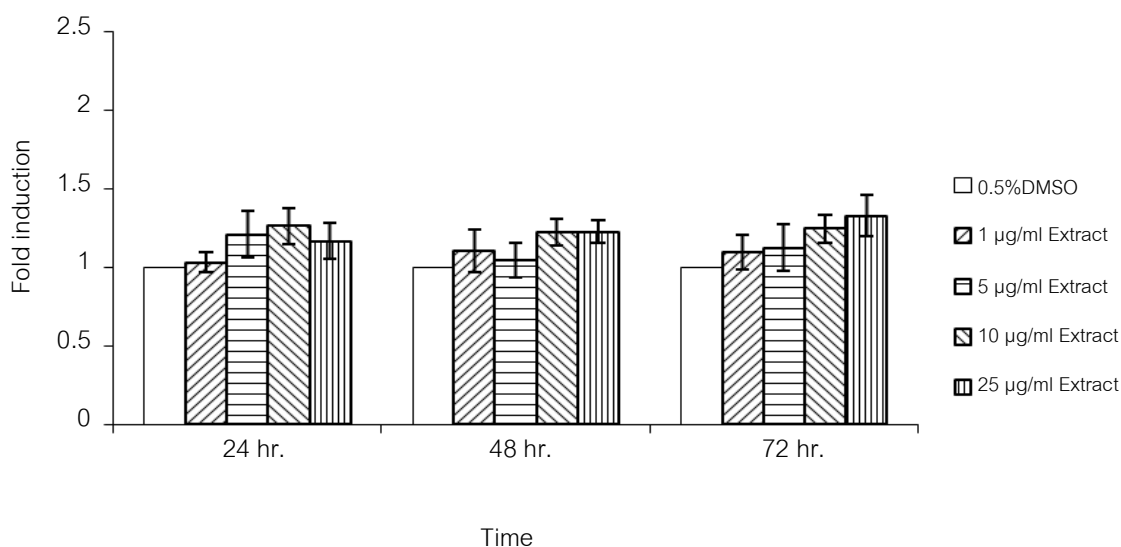
ภาพที่ 18 กราฟแสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลองที่ 3 การทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4 (Determination of CYP3A4 enzyme activity)

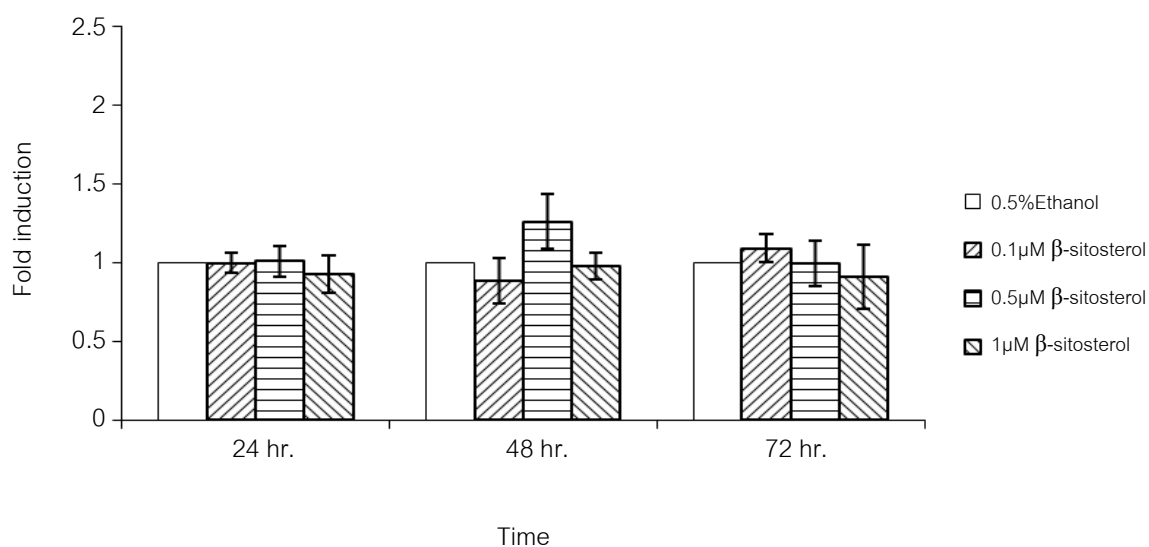
จากการทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4 โดยใช้ P450-Glo assay ซึ่งมี Luciferin-IPA เป็นซับสเตรทของ CYP3A4 พบว่า DEX ที่ความเข้มข้น 50 μM เป็น positive control มีผลทำให้สมรรถนะของ CYP3A4 เพิ่มขึ้น จากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นเป็น 1.81, 2.24 และ 2.06 เท่า ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพที่ 19) สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 1-25 $\mu\text{g/ml}$ และสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.1-1 μM ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่มีผลทำให้สมรรถนะของ CYP3A4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 20 และ 21)



ภาพที่ 19 กราฟแสดงผลของการเหนี่ยวนำ สมรรถนะ CYP3A4 ของสาร dexamethasone ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน



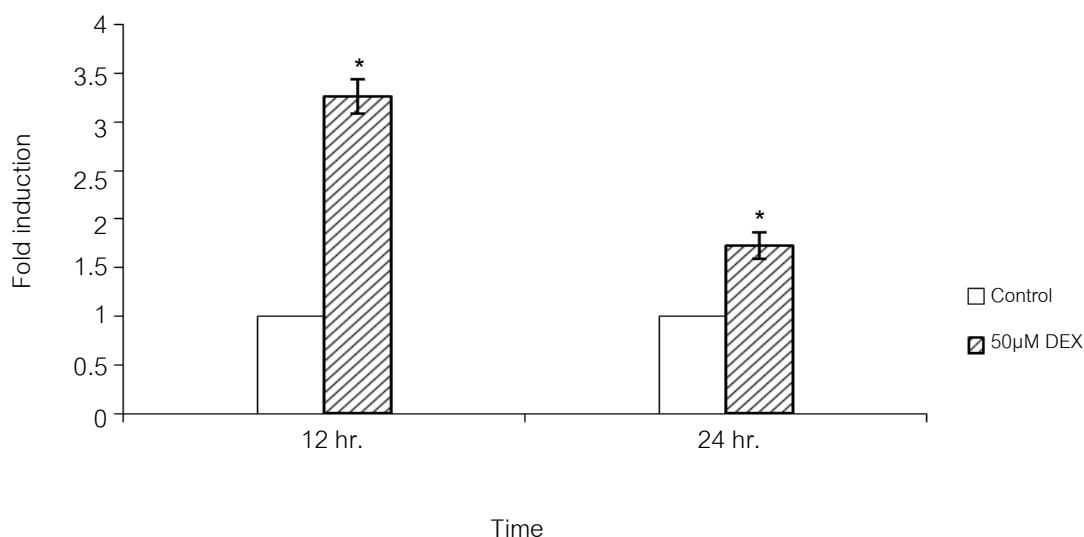
ภาพที่ 20 กราฟแสดงผลสมรรถนะ CYP3A4 ของสิ่งสกัดในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน



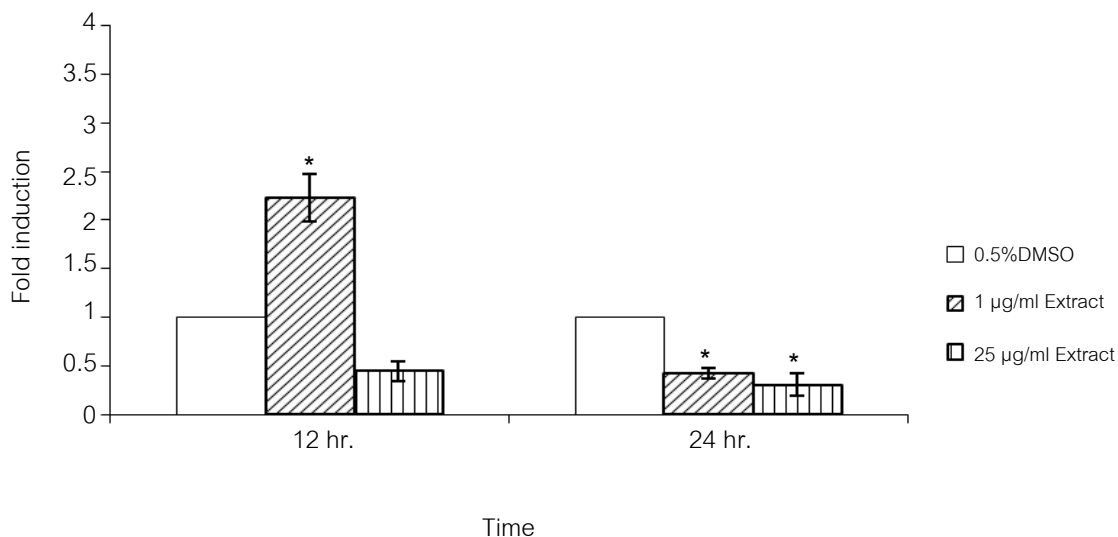
ภาพที่ 21 กราฟแสดงผลสมรรถนะ CYP3A4 ของสาร β -sitosterol ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

ผลการทดลองที่ 4 การหาปริมาณ CYP3A4 mRNA โดยวิธี Real time-PCR (Real time-PCR analysis of CYP3A4 mRNA)

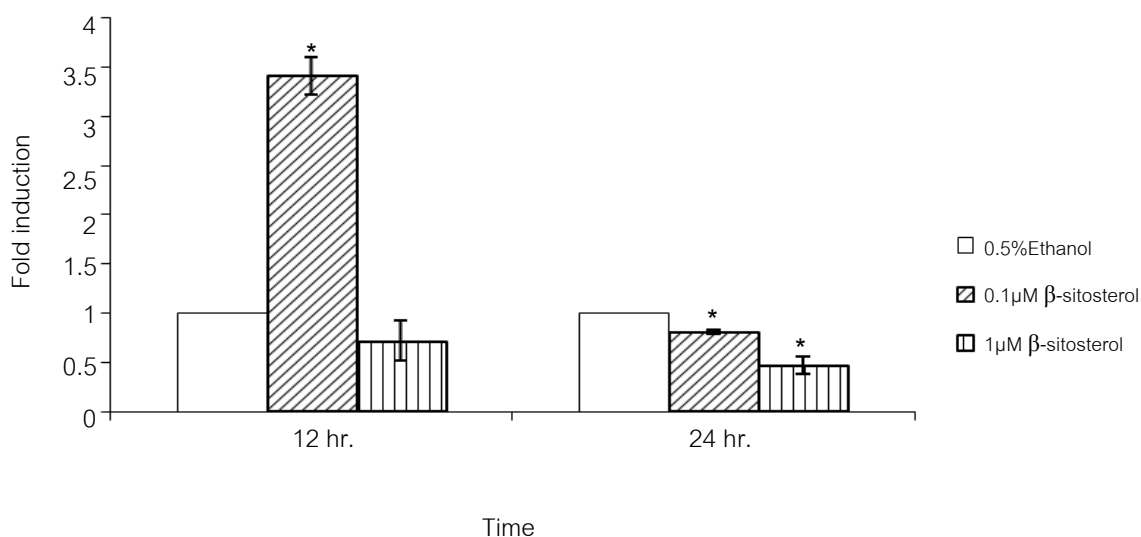
จากการทดสอบการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ด้วยวิธี Real time-PCR พบว่า DEX 50 μ M สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA เพิ่มขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยเพิ่มขึ้น 3.26 และ 1.73 เท่า ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพที่ 22) ทั้งสิ่งสกัดและ β -sitosterol ในความเข้มข้นต่ำมีผลเพิ่มการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ความเข้มข้นสูงกลับมีผลลดการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ DEX ที่การแสดงออกที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ 12 ชั่วโมงมากกว่า 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 23 และ 24)



ภาพที่ 22 กราฟแสดงผล การเหนี่ยวนำ การแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ของสาร dexamethasone ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน



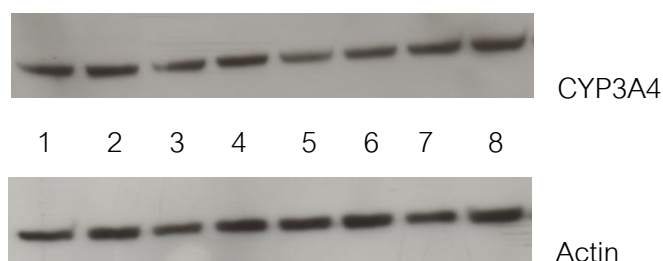
ภาพที่ 23 กราฟแสดงผลการแสดงผลออกของ CYP3A4 mRNA ของสิ่งสกัดในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน



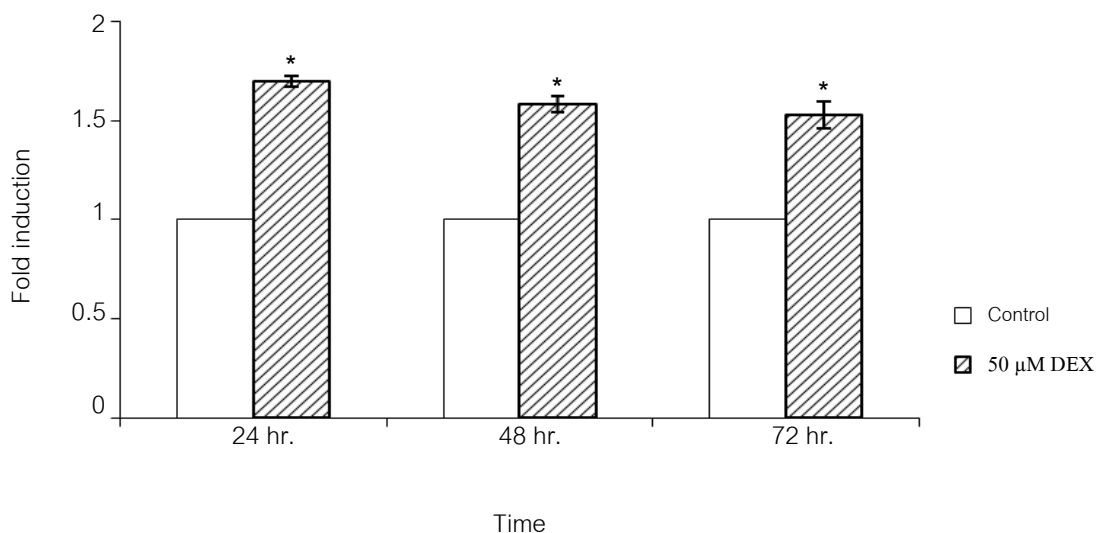
ภาพที่ 24 กราฟแสดงผลการแสดงผลออกของ CYP3A4 mRNA ของสาร β-sitosterol ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

ผลการทดลองที่ 5 การหาปริมาณโปรตีน CYP3A4 โดยวิธี Western blot analysis
(Western blot analysis of CYP3A4 protein)

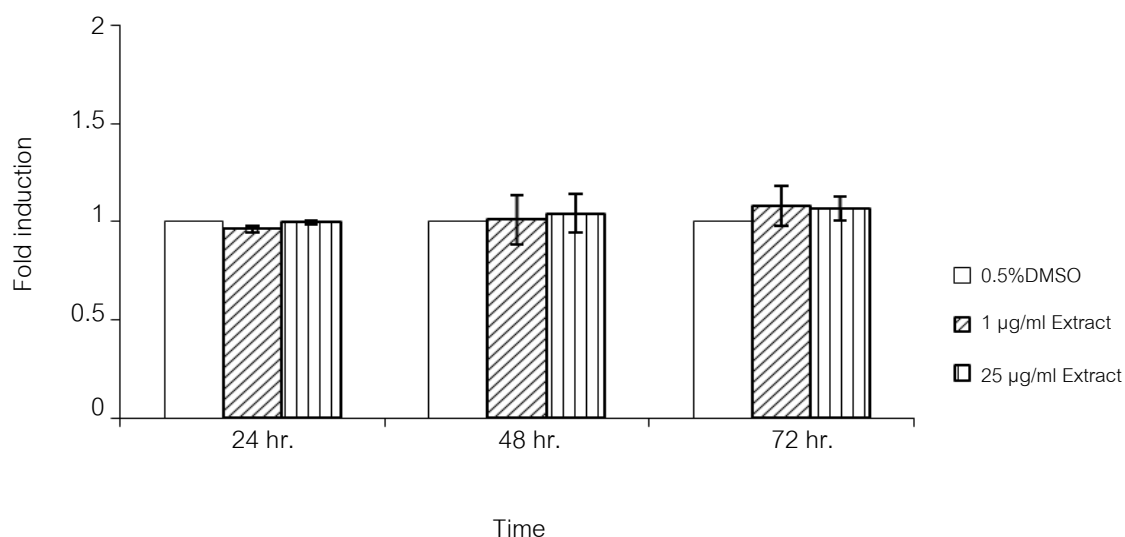
จากการทดสอบปริมาณโปรตีน CYP3A4 โดยวิธี Western blot โดยโปรตีนของ CYP3A4 จะมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 50.5 kDa และ น้ำหนักโมเลกุลของ actin เท่ากับ 43 kDa (ภาพที่ 25) พบว่า DEX 50 μ M ทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเพิ่มขึ้นเป็น 1.70, 1.58 และ 1.53 เท่า ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 26) ขณะที่สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 1 และ 25 μ g/ml และสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 μ M ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 27 และ 28)



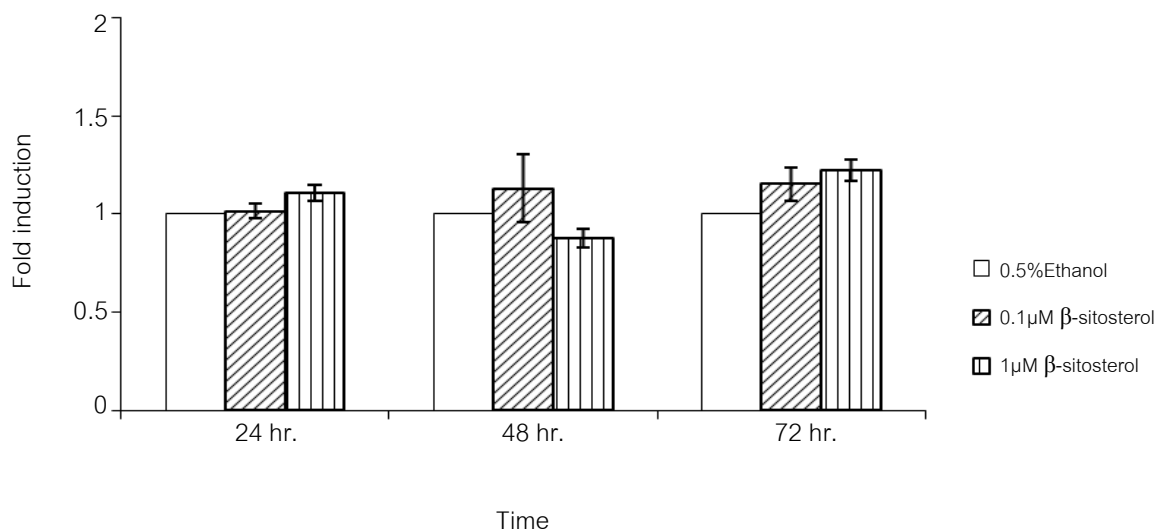
ภาพที่ 25 แสดงแถบโปรตีน CYP3A4 และ Actin ของสารทดสอบ 1) control 2) 0.5% DMSO 3) 0.5% Ethanol 4) 1 μ g/ml สิ่งสกัด 5) 25 μ g/ml สิ่งสกัด 6) 0.1 μ M β -sitosterol 7) 1 μ M β -sitosterol 8) DEX 50 μ M ตามลำดับ



ภาพที่ 26 กราฟแสดงผล การเหนี่ยวนำ การแสดงออกของโปรตีน CYP3A4 ของสาร dexamethasone ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน



ภาพที่ 27 กราฟแสดงผลการแสดงออกของโปรตีน CYP3A4 ของสิ่งสกัดในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน



ภาพที่ 28 กราฟแสดงผลการ แสดงออกของโปรตีน CYP3A4 ของสาร β-sitosterol ในเซลล์ HepG2 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (Mean ± S.E.M., n = 3) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลงานวิจัย

Cytochrome P450 หรือ CYP เป็น heme-protein ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารแปลกปลอมภายในร่างกาย เช่น ยา และสมุนไพรต่างๆ โดยพบว่า CYP3A4 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในกระบวนการขจัดยา พบมากที่สุดคิดเป็น 60% ของ CYP ในตับของมนุษย์ (Sy *et.al.*, 2002) การแสดงออกของ CYP3A4 ในตับควบคุมโดยกระบวนการ transcription ผ่านตัวรับที่นิวเคลียส (nuclear receptors) ได้แก่ PXR, GR และ CAR (Healan-Greenberg *et.al.*, 2008)

กลไกการเกิดอันตรกิริยาโดยทั่วไปนั้นเกิดจากการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP การเกิดอันตรกิริยาทำให้เพิ่มหรือลดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของยาที่ให้เข้าไปร่วมกัน อาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์และลดประสิทธิภาพในการรักษาได้ ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการทดสอบอันตรกิริยาในขบวนการแสวงหายาใหม่ (Honma *et.al.*, 2010) และการใช้ยาร่วมกันอย่างปลอดภัย นอกจากนี้ในปัจจุบันมีความนิยมใช้พืชสมุนไพรในรูปอาหารเสริมเพื่อสุขภาพพร้อมกับการใช้ยารักษาโรคแบบเรื้อรังเพิ่มมากขึ้น โอกาสที่จะเกิดอันตรกิริยาระหว่างพืชสมุนไพรและยาจึงเกิดขึ้นได้ (Ooi *et.al.*, 2011) การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า ฟลาโวนอยด์บางชนิดซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญและพบได้ทั่วไปในพืชมีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขจัดยาในเซลล์เพาะเลี้ยง จากการทดสอบสารฟลาโวนอยด์ Genistein และ chrysin ในเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่า สารฟลาโวนอยด์มีผลทำให้เหนี่ยวนำสมรรถนะของ CYP1A1 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น แต่ไม่มีการแสดงออกของ CYP1A1 mRNA เพิ่มขึ้น (Sergent *et.al.*, 2009) ทำให้คาดว่าฟลาโวนอยด์ทั้งสองไม่ได้เป็น ligand ของ aryl hydrocarbon receptor โดยสมรรถนะเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาที่เกิดขึ้นหลังขบวนการ transcription การทดลองที่ผ่านมา ได้ทดสอบผลของ quercetin ซึ่งเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์เช่นกันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐมภูมิของมนุษย์ พบว่า quercetin ทำให้มีการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA เพิ่มขึ้น แต่เมื่อทำการตรวจสอบสมรรถนะของเอนไซม์ดังกล่าวกลับปรากฏว่า มีผลทำให้สมรรถนะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทำให้คาดว่ากลไกการเหนี่ยวนำ CYP3A4 ไม่เกี่ยวข้องกับ PXR (Raucy, 2003) จากการทดลองทั้งสองไม่สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พยายามอธิบายว่าระดับ CYP3A4 mRNA ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนและสมรรถนะของเอนไซม์ และสามารถทดสอบผลการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำในเซลล์ตับมนุษย์ โดยตรวจเฉพาะ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งทำได้รวดเร็วและใช้ตัวอย่างที่น้อยกว่า (Watanabe *et.al.*, 2004) โดยเหตุที่กลไกในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP

สามารถเกิดได้ 3 แบบ คือ ทำให้ mRNA มีความคงตัวมากขึ้น ลดการทำลายโปรตีน และเพิ่มกระบวนการสร้าง mRNA (Honma *et.al.*, 2010) ดังนั้นในการตรวจสอบการเหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP จึงมีความจำเป็นในการทดสอบหาสมรรถนะของเอนไซม์, การแสดงออกของ mRNA และปริมาณโปรตีน ทั้งสามอย่างเพื่อประเมินผลการทดสอบได้ถูกต้อง

ในการศึกษาแบบ *in vitro* นิยมใช้ Human hepatoma cell อย่างกว้างขวาง โดยเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐมภูมิของมนุษย์ คือ เติบโตได้อย่างต่อเนื่อง, มีอายุที่ยาวนาน, มี phenotype ที่ค่อนข้างไม่เปลี่ยนแปลง และง่ายต่อการเพาะเลี้ยง (Donato *et.al.*, 2008) เซลล์ HepG2 นั้นเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการขจัดยา โดยที่ระดับการแสดงออกของเอนไซม์และ nuclear receptor ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเลี้ยง มีข้อดีเช่นเดียวกับ primary cultured human และ hepatoma cell line คือ สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของสมรรถนะของ CYP รวมถึงการวัดระดับการแสดงออกของ mRNA และปริมาณโปรตีนได้ (Honma *et.al.*, 2010)

ในปัจจุบันผู้ป่วยมีแนวโน้มที่จะรับประทานสมุนไพรพร้อมกับยาแผนปัจจุบันเพื่อลดอาการข้างเคียงจากยา (side effect) หรือความเป็นพิษ หรือเพื่อการตอบสนองแบบเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะละเลยที่จะแจ้งให้แพทย์ทราบว่ามีการรับประทานสมุนไพรพร้อมกับยาแผนปัจจุบันอาจทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพร เนื่องจากส่วนประกอบในสมุนไพรอาจส่งผลทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนกระบวนการการเมแทบอลิซึมของยาแผนปัจจุบันจากการเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง CYP ได้ (Ooi *et.al.*, 2011)

ในประเทศไทย นิยมนำว่านพญาวานร (*P. Palatiferum*) มาบริโภคเสริมในการรักษาโรคบางชนิด เช่น โรคกระเพาะ, โรคมะเร็ง, โรคเบาหวาน, โรคไตอักเสบ และโรคอุจจาระร่วง (พีรวิษณุ และคณะ, 2009) จากการศึกษาสารพฤกษเคมีที่พบในใบพืชชนิดนี้ พบว่ามี สาร β -sitosterol เป็นองค์ประกอบหลัก โดยสาร β -sitosterol เป็นสารในกลุ่มไฟโตสเตอรอล มีโครงสร้างที่คล้ายคลอเรสเตอรอล

จากการศึกษาที่ผ่านมา สารประกอบฟลาโวนอยด์หลายชนิดรวมทั้ง kaempferol และ apigenin ที่พบในสิ่งสกัด *P. palatiferum* มีผลต่อการทำงานของ CYP450 พบว่า apigenin สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CYP3A4 ตามกลไกที่ผ่านทางตัวรับ PXR โดยเป็นผลจากการยับยั้ง cyclin-dependent kinases ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 (Dong *et al.*, 2010) และ kaempferol มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง RNA ของ CYP3A4 เพิ่มขึ้นโดยผ่านทาง PXR (Liu *et al.*, 2006) การศึกษาภายนอกร่างกายของ Nair และคณะในปี 2007 ที่ประเมินผลของสิ่งสกัด

หลายชนิดและสารพฤกษเคมีที่มีอยู่ในพืชรวมทั้ง β -sitosterol และ stigmasterol ที่มีอยู่ในสิ่งสกัดจาก *P. palatiferum* ด้วยเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า β -sitosterol ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ แต่ และ stigmasterol ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml กลับมีผลยับยั้ง CYP3A4 โดยเหตุที่ยังไม่เคยมีรายงานถึงผลของ β -sitosterol ที่มีต่อสมรรถนะของ CYP3A4 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงทดสอบสาร β -sitosterol ควบคู่กับสิ่งสกัดจากवानพญาวานรที่ตรวจพบสาร β -sitosterol เป็นสารสำคัญในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 ด้วย

จากผลการวิเคราะห์หสิ่งสกัดในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสิ่งสกัดจากใบของ *P. palatiferum* นั้นปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 205.80 ± 6.95 mg gallic acid/g dried extract ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 117.47 ± 0.49 mg catechin/g dried extract และปริมาณของสาร β -sitosterol เท่ากับ 42.39 ± 4.22 mg /g dried extract ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาพฤกษเคมีของพืชชนิดนี้ พบว่ามี β -sitosterol, stigmasterol, kaempferol, apigenin, triterpenoid saponins, phytol, palmitic acid และ salicylic acid เป็นองค์ประกอบ (Hung *et.al.*, 2004)

เมื่อนำสิ่งสกัดมาทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 พบว่า สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 0.1-100 μ g/ml และสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.1-1 μ M ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการทดลองนี้ จึงนำความเข้มข้นของสิ่งสกัดและสาร β -sitosterol ที่ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ไปใช้ในการทดลองต่อไป คือ สิ่งสกัดที่ความเข้มข้น 1-25 μ g/ml และสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.1-1 μ M

ในการทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4, การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA และการทดสอบปริมาณโปรตีน CYP3A4 จะใช้ dexamethasone เป็น positive control โดย dexamethasone ทำให้สมรรถนะของ CYP3A4 เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง โดยการแสดงออกของ mRNA ที่เวลา 12 ชั่วโมง สูงกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงและสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เป็นที่ทราบดีแล้วว่า dexamethasone กระตุ้น GR ทำให้มีการแสดงออกของ PXR และ CAR เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการ transactivate ของ CYP3A4 นอกจากนี้ dexamethasone ยังสามารถจับและกระตุ้น PXR ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ CYP3A4 เพิ่มขึ้นได้ด้วยเช่นกัน (Pascussi *et.al.*, 2001)

ทั้งสิ่งสกัดและสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่ำ (1 μ g/ml และ 0.1 μ M ตามลำดับ) มีผลเพิ่มการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุมที่เวลา 12 ชั่วโมง และการแสดงออกของ mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่พบว่าสมรรถนะและปริมาณโปรตีน CYP3A4 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 ที่ทดสอบด้วยสิ่งสกัดหรือสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่ำ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน ในทางกลับกัน สิ่งสกัดและสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นสูง (25 μ g/ml และ 1 μ M ตามลำดับ) มีผลทำให้ CYP3A4 mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงสมรรถนะและปริมาณโปรตีนที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

การที่สารทดสอบทั้งสองที่ความเข้มข้นต่ำมีการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ที่เวลา 12 ชั่วโมงเพิ่มขึ้น และลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นสูงกลับมีผลตรงกันข้าม โดยมีการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ลดลงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เนื่องจากสิ่งสกัดนั้นประกอบด้วยสารหลายชนิด ซึ่งสารฟลาโวนอยด์ในใบของ *P. palatiferum* ประกอบด้วย β -sitosterol, stigmasterol, kaempferol และ apigenin (Giang *et.al.*, 2003) การศึกษาในอดีตแสดงให้เห็นว่าในพืชบางชนิด เช่น มะเขือเทศ มี CYP710A1 เปลี่ยนสารไฟโตสเตอรอล β -sitosterol เปลี่ยนไปเป็น stigmasterol ได้โดยปฏิกิริยา C22 desaturation (Griebel and Zeier, 2010) ถึงแม้ว่าจะยังไม่เคยมีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงนี้ในเซลล์ต้นมนุษย์ แต่จากรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุไว้ว่า เซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 มีสมรรถนะของเอนไซม์ desaturase และ elongase สูงมาก (Dixon and Ginsberg, 1993)

ผลจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารฟลาโวนอยด์ kaempferol และ apigenin มีผลกระตุ้นการสร้าง CYP3A4 mRNA และเพิ่มสมรรถนะของ CYP3A4 ตามลำดับ (Liu *et.al.*, 2006, Dong *et.al.*, 2010) และสาร stigmasterol สามารถยับยั้งสมรรถนะของ CYP3A4 (Nair *et.al.*, 2007) เห็นได้ว่าในสิ่งสกัดมีสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ทั้งยับยั้งหรือเหนี่ยวนำ CYP3A4 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ที่เพิ่มสูงขึ้นเป็นผลมาจากสารฟลาโวนอยด์ทั้งสองและสาร β -sitosterol เนื่องจากผลการทดสอบสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่ำและสูงมีผลไปในทางเดียวกันกับสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่ำและสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง β -sitosterol ที่ขนาด 0.1 μ M มีผลเพิ่มการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ได้มากเกือบเท่ากับ dexamethasone ที่ความเข้มข้น 50 μ M

การที่สิ่งสกัดที่ความเข้มข้นสูงมีผลตรงกันข้ามนั้น คาดว่าเกิดจาก สาร stigmasterol ที่มีอยู่ในสิ่งสกัดอยู่แล้ว และสารนี้ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง CYP3A4 นอกจากนี้ น่าจะสันนิษฐานได้ว่า ในช่วงระยะเวลา 12 – 24 ชั่วโมงนั้น ภายในเซลล์เพาะเลี้ยง ได้มีการเปลี่ยนแปลงสารในสิ่งสกัด

เช่น β -sitosterol ไปเป็น stigmasterol ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งมากขึ้น จนหักล้างฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำที่ทำให้มีการสร้าง mRNA เพิ่มขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมงได้ จนไม่ทำให้ผลสมรรถนะและระดับโปรตีนของ CYP3A4 โดยรวมแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน

จากผลของการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ของสารทดสอบทั้งสองที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ที่ 12 ชั่วโมง ไม่สอดคล้องกับสมรรถนะและปริมาณโปรตีนที่ 24 ชั่วโมง ที่เห็นผลโดยรวมว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และผลที่ 24-72 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างจากกันนั้น คาดว่าเป็นผลจากความคงตัวของโปรตีน CYP3A4 เนื่องจากมีรายงานก่อนหน้านี้ไว้ว่า ค่าครึ่งชีวิตของโปรตีน CYP3A4 ยาวนานตั้งแต่ 1-6 วัน (Kozawa *et.al.*, 2009) เมื่อทำการทดสอบสารทดสอบทั้งสองที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จึงเห็นผลของสมรรถนะและการแสดงออกของโปรตีน CYP3A4 เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย

สรุปผลการทดลองครั้งนี้ จากการทดสอบสิ่งสกัดแอลกอฮอล์จากใบของ *P. palatiferum* และสาร β -sitosterol ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 สารทดสอบทั้งสองที่ความเข้มข้นต่ำมีผลเพิ่มการสร้าง CYP3A4 mRNA ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนของสมรรถนะและปริมาณโปรตีน CYP3A4 การที่มีการเพิ่มขึ้นของ CYP3A4 mRNA ในระยะแรกนั้น อาจเกิดจากส่วนประกอบพฤกษเคมีในสิ่งสกัดเช่น kaemferol และ apigenin ที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ รวมทั้ง β -sitosterol ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ด้วยว่า มีผลเพิ่มการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA แต่การที่สมรรถนะและปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ของทั้งสิ่งสกัดและ β -sitosterol ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลับไม่มีการเปลี่ยนแปลง คาดว่าเป็นผลโดยรวมที่เกิดจากสารเมแทบอลิท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจนหักล้างฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ที่เกิดขึ้นก่อนได้ อย่างไรก็ตาม ควรทำการทดสอบวัดหาปริมาณ stigmasterol ที่คาดว่าเป็นสารเมแทบอลิท์ของ β -sitosterol ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงเพิ่มเติมและทดสอบสาร stigmasterol ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 ควบคู่ไปด้วยเพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานนี้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จันทนา กาญจนิกมล. การตรวจสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพญาวานร. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา, 2551

บงกช นพผล, สรรพเพชญ อังกิติตระกูล, ณัฐชญา โภคาพานิชย์ และ วิศรุต เมืองผวน. ประสิทธิภาพของสารสกัดใบฮว่านง็อกและใบพลูในการยับยั้งและฆ่าเชื้อซัลโมเนลลา. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 19(2552): 171-179

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, อาตุลย์ จงรักษ์, นิคม จันทรมังกร และ อนุพงษ์ ทิมอุบล . ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านมะเร็งของสมุนไพรรพญาวานร. วิทยานิพนธ์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์, 2552

พีรวิษณุ พาดิ, สมศักดิ์ นวลแก้ว, ชูศรี ตลับมุข และ สุภาพร สกฤตใจตรง. ความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดใบพญาวานร. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 5(2552): 74-81

วัชรวีรธรณ จันท์อาสา. ผลของสารสกัดว่านพญาวานรในหนูเบาหวาน. วิทยานิพนธ์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2551

วงศ์สถิตย์ คุ้มกุล และ อรัญญา ศรีบุศราคม. ฮว่านง็อก (Hoan-Ngoc) สมุนไพรในกระแส. จุลสารข้อมูลสมุนไพรร 25(2551): 3-6

สมหมาย ปะติตั้งโช. การต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดพญาวานร. วารสาร มจร.วิชาการ 14(2553): 123-136

สุพัตรา อินต๊ะ . การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดว่านพญาวานร (Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk) ในหนูขาวเพศผู้. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: <http://www.science.cmu.ac.th/reg-sci/presentstud/AbstractFile/At490510342.pdf> [8 มีนาคม 2553]

ภาษาอังกฤษ

Abhilash P.C., Jamil S. and Singh N. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. Biotechnol Adv. 27(2009): 474–488

- Anderson P. The ABC'S of Pharmacokinetics. Positively Aware..5(2005): 25-28
- Anzenbacher P. and Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. CMLS Cell Mol Life Sci. 58(2001): 737–747
- Ardestani A. and Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem. 104(2007): 21–29.
- Awad AB., Downie AC. and Fink CS. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. Int J Mol Med. 5(2000): 541-5
- Awad AB., Gan Y. and Fink CS. Effect of beta-sitosterol, a plant sterol, on growth, protein phosphatase 2A, and phospholipase D in LNCaP cells. Nutr Cancer. 36(2000): 74-8
- Badyal D.K. and Dadhich A.P. Cytochrome P450 and drug interactions. Indian J Pharmacol. 33(2001): 248-259
- Baliharova V., Skalova L., Maas R.F.M., Vrieze G., Bull S. and Fink-Gremmels J. The effects of benzimidazole anthelmintics on P4501A in rat hepatocytes and HepG2 cells. Vet Sci. 75(2003): 61–69
- Bertz RJ. and Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. Clin Pharmacokinet. 32(1997): 210-258.
- Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. Nutr Metab. 5(2008): 27
- Birt DF., Hendrich S. and Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther. 90(2001):157-177
- Bottger S., Hofmann K. and Melzig M. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation?. Bioorgan Med Chem. 20(2012): 2822–2828
- Brandon E.F.A., Raap C.D., Meijerman I., Beijnen J.H. and Schellens J.H.M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. Toxicol Appl Pharm. 189(2003): 233–246

- Buncharoen W., Saenphet S., Saenphet K. Acetylcholinesterase Inhibitory Effect of *Pseuderanthemum palatiferum* in Albino Rats. Trend Res Sci Tech. 2 (2010): 13-18
- Buxton L. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, and Elimination. In Brunton, Lazo, Paker eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed., McGraw-Hill, 2006. 1-12
- Chang C., Yang M., Wen H. and Chern J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. J Food Drug Anal. 10(2002): 178-182
- Chiang L., Teik L., Lin IC., Kuo P. and Lin CC. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. Cancer Lett. 237(2006): 207–214
- Dehn P.F., White C.M., Connors D.E., Shipkey G. and Cumbo T.A. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line as an invitro model for cadmium toxicity studies. Animal. 40(2004): 172-182
- Dieu HK., Loc CB., Yamasaki S. and Hirata Y. The Ethnobotanical and Botanical Study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a New Medicinal Plant in the Mekong Delta of Vietnam. JARQ. 39(2005): 191 – 196
- Dieu HK., Loc CB., Yamasaki S. and Hirata Y. The Effects of *Pseuderanthemum palatiferum*, a New Medicinal Plant, on Growth Performances and Diarrhea of Piglets. JARQ. 40(2006): 85 – 91
- Dieu HK. and Hoa TV. Efficacy of *Pseuderanthemum palatiferum* powder against diarrhea of piglets. [online]. 2003. Available from: <http://www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/workshop/pro03/C12-Livestock%2012%20%28Ms.%20Dieu%29.pdf> [2010 April 2]
- Dixon J. and Ginsberg H. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. J Lipid Res. 34(1993): 167-179

- Dong H., Lin W., Wu J. and Chen T. Flavonoids activate pregnane \times receptor-mediated CYP3A4 gene expression by inhibiting cyclin-dependent kinases in HepG2 liver carcinoma cells. BMC Biochemistry. 11(2010): 1-9
- Donato MT., Lahoz A., Castell JV. And Gómez-Lechón MJ. Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies. Curr Drug Metab. 9(2008): 1-11
- Dvorak Z. and Pavek P. Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids. Drug Metab Rev. 42(2010): 621- 635
- Fernandes P. and Cabral J.M.S. Phytosterols: Applications and recovery methods. Bioresource Technol. 98(2007): 2335–2350
- Forman BM. *et.al.*, Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . Nature. 395(1998): 612-615
- Giang PM., Bao HV. and Son PT. Phytochemical study on *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., Acanthace. J Chem. 41(2003): 115 - 118
- Glue P. and Clement R. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism - Basic Concepts and Methods of Assessment. Cell Mol Neurobiol. 19(1999): 309 - 323
- Gonzalez FJ. Molecular genetics of the P-450 superfamily. Pharmacol Ther. 45(1990): 1-38
- Griebel T. and Zeier J. A role for b-sitosterol to stigmasterol conversion in plant–pathogen interactions. The Plant Journal. 63 (2010): 254–268
- Guengerich FP. Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. Luxembourg. European Commission. Office for the Official Publications of the European Communities, 1995
- Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 39(1999): 1-17.
- Guo A. *et.al.*, Kaempferol as a flavonoid induces osteoblastic differentiation via estrogen receptor signaling. Chinese Medicine. 10(2012): 1-7
- Gupta M. B. , Nath R., Srivastava N. , Shanker K. , Kishor K. and Bhargava K. P. Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of β -Sitosterol. planta med. 39(1980): 157-163

- Halpert JR. Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 35(1995): 29–53
- Hamdane D. and Zhang H. Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. Photosynth Res. 98(2008): 657-666
- Hashizume T. *et.al.*, Advantages of Human Hepatocyte-Derived Transformants Expressing a Series of Human Cytochrome P450 Isoforms for Genotoxicity Examination. Toxicol Sci. 116(2010): 488–497
- Healan-Greenberg C., Waring J., Kempf D., Blomme E., Tirona R. and Kim R. A Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor Is a Novel Functional Inhibitor of Human Pregnane X Receptor. Drug Metab Dispos. 36(2008): 500-507
- Hewitt N.J. and Hewitt P. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell line. Xenobiotica. 34(2004): 243-256
- Holtz RL., Fink CS. and Awad AB. beta-Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. Nutr Cancer. 32(1998): 8-12
- Honma M., Kozawa M. and Suzuki H. Methods for the quantitative evaluation and prediction of CYP enzyme induction using human in vitro systems. Expert Opin Drug Discov. 5 (2010): 491-511
- Hu Z. *et.al.*, Herb-Drug Interactions A Literature Review. Drugs. 65 (2005): 1239-1282
- Hukkanen J. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzyme in human lung. Acta Univ Oul. 621 (2000): 1-69
- Hung N.V., Tuan L.A. and Chien N.Q. Study on chemical constituents of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. TC khoa hoc va cong nghe 42(2004): 75–79
- Imaoka S., Yamada T., Hiroi T., Hayashi K., Sakaki T., Yabusaki Y. and Funae Y. Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, systematic characterization and comparison with those of the rat. Biochem Pharmacol. 51(1996): 1041-1050

- Ioannidis C. Cytochromes P450 Role in the Metabolism and Toxicity of drug and other xenobiotics: Cambridge UK. The royal society of chemistry, 2008
- Izzo A., Ernst E. Interactions Between Herbal Medicines and Prescribed Drugs An Updated Systematic Review. Drugs. 69 (2009): 1777-1798
- Kachaylo E., Pustylnyak V., Lyakhovich V. and Gulyaeva L. Constitutive Androstane Receptor (CAR) Is a Xenosensor and Target for Therapy. Biochemistry 76 (2011): 1087-1097
- Khongsung P., Panthong A., Chiranthanut N., Intahphuak S. Hypotensive effect of the water extract of the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum*. J Nat Med. 65 (2011): 551-558
- Kolars JC., Schmiedlin-Ren P., Schuetz JD., Fang C. and Watkins PB. Identification of rifampicin inducible P450IIA4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. J Clin Invest. 90(1992): 1871-1878
- Kozawa M., Honma M. and Suzuki H. Quantitative prediction of in Vivo Profiles of CYP3A4 Induction in Humans from in Vitro Results with a Reporter Gene Assay. Drug Metab Dispos . 37(2009):1234-1241
- Krishna D.R. and Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. Clin Pharmacokinet. 26(1994):144–160
- Krusekopf S., Roots I. and Kleeberg U. Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. Eur J Pharmacol. 466 (2003): 7– 12
- Lau G. and Leung L. The dietary flavonoid apigenin blocks phorbol 12-myristate 13-acetate-induced COX-2 transcriptional activity in breast cell lines. Food Chem Toxicol. 48 (2010): 3022–3027
- Leung H., Lin CJ., Hour MJ., Yang WH., Wang MY. and Lee HZ. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. Food Chem Toxicol. 45(2007): 2005–2013

- Li W., Du B., Wang T., Wang S. Zhang J. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis. Chem-Biol Interact. 177(2009): 121–127
- Lin JH. and Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. Clin Pharmacokinet. 35(1998): 361–390
- Lin JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. Adv Drug Deliver Rev. 55(2003): 53-81
- Lin JH. CYP Induction-Mediated Drug Interactions: in Vitro Assessment and Clinical Implications. Pharm Res-dordr. 23(2006): 1089-1116
- Liu DY., Zhu HJ., Zheng YF. and Zhu XQ. Kaempferol activates human steroid and xenobiotic receptor-mediated cytochrome P450 3A4 transcription. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 35(2006): 14-17
- Loizou S., Lekakis I., Chrousos G. and Moutsatsou P. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cell. Mol Nutr Food Res. 54(2010): 551-558
- Luo H., Rankin G., Li Z., DePriest L. and Chen YC. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. Food Chem. 128(2011): 513–519
- Lynch T. and Price A. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. Am Fam Physician. 76(2007): 391-396
- Ma J., Li Q., Zhao J., Guo Y., Su Q. and Ji Z. Effects of apigenin on cell proliferation of human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 *in vitro*. Journal of Nanjing Medical University. 21(2007): 94-98
- Mahat M. *et.al.*, Modulation of the cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide Production contributes to the anti-inflammatory activity of kaempferol. Eur J Pharmacol. 642(2010): 169–176

- Malini T. and Vanithakumari G. Antifertility effect of β -sitosterol in male albino rats. J Ethnopharmacol. 35(1991): 149-153
- Malini T. and Vanithakumari G. Rat toxicity study with β -sitosterol. J Ethnopharmacol. 28(1990): 221-234
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L. Polyphenols: food Sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 79(2004): 727-747
- Miranda SR., Meyer SA. Cytotoxicity of chloroacetanilide herbicide alachlor in HepG2 cells independent of CYP3A4 and CYP3A7. Food Chem Toxicol. 45(2007): 871–877
- Mohamed A. and Kadi A. Sulforaphane induces CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity levels via an AhR-dependent pathway in murine hepatoma Hepa 1c1c7 and human HepG2 cells. Cancer Lett. 275(2009): 93–101
- Nabekura T., Yamaki T., Ueno K. and Kitagawa S. Effects of plant sterols on human multidrug transporters ABCB1 and ABCC1. Biochem Bioph Res Co. 369 (2008): 363- 368
- Naira V., Fosterb B., Arnasonb J., Millsc E. and Kanfera I. In vitro evaluation of human cytochrome P450 and P-glycoprotein-mediated metabolism of some phytochemicals in extracts and formulations of African potato. Phytomedicine. 14 (2007): 498–507
- Nelson D., Koymans L., Kamataki T., Stegeman JJ., Feyereisen R., Waxman DJ., Waterman MR., Gotoh O., Coon MJ., Estabrook RW., Gunsalus IC. and Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics. 6(1996): 1-42.
- Nieminen P., Polonen I., Ikonen K., Maattanen M. and Mustonen A. Evaluation of reproductive safety of β -sitosterol on the American mink (*Neovison vison*). Chemosphere. 71 (2008): 493–499
- Nirmala P. and Ramanathan M. Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethyl hydrazine induced colorectal carcinoma in rats. Eur J Pharmacol. 654(2011): 75–79

- Ohno M., Motojima K., Okano T. and Taniguchi A. Induction of Drug-Metabolizing Enzymes by Phenobarbital in Layered Co-culture of a Human Liver Cell Line and Endothelial Cells. Biol Pharm Bull. 32(2009): 813-817
- Ooi J., Kuroyanagi M., Sulaiman S., Muhammad T. and Tan M. Andrographolide and 14-Deoxy-11, 12-Didehydroandrographolide inhibit cytochrome P450s in HepG2 hepatoma cells. Life Sci. 88(2011): 447–454
- Otto M., Hansen SH., Dalgaard L., Dubois J. and Badolo L. Development of an in vitro assay for the investigation of metabolism-induced drug hepatotoxicity. Cell Biol Toxicol. 24 (2008):87–99
- Pascussi JM., Drocourt L., Gerbal-Chaloin S., Fabre JM., Maurel P, and Vilarem MJ. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. Eur J Biochem. 268(2001): 6346–6358.
- Pelkonen O., Mäenpää J., Taavitsainen P., Rautio A. and Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. Xenobiotica. 28(1998): 1203-1253.
- Pelkonen O. Turpeinen M. Hakkola J. Honkakoski P. Hukkanen J. and Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. Arch Toxicol. 82(2008): 667–715
- Raucy J. Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. Drug Metab Dispos. 31(2003): 533-539
- Richard E. and Ostlund Jr. Phytosterols in human nutrition. Annu Rev Nutr. 22(2002): 533–49
- Schoonen W., Westerink W. and Horbach J. High-throughput screening for analysis of *in vitro* Toxicity. Mol Clin Env Toxicol. 99(2009): 401-452
- Sergent T. *et.al.*, CYP1A1 and CYP3A4 modulation by dietary flavonoids in human Intestinal Caco-2 cells. Toxicol Lett. 191(2009): 216–222

- Sergenta T., Dupont I., Jassogne C., Ribonnet L., Heiden E., Scippo M., Muller M., McAlister D., Pussemier L., Larondelle Y. and Schneider Y. CYP1A1 induction and CYP3A4 inhibition by the fungicide imazalil in the human intestinal Caco-2 cells—Comparison with other conazole pesticides. Toxicol Lett. 184(2009): 159–168
- Sharma V., Joseph C., Ghosh S., Agarwal A., Mishra M. and Sen E. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. Mol Cancer Ther. 6(2007): 2544-2553
- Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y. and Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J Pharmacol Exp Ther. 270 (1994): 414-423
- Siddique Y., Beg T. and Afzal M. Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs. Toxicol in Vitro. 22(2008): 625–631
- Singh J., Selvendiran K., Banu S., Padmavathi R. and Sakthisekaran D. Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. Phytomedicine. 11(2004): 309–314
- Singleton V. and Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic reagents. Am. J. Enol. Viticult. 16(1965): 144-158
- Slinkard K. and Singleton V.L. Total Phenol Analysis: Automation and comparison with manual methods. Am J Enol Viticult. 28(1977): 49-55
- Sreenivasulu K., Vijayalakshmi M. and Sambasivarao K. Regulation Studies of Telomerase Gene in Cancer Cells by Lentinan. J Med Biotech. 2(2010):181-185
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer. 3(2003) : 768-780
- Sy S., Ciaccia A., Roberts W., Oke A. and Tang W. Modeling of human hepatic CYP3A4 enzyme kinetics, protein, and mRNA indicates deviation from log-normal distribution in CYP3A4 gene expression. Eur J Clin Pharmacol. 58 (2002): 357–365

- Thakur A., Jain V., Hingorani L. and Laddha K. Improved High-Performance Liquid Chromatography–DAD Method for the Simultaneous Analysis of Quercetin and Kaempferol in the Stems of *Cissus quadrangularis* Linn. Acta Chromatogr. 21(2009): 95–103
- Tompkins LM. and Wallace AD. Mechanisms of Cytochrome P450 Induction. J Biochem Mol Toxicol. 21(2007): 176-181
- Urquhart B., Tirona R. and Kim R. Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters: Implications for Interindividual Variability in Response to Drugs. J Clin Pharmacol. 47 (2007): 566-578
- Valdameri G. *et.al.*, Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by Apigenin in HepG2 human hepatoma cells. Chem-Biol Interact. 193 (2011): 180–189
- Vivancos M. and Moreno J. h-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. Free Radical Bio Med. 39 (2005): 91– 97
- Wang I., Shiau L. and Lin JK. Induction of Apoptosis by Apigenin and Related Flavonoids Through Cytochrome c Release and Activation of Caspase-9 and Caspase-3 in Leukaemia HL-60 Cells. Eur J Cancer. 35(1999): 1517-1525
- Wang J., Fang F., Huang Z., Wang Y. and Wong C. Kaempferol is an estrogen-related receptor α and γ inverse agonist. FEBS Lett. 583(2009): 643–647
- Watanabe M. *et.al.*, Expression of CYP3A4 mRNA Is Correlated With CYP3A4 Protein Level and Metabolic Activity in Human Liver. J Pharmacol Sci. 94(2004): 459 – 462
- Westerink W.M.A., Schoonen W.G.E.J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. Toxicol in vitro. 21 (2007): 1581–1591
- Wienkers L. and Heath T. Predicting in vivo drug interaction from in vitro drug discovery data. Nature reviews. 4(2005): 825-833

- Wilkening S., Stahl F. and Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. Drug Metab Dispos. 31(2003): 1035–1042
- Willson T. and Kliewer S. PXR, CAR and drug metabolism. Nat Rev Drug Discov. 1(2002) : 259-266
- Xu C., Li C. and Kong A. Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. Arch Pharm Res. 28(2005): 249-268
- Yang CS., Landau JM., Huang MT. and Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu Rev Nutr. 21(2001): 381-406
- Yi LT., Li JM., Li YC., Xu Q., Pan Y. and Kong LD. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. Life Sci. 82(2008): 741–751
- Zhang X. *et.al.*, Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography–mass spectrometry. Steroids. 70(2005): 896–906
- Zang Y. and Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. Eur J Pharmacol. 670 (2011): 325–332
- Zhou S., Gao Y. Jiang W., Huang M., Xu A., Paxton J. Interactions of Herbs with Cytochrome P450. Drug Metab Rev. 35(2003): 35–98

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM ปริมาตร 1000 ml

1. ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อและโซเดียมไบคาร์บอเนตในน้ำ autoclave ปริมาตร 1000 ml

DMEM	13.5 g
NaHCO ₃	3.7 g

2. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH
3. ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง 0.22 μ m Millipore filter
4. ทำการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C
5. ทำการผสมกับ 10% FBS, 1% L-glutamine และ 1% penicillin ก่อนการใช้

1.2 Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1000 ml

1. ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml

Potassium chloride	0.200 g
Sodium chloride	8.000 g
Potassium phosphate monobasic (anhydrous)	0.240 g
Sodium phosphate dibasic (anhydrous)	1.440 g

2. ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH
3. ฆ่าเชื้อโดยนำไป autoclave
4. ทำการเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

2. สารละลายสำหรับการทำ Western blot analysis

2.1 การเตรียมสารละลาย A (cytosol extract)

เตรียมสารละลายดังนี้	
100 mM HEPES-KOH	1 ml
1 M MgCl ₂	15 µl
1 M KCl	100 µl
10 mM PMSF	200 µl
DTT	50 µl
น้ำกลั่น	8.635 ml

2.2 การเตรียมสารละลาย B (nuclear extract)

เตรียมสารละลายดังนี้	
100 mM HEPES-KOH	1 ml
1 M MgCl ₂	7.5 µl
5 M NaCl	420 µl
100% Glycerol	1.75 ml
10 mM PMSF	100 µl
DTT	25 µl
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2 µl
น้ำกลั่น	1.68 ml

2.3 การเตรียม Acrylamide gel

เตรียมสารละลายดังนี้

สารละลาย A ประกอบด้วย 0.8 % methylene bis acrylamide, 30% acrylamide

สารละลาย B 5X Separating buffer ปริมาตร 100 ml เตรียมดังนี้

2M Tris HCl, pH 8.8	75 ml
10% SDS	4 ml
น้ำกลั่น	21 ml

สารละลาย C 5X Stacking buffer ปริมาตร 100 ml เตรียมดังนี้

2M Tris HCl, pH 6.8	25 ml
10% SDS	4 ml
น้ำกลั่น	71 ml

ทำการเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

การเตรียม separating gel

เตรียม 10 % acrylamide gel ปริมาตร 35 ml ส่วนผสมดังนี้

Solution A	11.7 ml
Solution B	7.0 ml
น้ำกลั่น	16.1 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วเติม 10% ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 150 μ l และ N, N, N, N-tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 50 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วเทเจลลงในชุดการเตรียมเจลทันที แล้วเท 0.1% SDS บน separating gel หนาประมาณ 5 mm รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 20-30 นาที

การเตรียม stacking gel

เมื่อ separating gel แข็งตัว ทำการเท 0.1% SDS ที่

ส่วนผสมของ Stacking gel มีดังนี้

Solution A	2.0 ml
Solution C	2.0 ml
น้ำกลั่น	6.0 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วเติม 10% APS 50 μ l และ TEMED 5 μ l, ผสมให้เข้ากัน แล้วเทเจลลงในชุดการเตรียมเจลเดิมต่อจาก separating gel ทันที แล้วใส่ combs รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

2.4 การเตรียมตัวอย่าง

เมื่อ stacking gel แข็งตัวแล้วนำเอา combs ออก แล้วล้างเจลด้วย running buffer แล้วย้ายเจลไปชุดสำหรับการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่มี running buffer อยู่ทำการไล่ฟองอากาศใต้เจลออกก่อนการหยุดตัวอย่างและ protein marker

Running buffer (Electrode buffer)

เตรียม 1X running buffer, pH 8.3 ปริมาตร 1000 ml ดังนี้

Tris base	3.0 g
Glycine	14.4 g
SDS	1.0 g

ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1000 ml

Transfer buffer (Electrophoresis buffer)

เตรียม 1X transfer buffer, pH 8.1-8.4 ปริมาตร 1000 ml ดังนี้

Tris base	1.93 g
Glycine	9.00 g

ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 800 ml เติมเมทานอล ปริมาตร 200 ml ก่อนใช้

Tris-buffer saline. 0.05% Tween 20 (TBST)

เตรียม 10X TBS ปริมาตร 500 ml ดังนี้

2M Tris-HCl, pH 7.5	25.0 ml
NaCl	43.8 g

ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 500 ml ก่อนใช้ทำให้เป็น 1X TBS โดยการผสม 10X TBS ปริมาตร 100 ml กับ น้ำกลั่น ปริมาตร 900 ml แล้วเติม Tween 20 ปริมาตร 0.5 ml

Sample buffer

เตรียม 2X sample buffer ดังนี้

0.5 M Tris HCl, pH 6.8	22.5 ml
SDS	3.0 g
Glycerol	10.0 ml
2% bromphenol blue	225.0 μ l

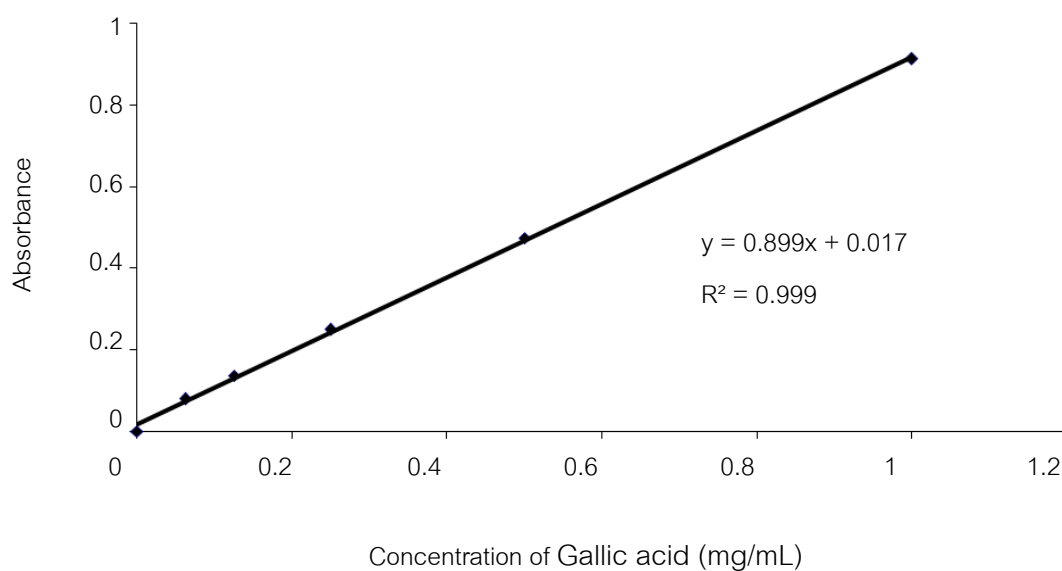
ละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 ml ก่อนใช้ เติม 2-mercaptoethanol เพื่อให้ได้ 9% ของ 2-mercaptoethanol ใน 2X sample buffer และทำการ dilute เป็น 1X sample buffer ด้วย cell lysate

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

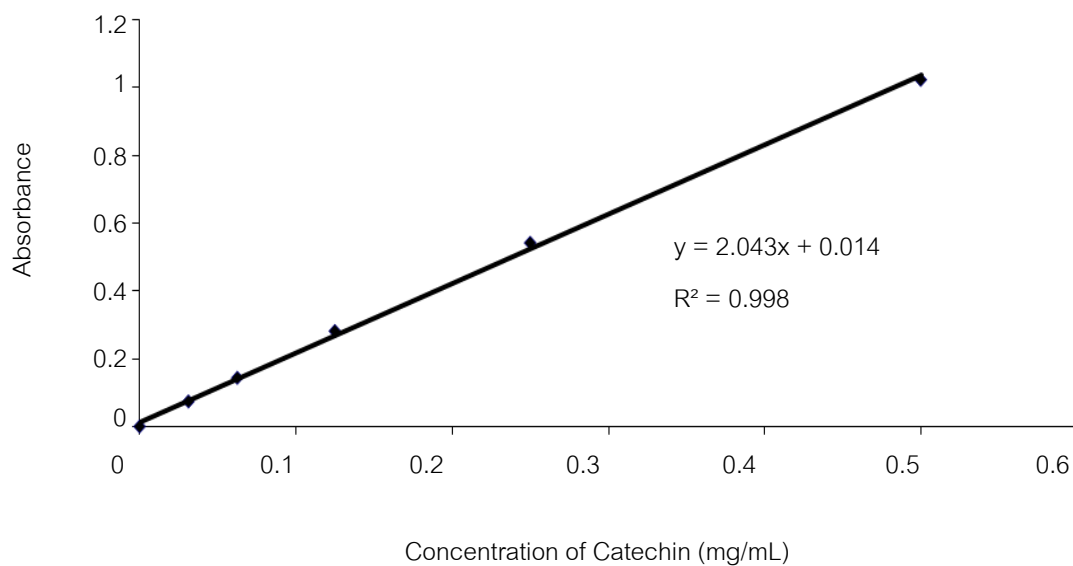
ผลการทดลองการตรวจสอบคุณสมบัติของสิ่งสกัด

1. การหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Quantitative analysis of total phenolic compounds)



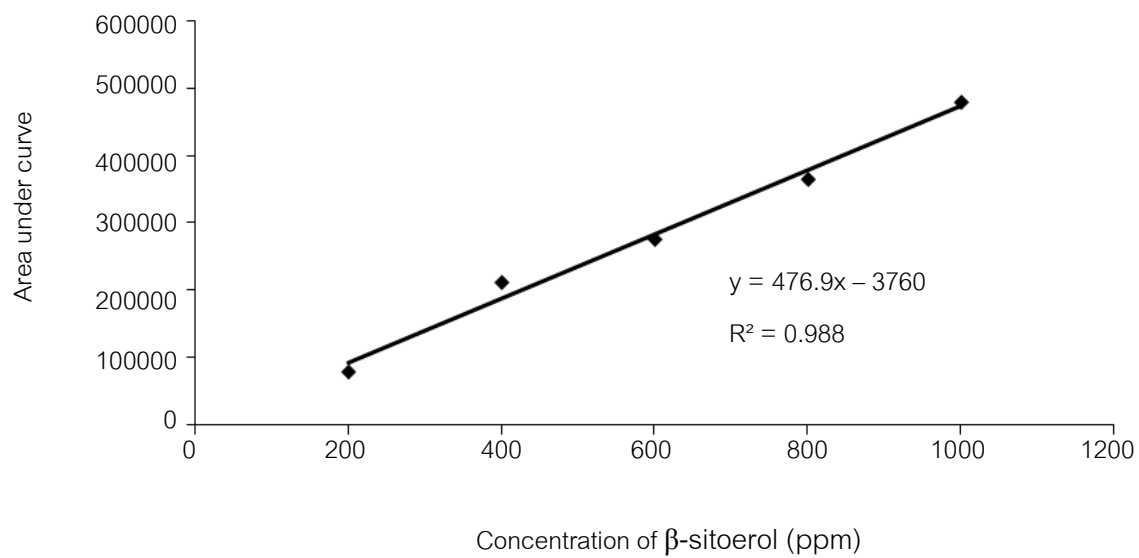
ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานของสาร Gallic acid

2. การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Quantitative analysis of total flavonoid compounds)



ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานของสาร Catechin

3. การหาปริมาณสาร β -sitosterol ในสิ่งสกัดด้วยเครื่อง GC (Quantitative analysis of β -sitosterol by Gas chromatography)



ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานของสาร β -sitosterol

ผลการทดลองการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบ (Cytotoxicity effect of test compound)

ตารางที่ 9 ผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

			% Cell viability						
			N1	N2	N3	N4	mean	SD	SEM
24 hr	control	0.5%DMSO	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
	Extract	media	97.15	96.18	114.40	94.62	100.59	9.27	5.36
		0.1 µg/ml	91.54	93.56	94.91	92.00	93.00	1.54	0.89
		0.5 µg/ml	96.14	90.02	97.38	96.47	95.00	3.36	1.94
		1 µg/ml	93.02	85.49	108.23	100.57	96.83	9.78	5.65
		5 µg/ml	93.19	90.89	96.94	98.35	94.84	3.42	1.98
		10 µg/ml	89.51	104.73	98.41	89.59	95.56	7.40	4.28
		25 µg/ml	86.17	101.88	100.02	85.13	93.30	8.87	5.13
		50 µg/ml	104.24	102.50	105.23	85.24	99.30	9.44	5.46
		100 µg/ml	85.02	85.21	92.89	93.52	89.16	4.68	2.70
		200 µg/ml	74.10	55.08	43.08	73.57	61.46	15.11	8.73
		400 µg/ml	43.57	49.87	29.89	56.07	44.85	11.20	6.47
48 hr	control	0.5%DMSO	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
	Extract	media	122.29	74.01	103.59	79.42	94.83	22.37	12.93
		0.1 µg/ml	109.95	76.10	95.92	86.47	92.11	14.39	8.32
		0.5 µg/ml	104.70	77.80	90.56	96.42	92.37	11.32	6.54
		1 µg/ml	107.85	79.48	97.46	86.94	92.93	12.38	7.16
		5 µg/ml	107.24	80.11	99.57	77.65	91.14	14.53	8.40
		10 µg/ml	100.10	82.02	86.56	84.61	88.32	8.07	4.67
		25 µg/ml	93.41	85.39	91.62	86.30	89.18	3.94	2.28
		50 µg/ml	110.92	81.92	99.45	104.93	99.30	12.50	7.23
		100 µg/ml	94.09	71.41	82.85	72.14	80.12	10.68	6.17

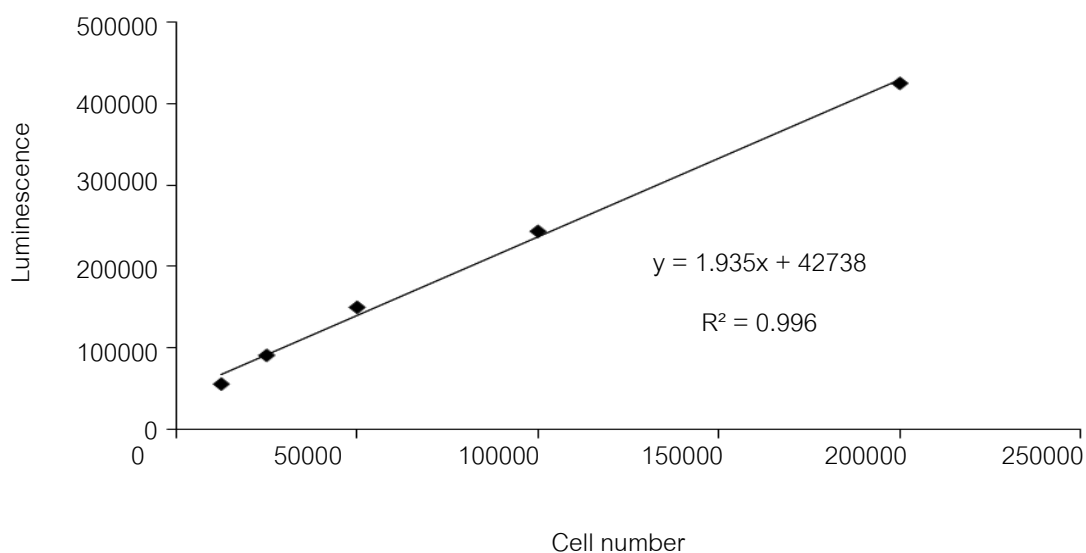
		200 µg/ml	72.21	41.36	66.86	55.36	58.95	13.67	7.90
		400 µg/ml	47.86	27.68	30.01	41.28	36.71	9.52	5.50
72 hr	control	0.5%DMSO	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
	Extract	media	114.44	75.82	104.31	92.05	96.66	16.64	9.62
		0.1 µg/ml	99.27	78.99	104.35	97.61	95.06	11.09	6.41
		0.5 µg/ml	94.69	78.65	96.76	99.17	92.32	9.29	5.37
		1 µg/ml	91.93	74.28	94.61	89.48	87.57	9.11	5.26
		5 µg/ml	109.58	81.24	102.05	98.90	97.94	12.01	6.94
		10 µg/ml	98.99	83.77	103.22	93.87	94.96	8.38	4.85
		25 µg/ml	86.43	87.09	108.18	91.90	93.40	10.15	5.87
		50 µg/ml	121.15	93.62	108.57	97.08	105.11	12.46	7.20
		100 µg/ml	94.67	90.68	101.12	83.16	92.41	7.51	4.34
		200 µg/ml	65.24	57.98	75.13	68.72	66.77	7.15	4.13
400 µg/ml	46.39	26.72	30.01	44.69	36.95	10.03	5.80		

ตารางที่ 10 ผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของสาร β -sitosterol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

			% Cell viability					
			N1	N2	N3	mean	SD	SEM
24 hr	control	0.5%Ethanol	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	media	107.46	90.23	99.30	99.00	8.62	4.98
		0.1 µM	107.52	98.92	107.56	104.67	4.98	2.88
		0.5 µM	112.35	83.35	103.48	99.73	14.86	8.59
		1 µM	97.18	78.34	106.88	94.13	14.51	8.39
		5 µM	103.96	80.21	100.00	94.72	12.72	7.35
		10 µM	95.01	79.81	94.38	89.73	8.60	4.97
		25 µM	91.35	78.41	85.19	84.98	6.47	3.74
		50 µM	88.66	83.20	87.96	86.61	2.97	1.72

48 hr	control	0.5%Ethanol	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
	β-sitosterol	media	113.01	95.40	101.21	103.21	8.97	5.19
		0.1 μM	104.05	110.77	92.67	102.49	9.15	5.29
		0.5 μM	103.80	98.05	90.73	97.53	6.55	3.78
		1 μM	111.98	95.62	74.41	94.00	18.83	10.89
		5 μM	100.75	78.73	80.57	86.68	12.21	7.06
		10 μM	82.68	82.30	81.39	82.12	0.66	0.38
		25 μM	79.24	73.69	61.15	71.36	9.27	5.36
		50 μM	85.15	72.25	70.24	75.88	8.09	4.68
72 hr	control	0.5%Ethanol	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
	β-sitosterol	media	112.19	84.76	84.63	93.86	15.88	9.18
		0.1 μM	94.51	88.07	80.37	87.65	7.08	4.09
		0.5 μM	97.46	98.63	89.52	95.21	4.96	2.87
		1 μM	83.85	92.28	79.17	85.10	6.65	3.84
		5 μM	82.19	65.11	66.16	71.15	9.57	5.53
		10 μM	62.91	67.57	64.81	65.10	2.35	1.36
		25 μM	67.20	58.02	64.45	63.22	4.71	2.72
		50 μM	70.05	44.06	47.31	53.81	14.16	8.19

ผลการทดลองการทดสอบสมรรถนะของ CYP3A4 (Determination of CYP3A4 enzyme activity)



ภาพที่ 32 กราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการเรืองแสง

ตารางที่ 11 ผลของสาร dexamethasone ต่อสมรรถนะของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

		Fold induction					
		N1	N2	N3	mean	SD	SEM
24 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	1.86	1.89	1.67	1.81	0.12	0.07
48 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	2.25	2.25	2.23	2.25	0.01	0.01
72 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	2.11	2.26	1.82	2.06	0.22	0.13

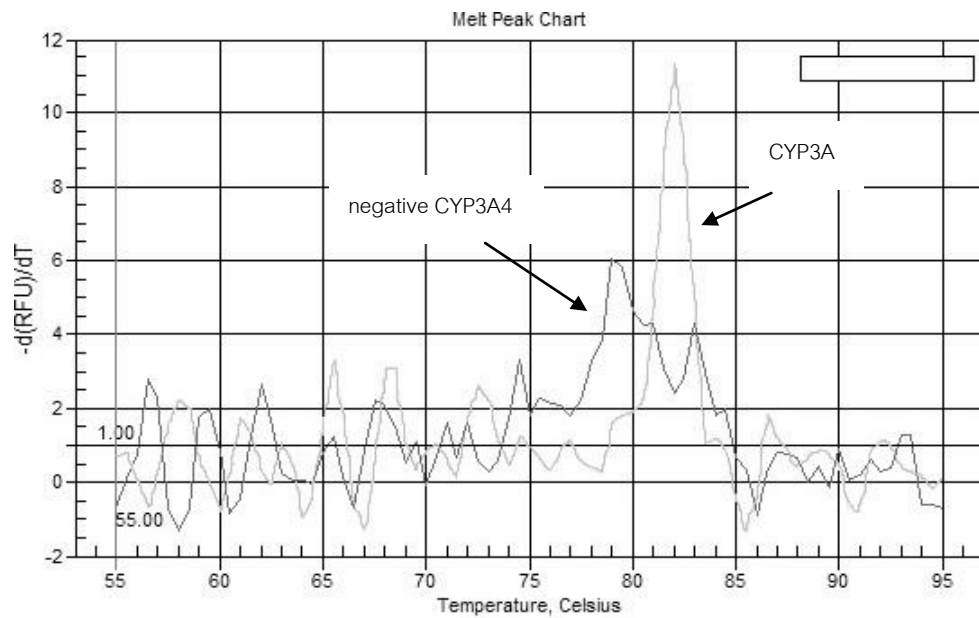
ตารางที่ 12 ผลของสิ่งสกัดต่อสมรรถนะของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

			Fold induction					
			N1	N2	N3	mean	SD	SEM
24 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 µg/ml	0.92	1.05	1.13	1.03	0.11	0.06
		5 µg/ml	0.99	1.49	1.16	1.21	0.25	0.15
		10 µg/ml	1.09	1.48	1.22	1.26	0.20	0.11
		25 µg/ml	1.19	1.35	0.96	1.17	0.20	0.11
48 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 µg/ml	0.89	1.36	1.07	1.11	0.24	0.14
		5 µg/ml	1.02	1.25	0.87	1.05	0.19	0.11
		10 µg/ml	1.07	1.26	1.35	1.22	0.14	0.08
		25 µg/ml	1.09	1.28	1.32	1.23	0.12	0.07
72 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 µg/ml	0.99	0.99	1.31	1.10	0.18	0.11
		5 µg/ml	0.89	1.09	1.40	1.13	0.26	0.15
		10 µg/ml	1.19	1.13	1.42	1.25	0.15	0.09
		25 µg/ml	1.08	1.39	1.52	1.33	0.23	0.13

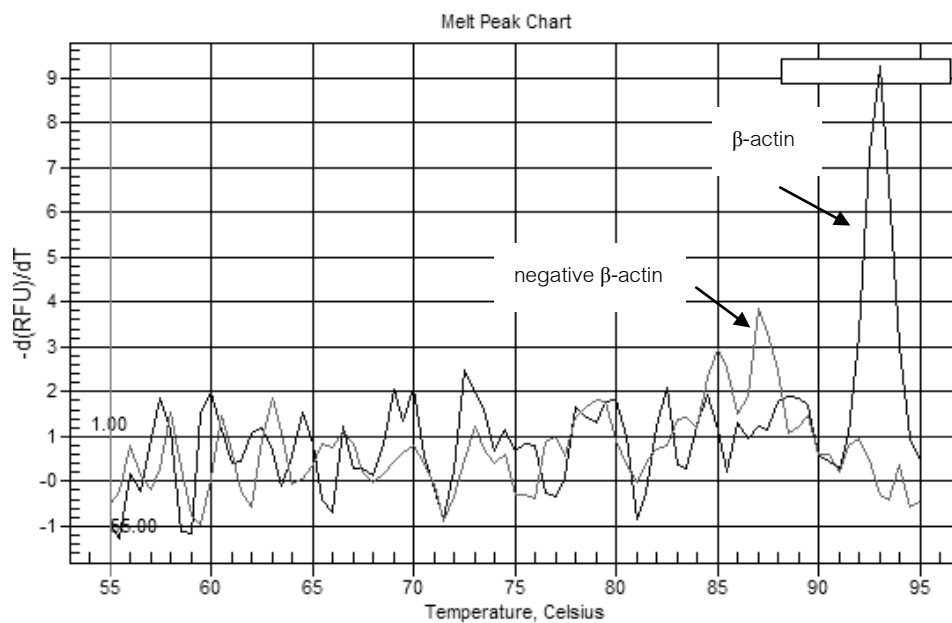
ตารางที่ 13 ผลของสาร β -sitosterol ต่อสมรรถนะของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

			Fold induction					
			N1	N2	N3	mean	SD	SEM
24 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 μ M	1.11	1.00	0.89	1.00	0.11	0.06
		0.5 μ M	1.10	0.82	1.11	1.01	0.17	0.10
		1 μ M	0.72	0.93	1.14	0.93	0.21	0.12
48 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 μ M	0.59	1.05	1.02	0.89	0.26	0.15
		0.5 μ M	1.55	1.27	0.96	1.26	0.30	0.17
		1 μ M	1.10	1.01	0.82	0.98	0.14	0.08
72 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 μ M	0.91	1.15	1.21	1.09	0.16	0.09
		0.5 μ M	0.72	1.21	1.06	1.00	0.25	0.15
		1 μ M	0.51	1.17	1.05	0.91	0.35	0.20

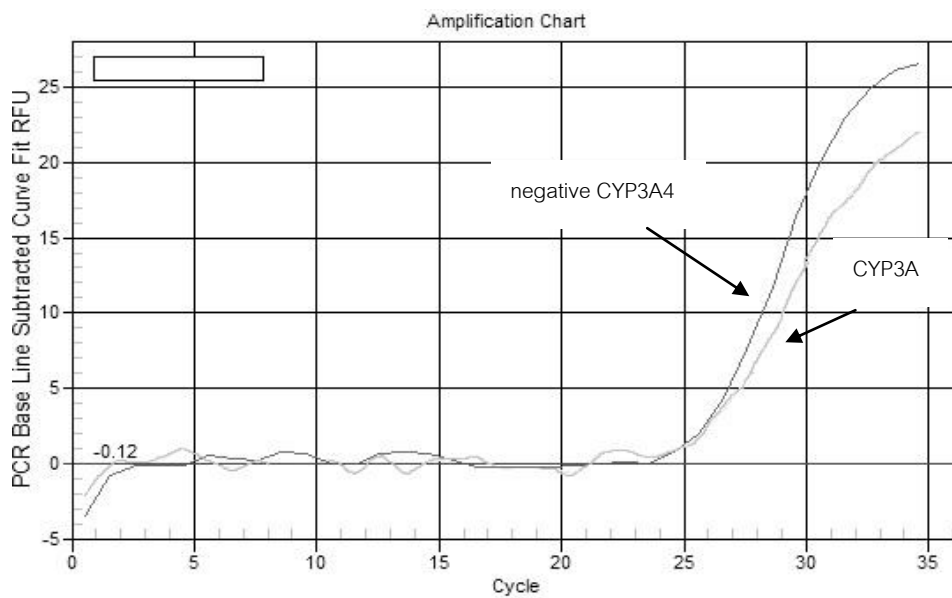
ผลการทดลองการหาปริมาณ CYP3A4 mRNA โดยวิธี Real time-PCR (Real time-PCR analysis of CYP3A4 mRNA)



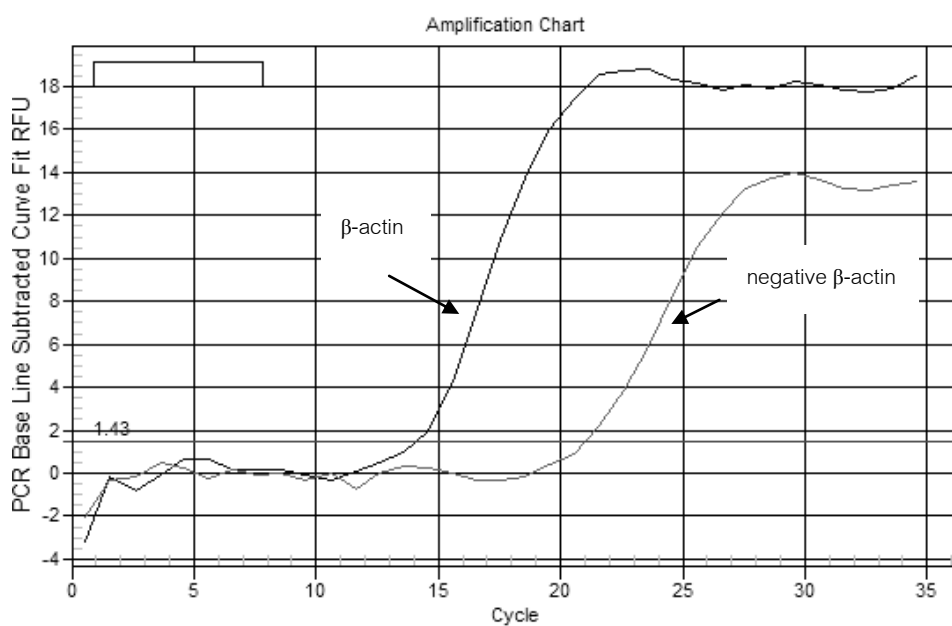
ภาพที่ 33 กราฟ Melt Curve ของ CYP3A4 และ negative CYP3A4



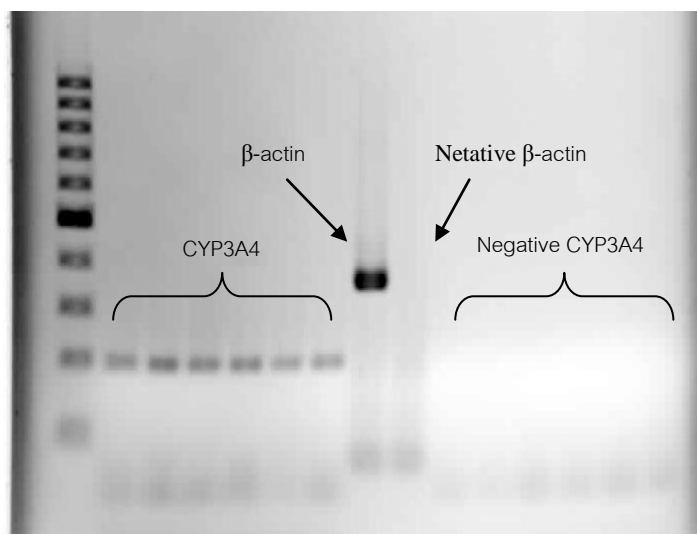
ภาพที่ 34 กราฟ Melt Curve ของ β -actin และ negative β -actin



ภาพที่ 35 กราฟ Amplification ของ CYP3A4 และ negative CYP3A4



ภาพที่ 36 กราฟ Amplification ของ β -actin และ negative β -actin



ภาพที่ 37 Agarose gel electrophoresis ของ mRNA CYP3A4 และ mRNA β -actin

ตารางที่ 14 ผลของสาร dexamethasone ต่อการแสดงออก ของ CYP3A4 mRNA ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

		Fold induction					
		N1	N2	N3	mean	SD	SEM
12 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	3.59	3.21	2.98	3.26	0.31	0.18
24 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	1.73	1.96	1.50	1.73	0.23	0.13

ตารางที่ 15 ผลของสิ่งสกัดต่อการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

			Fold induction					
			N1	N2	N3	mean	SD	SEM
12 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 µg/ml	2.62	2.28	1.80	2.23	0.41	0.24
		25 µg/ml	0.47	0.62	0.25	0.45	0.18	0.11
24 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 µg/ml	0.44	0.32	0.52	0.42	0.10	0.06
		25 µg/ml	0.18	0.20	0.55	0.31	0.20	0.12

ตารางที่ 16 ผลของสาร β -sitosterol ต่อการแสดงออกของ CYP3A4 mRNA ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

			Fold induction					
			N1	N2	N3	mean	SD	SEM
12 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 µM	3.04	3.57	3.63	3.41	0.32	0.19
		1 µM	1.08	0.70	0.37	0.72	0.35	0.20
24 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 µM	0.85	0.78	0.80	0.81	0.04	0.02
		1 µM	0.30	0.56	0.55	0.47	0.15	0.08

ผลการทดลองการหาปริมาณโปรตีน CYP3A4 โดยวิธี Western blot analysis (Western blot analysis of CYP3A4 protein)

ตารางที่ 17 ผลของสาร dexamethasone ต่อปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

		Fold induction					
		N1	N2	N3	mean	SD	SEM
24 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	1.66	1.68	1.75	1.70	0.05	0.03
48 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	1.51	1.66	1.58	1.58	0.07	0.04
72 hr	control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	50 μ M DEX	1.39	1.59	1.60	1.53	0.12	0.07

ตารางที่ 18 ผลของสิ่งสกัดต่อปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

			Fold induction					
			N1	N2	N3	mean	SD	SEM
24 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 μ g/ml	0.93	0.99	0.97	0.96	0.03	0.02
		25 μ g/ml	1.01	0.98	1.00	1.00	0.02	0.01
48 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 μ g/ml	0.98	0.81	1.25	1.01	0.22	0.13
		25 μ g/ml	0.90	1.00	1.23	1.04	0.17	0.10
72 hr	control	0.5%DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	Extract	1 μ g/ml	1.27	1.06	0.92	1.08	0.18	0.10
		25 μ g/ml	1.02	1.19	1.00	1.07	0.10	0.06

ตารางที่ 19 ผลของสาร β -sitosterol ต่อปริมาณโปรตีนของ CYP3A4 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

			Fold induction					
			N1	N2	N3	mean	SD	SEM
24 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 μ M	1.02	1.08	0.95	1.02	0.07	0.04
		1 μ M	1.12	1.18	1.04	1.11	0.07	0.04
48 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 μ M	0.87	1.07	1.45	1.13	0.30	0.17
		1 μ M	0.80	0.86	0.97	0.88	0.08	0.05
72 hr	control	0.5%Ethanol	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
	β -sitosterol	0.1 μ M	1.27	1.21	0.99	1.16	0.15	0.08
		1 μ M	1.12	1.25	1.30	1.22	0.09	0.05

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว กรรติน์ รัตนวัฒนาธร เกิดวันที่ 2 มีนาคม พ.ศ. 2530 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปี พ.ศ. 2551 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2552