

ผลของกาแฟและชาเขียวต่อการขับออกของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในเซลล์ Caco-2

Effects of Coffee and Green Tea on Efflux of Aflatoxin B₁ in Caco-2 Cells

อัจฉริยาพร เดชโยธิน (Achariyaporn Detyotin)* ดร.สุพัตรา ปรสุพัตนา (Dr.Supatra Porasuphatana)**

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยในเชิงทดลองเพื่อศึกษาเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกาแฟและชาเขียวต่อ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (Aflatoxin B₁, AFB₁) โดยการทดสอบการขับออกของ AFB₁ ด้วยกาแฟและชาเขียวในเซลล์ Caco-2 ผ่านทาง Breast Cancer Resistant Protein (BCRP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารออกนอกเซลล์ (efflux transporter) และได้ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน BCRP ด้วยวิธี Western blot ผลการศึกษาพบว่า กาแฟและชาเขียวมีผลเพิ่มการขับ AFB₁ ออกจากเซลล์ และชาเขียวมีผลเพิ่มการขับ AFB₁ ได้ดีกว่ากาแฟ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน BCRP ที่พบว่าชาเขียวมีการแสดงออกของโปรตีน BCRP มากกว่ากาแฟ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อการแสดงออกของโปรตีน BCRP เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับความสามารถในการขับ AFB₁ ออกจากเซลล์ได้มากขึ้นเช่นกัน

ABSTRACT

This research is an experimental research to study the efficacy of coffee and green tea to Aflatoxin B₁ (AFB₁) by studying expulsion of AFB₁ by coffee and green tea in Caco-2 cells through Breast Cancer Resistant Protein (BCRP), a protein that acts as transport substances out of the cell (efflux transporter). BCRP protein expression in the presence of coffee and green tea was analyzed by Western blot. Results showed that coffee and green tea increased the efflux of AFB₁ at apical side. Green tea efflux AFB₁ that coffee. This is consistent with the analysis of protein expression BCRP found that green tea expressed of BCRP than coffee. So, it is possible that when increase expression of BCRP, resulting in the increase of AFB₁ efflux into intestinal lumen more.

คำสำคัญ: การจับกันของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง การขับออกของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง Breast Cancer Resistant Protein

Key Words: Binding of Aflatoxin B₁, Efflux of Aflatoxin B₁, Breast Cancer Resistant Protein

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นกลุ่มสารพิษชนิดหนึ่งที่มักพบปนเปื้อนอยู่ในอาหาร สร้างขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* สารอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในธรรมชาติมี 4 ชนิด คืออะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1 และ จี 2 พบได้ทั่วไปในอาหาร และผลผลิตทางการเกษตร โดยเชื้อราชนิดนี้เติบโตได้ดีในอากาศร้อน และมีความชื้นอยู่ด้วย อะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ และมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ในสัตว์ทดลองหลายชนิดและเป็นสาเหตุของมะเร็งตับในมนุษย์จากการเปรียบเทียบความรุนแรงของสารพิษจากเชื้อราขององค์การอนามัยโลก ในกลุ่ม อะฟลาทอกซินที่มีความรุนแรงมากที่สุด คือ อะฟลาทอกซินบี₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้ AFB₁ เป็นสารก่อมะเร็งที่อยู่ใน Class I (International Agency for Research on Cancer, 2002) คือสามารถเป็นสารก่อมะเร็งได้ในมนุษย์

กาแฟเป็นเครื่องดื่มยอดนิยมโดยเฉพาะในกลุ่มวัยทำงาน และมีแนวโน้มขยายฐานผู้บริโภคมากขึ้น เพราะการดื่มกาแฟช่วยเพิ่มความสดชื่นหรือกระตุ้นให้เกิดความตื่นตัว ชาเขียวเป็นเครื่องดื่มที่มีการบริโภคอย่างกว้างขวางเช่นกัน จึงมีผู้วิจัยพยายามที่จะศึกษาคุณสมบัติทั้งผลดี และผลเสียจากเครื่องดื่มทั้งสองชนิด ในการศึกษาพบว่าทั้งกาแฟและชาเขียวมี polyphenols เป็นองค์ประกอบ polyphenols เป็นสารเคมีธรรมชาติพบได้ทั่วไปในพืช ผัก ผลไม้ เป็นสารที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้เร็ว

Cooray et al. (2004) และ Scheepens et al. (2010) ที่ศึกษาผลของ polyphenols ต่อการแสดงออกของ BCRP พบว่า polyphenols ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งจะช่วยให้การแสดงออกของ BCRP ดังนั้น BCRP จึงทำงานได้ดีขึ้น มีผลทำให้การขับออกของสารมากขึ้นด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาของ Isshiki et al. (2010) กาแฟมีผลเพิ่มการแสดงออกของ BCRP ใน Caco-2 cells และระดับการแสดงออกสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกาแฟ นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของ BCRP ที่เพิ่มขึ้นจะลดการดูดซึมของยา สารเคมีต่างๆ และรวมถึงสารก่อมะเร็ง เช่น อะฟลาทอกซิน ได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางระบาดวิทยาของ Galeone et al. (2010) พบว่ากาแฟเพิ่มการแสดงออกของ BCRP และการได้รับกาแฟเป็นประจำ ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

จากการศึกษาของ Robey et al. (2009) เกี่ยวกับ ABCG2 (BCRP) พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้มากบริเวณ epithelial cells ของลำไส้เล็ก ซึ่งสอดคล้องกับ Xia et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกตำแหน่ง และหน้าที่ของ BCRP ใน Caco-2 cells พบว่า BCRP ทำให้มีการขับสารจากด้าน basolateral สู่มุมด้าน apical และเมื่อเพิ่ม Ko143 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ BCRP พบว่าเพิ่มการขับสารจากด้าน apical สู่มุมด้าน basolateral มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า BCRP มีผลทำให้มีการขับออกของสารกลับจากเซลล์เข้าสู่ต่อทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจ ที่จะศึกษาความเกี่ยวข้องระหว่างกาแฟ และชาเขียวกับการแสดงออกของ BCRP ต่อการขับออกของ AFB₁ เนื่องจากถ้าสามารถเพิ่มการขับออก ในส่วนบริเวณลำไส้ก่อนที่จะเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด จะช่วยลดโอกาสในการที่ AFB₁ จะเข้าสู่ตับและเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งนำไปสู่การทำลาย DNA และเป็นมะเร็งตับ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของกาแฟและชาเขียวต่อการขับออก (efflux) ของ AFB₁ ผ่านทาง BCRP ใน Caco-2 cells
2. เพื่อศึกษาผลของกาแฟและชาเขียวต่อการจับกัน (binding) กับ AFB₁ ในหลอดทดลอง

วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยในเชิงทดลองเพื่อศึกษาเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกาแฟและชาเขียวต่อ AFB₁ โดยการศึกษาการทดสอบการจับกันของสาร AFB₁ กับกาแฟและชาเขียวในหลอดทดลอง และการทดสอบการขับออกของ AFB₁ กับกาแฟและชาเขียวในเซลล์ Caco-2 ผ่านทาง BCRP

1. การเตรียมเซลล์ Caco-2 และการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F12 ที่มี L-glutamate, 15 mM HEPES และส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic antimycotic solution เลี้ยงใส่ culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน

2. การทดสอบความพร้อมของ Caco-2 cells ด้วย Phenol red (ดัดแปลงจาก Martel et al., 2003) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีการซึมผ่านของ Phenol red เป็นวิธีวัดความพร้อมของเซลล์ต่อการดูดซึมสาร AFB₁ เมื่อนำเซลล์ Caco-2 มาเลี้ยงใน insert บน 24 well plates แล้วทดสอบการซึมผ่านของ phenol red โดยใส่ phenol red ลงในด้าน apical 400 µl ส่วนด้าน basolateral ใส่อาหาร 600 µl หลังจากนั้นนำไปไว้ใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลานี้เป็นระยะเวลาเดียวกับที่จะใช้ทดสอบการขับออกของสาร AFB₁ จากนั้นเก็บอาหารด้าน basolateral 200 µl แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 560 nm. ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยทำการทดลองทุก 2-3 วัน จนกว่าค่า Permeability coefficient จะมีอัตราคงที่ และเป็นเซลล์ที่พร้อมสำหรับการทดสอบการเคลื่อนที่ของสาร AFB₁

นำผลจากค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณการไหลผ่านของฟีนอลเรด โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

$$J_{PR} = \frac{A_{560} \times Vol}{t \times A \times EC}$$

J_{PR} คือ การไหลผ่านของสารฟีนอลเรด

A₅₆₀ คือ ค่าดูดกลืนแสงของฟีนอลเรด

Vol คือ ปริมาณสาร (200 µl)

t คือ ระยะเวลาที่เริ่มใส่ฟีนอลเรดจนถึงเก็บตัวอย่าง (4 ชั่วโมง)

A คือ พื้นที่ผิวหน้าของ insert (0.785 cm²)

EC คือ ค่า Extinction coefficient ของฟีนอลเรด (8,450 L/mol/cm)

3. การวัดความเป็นพิษของ AFB₁, กาแฟและชาเขียว ต่อเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี MTT test (ดัดแปลงจาก Kroll et al., 2011) เพื่อเป็นการทดสอบว่าสาร AFB₁ กาแฟและชาเขียวที่ใช้ในการทดลองนั้นมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ Caco-2 (cell viability) ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะทำปฏิกิริยากับสาร MTT และเปลี่ยนให้เป็น formazan salt และเมื่อละลายผลึก formazan salt ด้วย DMSO แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแรกทดสอบสาร AFB₁ ที่ความเข้มข้น 20, 50, 100, 200 และ 500 ng/ml กลุ่มที่ 2 ทดสอบเพื่อให้เซลล์สัมผัสกับกาแฟหรือชาเขียว ที่ความเข้มข้นสูงสุดของกาแฟหรือชาเขียวที่จะใช้ในการทดสอบการขับออกคือ 15 mg/ml และกลุ่มที่ 3 ทดสอบให้เซลล์สัมผัสกับสาร AFB₁ เมื่อผสมกับกาแฟหรือชาเขียว ความเข้มข้นของ AFB₁ ที่ใช้คือ 200 ng/ml และความเข้มข้นของกาแฟหรือชาเขียวที่ใช้คือ 15 mg/ml 0.5% DMSO เป็นกลุ่มควบคุม โดยทั้ง 3 กลุ่มให้สารสัมผัสกับเซลล์บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติม 100%DMSO เขย่าทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 nm. ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณค่าการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ที่ได้รับสารที่ความเข้มข้นต่างกันเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร (ควบคุม) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปร้อยละ โดยกลุ่มควบคุม เทียบเท่ากับค่าการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100%

4. หาปริมาณ total phenolic compounds, total flavonoids ในกาแฟและชาเขียว

4.1 วัดปริมาณ total phenolic compounds (Chan et al., 2009; Maizura, 2011) โดยเตรียมกาแฟ

และชาเขียว 1 mg/ml. ปริมาณ 1 ml ใส่ตัวอย่าง 300 μ l ในหลอดทดลองที่ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เติม Folin-Ciocalteu's reagent (dilute 10 เท่า) 1.5 ml เติม 7.5% NaNO_2 (w/v) 1.2 ml ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader จำนวนปริมาณ phenolics โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid

4.2 วัดปริมาณ total flavonoids (Eghdami, Sadeghi, 2010) โดยเตรียมกาแฟและชาเขียว 1 mg/ml. ปริมาณ 0.1 ml เติมน้ำกลั่น 0.3 ml เติม 5% NaNO_2 ปริมาณ 0.03 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 10% AlCl_3 ปริมาณ 0.03 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบ 5 นาทีเติม 1 mM NaOH ปริมาณ 0.2 ml ผสมให้เข้ากัน เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 510 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader จำนวนปริมาณ flavonoids โดยเทียบกับสารมาตรฐาน catechin

5. การทดสอบการจับกันระหว่าง AFB_1 กับกาแฟและชาเขียว เพื่อศึกษาความสามารถของกาแฟและชาเขียวในการจับกับ AFB_1 ในหลอดทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มแรก เตรียม AFB_1 ความเข้มข้น 200 ng/ml กลุ่มที่ 2 และ 3 เตรียม AFB_1 ความเข้มข้น 200 ng/ml ผสมกับกาแฟที่ความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml กลุ่มที่ 4 และ 5 เตรียม AFB_1 ความเข้มข้น 200 ng/ml ผสมกับชาเขียวที่ความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml นำไปเก็บไว้ในตู้ Incubator ที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากครบ 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วยวิธี Solid phase extraction (SPE) จากนั้นระเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อตัวอย่างแห้งแล้วนำไปทำอนุพันธ์ของ AFB_1 (derivatization) ด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) (Akiyama et al., 2001) และวิเคราะห์หาปริมาณ AFB_1 ด้วยเครื่อง HPLC ต่อพ่วงด้วย fluorescence detector Excitation wavelength : 360 nm. Emission

wavelength : 440 nm. Mobile phase คือ $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} : \text{ACN} = 65 : 25 : 10$ และนำค่าที่ได้เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน AFB_1

6. การทดสอบการขับออกของ AFB_1 ผ่านเซลล์ **Caco-2** (Ebert et al., 2005; Xia et al., 2005) เพาะเลี้ยงเซลล์บน insert ในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม จำนวน 10^5 เซลล์/insert ใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 21 วัน และแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

กลุ่ม 1 ควบคุม

- เติม AFB_1 200 ng/ml
- เติม AFB_1 200 ng/ml + Ko143 5 μ M

กลุ่ม 2 without Ko143

- เติม AFB_1 200 ng/ml + กาแฟความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml
- เติม AFB_1 200 ng/ml + ชาเขียวความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml

กลุ่ม 3 with Ko143

- เติม AFB_1 200 ng/ml + Ko143 5 μ M + กาแฟความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml
- เติม AFB_1 200 ng/ml + Ko143 5 μ M + ชาเขียวความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml

โดยเติมกาแฟและชาเขียวลงในเซลล์ด้าน apical บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากครบ 24 ชั่วโมง ล้างกาแฟและชาเขียวออก ส่วนการทดลองที่มี Ko143 ให้เติมแล้วบ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง (กลุ่มที่ไม่มี Ko143 ให้เติมอาหารแทน) หลังจากนั้นเติม AFB_1 (ไม่ต้องล้าง Ko143 ออก) บ่มทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง (Herwaarden et al., 2006) เมื่อครบ 4 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งด้าน apical และ basolateral ไปสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณ AFB_1 ด้วยเครื่อง HPLC

นำมาหาค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน (Permeability coefficient) ของ AFB_1 จากด้าน apical ไปสู่ด้าน basolateral ทั้งที่มีกาแฟ/ชาเขียวและไม่มีกาแฟ/ชาเขียว

ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของสาร AFB₁ นั้นมีวิธีการหาที่เฉพาะโดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$P = J / (C_0 * A)$$

P = ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน (cm/s)

J = อัตราที่สารเคลื่อนผ่าน Caco-2 monolayer ไปสู่ basolateral (ng/s)

C₀ = ค่าความเข้มข้นของสารในชั้น apical (ng/ml)

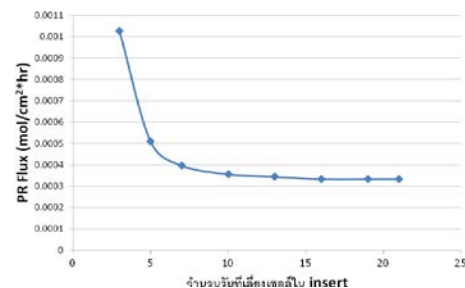
A = พื้นที่ผิวหน้าของ filter ที่เลี้ยงเซลล์ Caco-2 (cm²)

7. การวิเคราะห์เพื่อแสดงออกของโปรตีน BCRP ด้วยวิธี Western blot (Ebert et al., 2005; Isshiki et al., 2011) ใช้เซลล์ที่ได้จากการทดสอบข้อ 6 มาทำ cell lysis บน buffer ที่มี 50 mM Tris-HCL (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% SDS, 1% Triton X-100 และ protease inhibitors (1:100 protinin+leupeptin และ 10 μM phenylmethylsulfonyl fluoride) หลังจากนั้น นำ cell lysate ที่ได้ไป sonicated และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuged ที่ 10,000 g 4 °C เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายส่วนใสมาหาปริมาณของโปรตีน โดยวิธี Lowry assay นำตัวอย่าง (โปรตีน 80 ug) ใส่ลงใน 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ ย้ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane ใช้กระแสไฟฟ้า 11 โวลต์ blocking ด้วย BSA 10 mg/ml ระบุ BCRP protein ด้วย anti-BCRP antibody BXP-21 (anti-mouse IgG_{2a}, เจือจาง 1:150) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบ 2 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1xPBS + 0.3% tween 20 เป็นเวลา 5 นาที ทำ 5 ครั้ง หลังจากนั้นเติม secondary horse-radish peroxidase-conjugated antibody (1:1,000) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบ 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1xPBS + 0.3% tween 20 เป็นเวลา 5 นาที ทำ 5 ครั้ง วิเคราะห์แถบโปรตีนด้วย DAB kit และวัดความหนาแน่นของแถบโปรตีนด้วยเครื่อง Densitometer

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. การทดสอบความพร้อมของ Caco-2 cells ด้วยวิธี Phenol red

เมื่อคำนวณหาการไหลของ phenol red แล้วนำมาแสดงในรูปของกราฟ จากภาพที่ 1 พบว่าหลังจากนำเซลล์ใส่ใน insert ในวันที่ 5 และ 7 ค่าการไหลของ phenol red เริ่มลดลงอย่างรวดเร็วและหลังจากวันที่ 7 อัตราการไหลผ่านของ phenol red เริ่มลดลงและคงที่ในวันที่ 16 ถึงวันที่ 21 แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่พร้อมสำหรับการทดสอบการเคลื่อนที่ของสาร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Laitinen (2006) พบว่าเมื่อเซลล์ Caco-2 อายุครบ 21 วัน จะมีการเปลี่ยนแปลงเหมือนเซลล์ผนังลำไส้เล็กที่มี brush border หรือ microvilli ในด้าน apical มี tight junction เชื่อมระหว่างเซลล์ ซึ่งจะทำให้การไหลผ่านของสารต่างๆจะคงที่ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เซลล์มีความสมบูรณ์



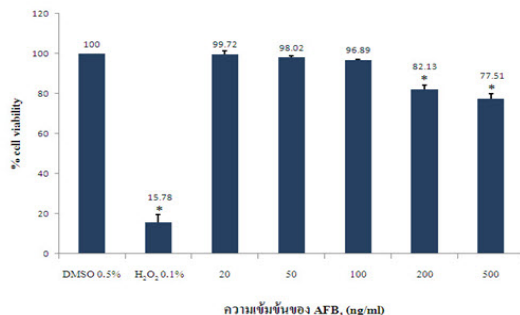
ภาพที่ 1 แนวโน้มการไหลผ่านของฟีนอลเรดจากชั้น apical สู่ basolateral ใน insert ที่เลี้ยงเซลล์ Caco-2 เริ่มจากวันที่ 3 ถึงวันที่ 21 หลังจากนำเซลล์ลงใน insert

2. การวัดความเป็นพิษของ AFB₁, กาแฟและชาเขียวต่อเซลล์ Caco-2 ด้วยวิธี MTT test

ผลการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ Caco-2 พบว่า AFB₁, กาแฟและชาเขียว ทุกความเข้มข้นมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ สารที่มีความเข้มข้นมาก การมีชีวิตรอดของเซลล์ก็จะลดลง Caco-2 ดังแสดงใน

ภาพที่ 2 ในงานวิจัยนี้ใช้ AFB₁ ที่ความเข้มข้น 200 ng/ml ในการทดสอบการยับยั้งของ AFB₁ ผลการมีชีวิตรอดของเซลล์คือร้อยละ 82.13±2.03

ความเข้มข้นสูงสุดกาแฟหรือชาเขียวที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งของ AFB₁ คือ 15 mg/ml เมื่อทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ พบว่า กาแฟที่ความเข้มข้น 15 mg/ml มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ร้อยละ 98.02±0.21 และ 99.14±0.83 สำหรับชาเขียวที่ความเข้มข้น 15 mg/ml ซึ่งทั้งกาแฟและชาเขียวมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทดสอบ AFB₁ ที่ความเข้มข้น 200 ng/ml ร่วมกับกาแฟหรือชาเขียวที่ความเข้มข้น 15 mg/ml พบว่า AFB₁+กาแฟ, AFB₁+ชาเขียว ml มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ร้อยละ 82.06±0.67 และ 83.15±1.14 ตามลำดับ แสดงว่าความเป็นพิษต่อเซลล์น่าจะเป็นผลมาจาก AFB₁ ซึ่งถือว่าผลการศึกษากการยับยั้งของสาร AFB₁ ในงานวิจัยนี้มาจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตรอดมากกว่าร้อยละ 80



ภาพที่ 2 ผลของสาร AFB₁ ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์

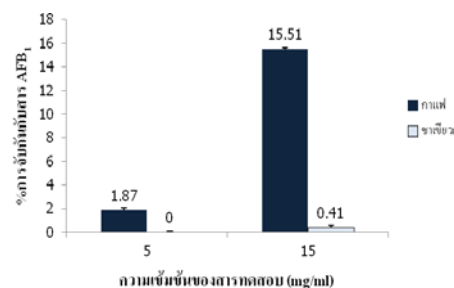
Caco-2 ที่ได้รับสัมผัสสาร AFB₁ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธี MTT assay

3. หาปริมาณ total phenolic compounds, total flavonoids ในกาแฟและชาเขียว

3.1 วัดปริมาณ total phenolic compounds โดยนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ปริมาณที่ได้ออกมาจะอยู่ในหน่วย มิลลิกรัมของ gallic acid equivalents ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของกาแฟหรือชาเขียว (mgGAE/100 g of dry weight) พบว่า TPC ที่พบในกาแฟและชาเขียวมีปริมาณ 1,456.08±4.82 และ 1,022.40±5.85 mgGAE/100 g of dry weight ตามลำดับ

3.2 วัดปริมาณ total flavonoids โดยนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน catechin ปริมาณที่ได้ออกมาจะอยู่ในหน่วย มิลลิกรัม catechin equivalents ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของกาแฟหรือชาเขียว (mgCE/100 g of dry weight) พบว่า TF ที่พบในกาแฟและชาเขียวมีปริมาณ 878.69±3.84 และ 1,259.47±4.34 mgCE/100 g of dry weight ตามลำดับ

4. การทดสอบการจับกันระหว่าง AFB₁ กับกาแฟและชาเขียว ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่า กาแฟที่ความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml สามารถจับ AFB₁ ได้เท่ากับร้อยละ 1.87 และ 15.50 ตามลำดับ สำหรับชาเขียวที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ไม่จับกับ AFB₁ และที่ความเข้มข้น 15 mg/ml จับ AFB₁ ได้เท่ากับร้อยละ 0.41 แสดงให้เห็นว่ากาแฟสามารถจับกับ AFB₁ ได้ดีกว่าชาเขียว และสามารถจับกับ AFB₁ ได้ดีที่ความเข้มข้นสูง ส่วนกาแฟที่ความเข้มข้นต่ำและชาเขียวที่ความเข้มข้นสูงสามารถจับกับ AFB₁ ได้เพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 3 ผลของการจับกันระหว่าง AFB₁ ความเข้มข้น 200 ng/ml กับกาแฟหรือชาเขียวที่

ความเข้มข้น 5 และ 15 mg/ml

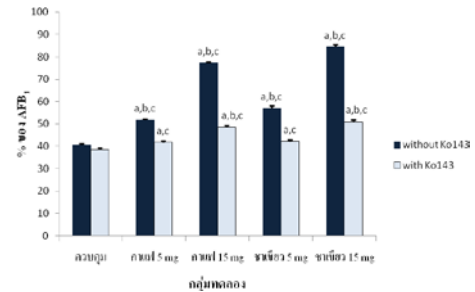
การทดสอบการจับกันของ AFB₁ และกาแฟหรือชาเขียวเพื่อแสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการทดสอบการจับออกของ AFB₁ ซึ่งจะมีการล้างกาแฟหรือชาเขียวออกก่อนการเติม AFB₁ ดังนั้นแม้จะมีการตกค้างของกาแฟหรือชาเขียว ผลที่เกิดจากการจับกันจะมีเพียงเล็กน้อย แสดงว่าปริมาณ AFB₁ ที่วัดได้จากการทดสอบการจับออก AFB₁ เป็นผลจากการทำงานของโปรตีน BCRP ของกาแฟหรือชาเขียว

5. การทดสอบการจับออกของ AFB₁ ผ่านเซลล์ Caco-2

5.1 จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่มีการเติมกาแฟและกลุ่มที่มีการเติมชาเขียว เมื่อทำการวัดปริมาณ AFB₁ พบว่าในด้าน apical มีปริมาณของ AFB₁ มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของทั้งกาแฟและชาเขียว กลุ่มความเข้มข้น 15 mg/ml พบปริมาณ AFB₁ ในด้าน apical มากกว่ากลุ่มความเข้มข้น 5 mg/ml และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกาแฟและชาเขียวพบว่ากลุ่มของชาเขียวตรวจพบปริมาณ AFB₁ ในด้าน apical มากกว่ากลุ่มของกาแฟ ดังแสดงในภาพที่ 4

ส่วนในด้าน basolateral กลุ่มที่มีกาแฟและชาเขียว เมื่อทำการวัดปริมาณ AFB₁ พบว่ามีปริมาณ AFB₁ น้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของทั้งกาแฟและชาเขียว กลุ่มความเข้มข้น 15 mg/ml พบปริมาณ AFB₁ ในด้าน basolateral น้อยกว่ากลุ่มความเข้มข้น 5 mg/ml และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกาแฟและชาเขียวพบว่ากลุ่มของชาเขียวตรวจพบปริมาณ AFB₁ ในด้าน basolateral น้อยกว่ากลุ่มของกาแฟ ดังแสดงในภาพที่ 17

ซึ่งความแตกต่างปริมาณ AFB₁ ทั้งในด้าน apical และ basolateral มีความสอดคล้องกับปริมาณรวมของ AFB₁ ที่พบในทั้ง 2 ด้าน



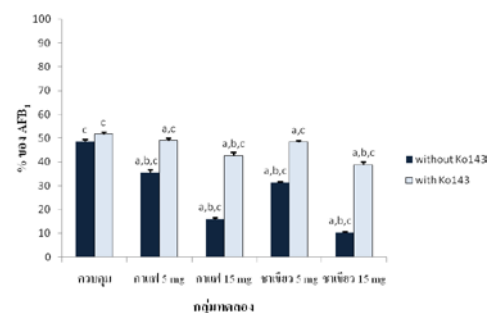
ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร AFB₁

ด้าน apical ของเซลล์ Caco-2

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม $p < 0.05$

b แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชาเขียวที่ความเข้มข้นเดียวกัน $p < 0.05$

c แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ Ko143 กับ กลุ่มที่ได้ Ko143 $p < 0.05$



ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร AFB₁

ด้าน basolateral ของเซลล์ Caco-2

a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม $p < 0.05$

b แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชาเขียวที่ความเข้มข้นเดียวกัน $p < 0.05$

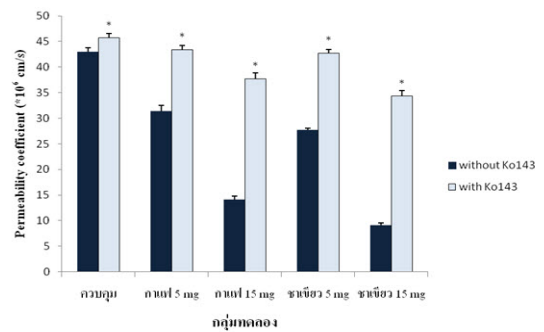
c แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบ
กลุ่มที่ได้ Ko143 กับ กลุ่มที่ไม่ได้ Ko143

$p < 0.05$

เมื่อมีการเติม Ko143 ที่ความเข้มข้น 5 μM ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ BCRP ลงในเซลล์และปมเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนการเติม AFB₁ พบว่าทั้งกลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีการเติมกาแฟและเติมชาเขียวทั้ง 2 ความเข้มข้น (5 และ 15 mg/ml) ที่มี Ko143 วัดปริมาณ AFB₁ ในด้าน apical น้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเติม Ko143 และตรวจพบปริมาณ AFB₁ ในด้าน basolateral มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติม Ko143 และเมื่อนำมาเทียบสถิติด้วย t-test พบว่ากลุ่มที่เติม Ko143 และไม่เติม Ko143 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.2 จากผลการทดลองในข้อ 5.1 เมื่อนำมาหาค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน พบว่าในกลุ่มที่มีการเติมกาแฟและกลุ่มที่มีการเติมชาเขียวการซึมผ่านของสาร AFB₁ จากด้าน apical ไปสู่ด้าน basolateral จะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของทั้งกาแฟและชาเขียว กลุ่มความเข้มข้น 15 mg/ml พบปริมาณ AFB₁ น้อยกว่ากลุ่มความเข้มข้น 5 mg/ml และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกาแฟและชาเขียว พบว่ากลุ่มที่มีการเติมชาเขียวมีค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านน้อยกว่ากลุ่มที่มีการเติมกาแฟ แสดงให้เห็นว่าการซึมผ่านของ AFB₁ น้อยกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการเติม Ko143 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ BCRP มีผลทำให้สัมประสิทธิ์การซึมผ่านจากด้าน apical ไปสู่ด้าน basolateral เพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่มควบคุม กลุ่มของกาแฟ และกลุ่มของชาเขียว ดังแสดงในภาพที่ 6 เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มี Ko143 และไม่มี Ko143 นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีตัวยับยั้งการทำงานของ BCRP ทำให้มีการดูดซึม AFB₁ จากชั้น apical สู่ชั้น basolateral เพิ่มขึ้น



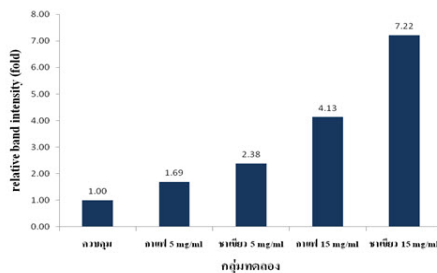
ภาพที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของสาร AFB₁

จากด้าน apical สู่ด้าน basolateral ของเซลล์ Caco-2 ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีกาแฟ/ชาเขียว และ กลุ่มที่มี Ko143 และไม่มี Ko143

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่มี Ko143 และไม่มี Ko143

$p < 0.05$

6. วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน BCRP ด้วยวิธี Western blot ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 7 แสดงให้เห็นว่ากาแฟและชาเขียวเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน BCRP มากกว่ากลุ่มควบคุม ชาเขียวพบการแสดงออกของโปรตีน BCRP มากกว่ากาแฟ โดยที่ความเข้มข้นของกาแฟและชาเขียวที่มากขึ้นก็จะมีการแสดงออกของโปรตีนมากขึ้นด้วยเช่นกัน เมื่อทำการทดลอง 2 ครั้ง พบว่าอัตราส่วนของการเพิ่มปริมาณโปรตีนของกลุ่มที่มีการเติมกาแฟและกลุ่มที่มีการเติมชาเขียวทั้ง 2 ความเข้มข้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นไปในทางเดียวกัน



ภาพที่ 7 ความหนาแน่น (density) ของการแสดงออกของโปรตีน BCRP ในรูปอัตราส่วนของกลุ่มทดลองต่างๆ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาผลของกาแฟและชาเขียวต่อการขับออก (efflux) ของ AFB₁ ใน Caco-2 cells ผ่านทาง BCRP ซึ่งเป็น โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารออกนอกเซลล์ (efflux transporter) การแสดงออกของ BCRP ที่เพิ่มขึ้นจะลดการดูดซึมของยา สารเคมีต่างๆ และรวมถึงสารก่อมะเร็ง เช่น อะฟลาทอกซิน ได้ด้วย (Isshiki et al., 2011; Herwaarden et al., 2006) จากการศึกษาพบว่ากาแฟที่ความเข้มข้น 5 mg/ml สามารถลดค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านได้ร้อยละ 26.99 และ 67.09 ที่ความเข้มข้น 15 mg/ml สำหรับชาเขียวที่ความเข้มข้น 5 mg/ml สามารถลดค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านได้ร้อยละ 35.61 และ 78.73 ที่ความเข้มข้น 15 mg/ml ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อการแสดงออกของโปรตีน BCRP มากขึ้นมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านที่ลดลง

จากการทดลองหาปริมาณของ total phenolic compounds (TPC) และ total flavonoids (TF) ในกาแฟและชาเขียว พบว่าในกาแฟจะมีปริมาณ TPC มากกว่าชาเขียวมีปริมาณ สำหรับ TF จะพบชาเขียวมากกว่ากาแฟ ซึ่งจากงานวิจัยในอดีตพบว่า polyphenols ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มการแสดงออกของ BCRP ดังนั้น BCRP จึงทำงานได้ดีขึ้น มีผลทำให้การขับออกของสารมากขึ้น

ด้วยเช่นกัน (Cooray et al., 2004; Scheepens et al., 2010) จากการทดสอบการขับออกของ AFB₁ และการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน BCRP แสดงให้เห็นว่าชาเขียวมีการขับออกของ AFB₁ ได้ดีกว่ากาแฟ และเมื่อการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน BCRP ชาเขียวมีการแสดงออกมากกว่ากาแฟอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากสารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันรวมถึง polyphenols ที่ต่างชนิดกัน ซึ่งองค์ประกอบที่พบในชาเขียวจัดอยู่ในกลุ่ม total flavonoids จึงอาจทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน BCRP ได้มากกว่ากลุ่ม phenolic compounds ที่พบในกาแฟ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาการขับออกของสาร AFB₁ ครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยให้สารสัมผัสกับเซลล์โดยตรง ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจถึงการขับออกของสาร การจับกัน และการซึมผ่านของสารที่มีต่อเซลล์ลำไส้เล็กของมนุษย์ ซึ่งโดยปกติร่างกายจะได้รับสัมผัสสาร AFB₁ โดยการรับประทานผ่านทางปากและมีกลไกการทำงานของระบบทางเดินอาหาร น้ำย่อย เอนไซม์ และสารต่างๆ จึงอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตให้ใกล้เคียงกับการรับสัมผัสจริง

BCRP นอกจากจะเพิ่มการขับออกของสารปนเปื้อนและสารก่อมะเร็งต่างๆ แต่ก็ยังรวมถึงสารอาหารและยาด้วยเช่นกัน ดังนั้นเมื่อมีการรับประทานยาอาจจำเป็นต้องหลีกเลี่ยงสารที่เพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

Bedard LL, Massey TE. Aflatoxin B₁-induced DNA damage and its repair. Cancer Letters 2006; (241): 174-183.

- Chan SW, Lee CY, Yap CF, Wan Aida WM, Ho CW. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (Citrus hystrix) peels. *International Food Research Journal* 2009;16: 203-213.
- Cooray HC, Janvilisri T, Veen H, Hladky SB, Barrand MA. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; (317): 269-275.
- Ebert B, Seidel A, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates Metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 2005; 10(26): 1754–1763.
- Eghdami A, Sadeghi F. Determination of Total Phenolic and Flavonoids Contents in Methanolic and Aqueous Extract of Achillea Millefolium. *Org. Chem. J* 2010;(2): 81-84.
- Galeone C, Turati F, Vecchia C, Tavani A. Coffee consumption and risk Of colorectal cancer: a meta- analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control* 2010; 21(11): 1949-59.
- Herwaarden AE, Wagenaar E, Karnekamp B, Merino G, Jonker JW, Schinkel AH. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B₁, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* 2006; 27(1): 123-130.
- International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2002; 40(82): 1-556.
- Isshiki M, Umezawa K, Tamura H. Coffee Induces Breast Cancer Resistance Protein Expression in Caco-2 Cells. *Biol. Pharm. Bull* 2011; 34(10): 1624-1627.
- Kroll A, Dierker C, Rommel C, Hahn D, Wohlleben W, Schulze-Isfort C, et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. *Part Fibre Toxicol* 2011; 8(9): 1-19.
- Laitinen L. Caco-2 cell cultures in the assessment of intestinal absorption: Effects of some co-administered drugs and natural compounds in biological matrices. [Academic Dissertation Division of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics]. Helsinki: University of Helsinki ; 2006.
- Martel F, Monteiro RR, Lemos C. Uptake of Serotonin at the Apical and Basolateral Membranes of Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells Occurs through the Neuronal Serotonin Transporter (SERT). *J Pharm Exp. Ther* 2003; (306): 355-362.
- Robey RW, Kenneth KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch D, Dean M, et al. ABCG2: A Perspective. *NIH Public Access* 2009; 61(1): 3-13.
- Scheepens A, Tan K, Paxton JW. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr* 2010; (5): 75-87.
- Xia CQ, Liu N, Yang D, Miwa G, Gan LG. Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 2005; (33): 637-643.