

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131 โทร.โครงการ: 2554A10862002

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

ภาษาไทย: บทบาทของ CaSR และ tight junction ในภาวะ omeprazole ยับยั้ง  
การขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ภาษาอังกฤษ: The role of CaSR and tight junction in omeprazole  
suppresses paracellular magnesium transport in epithelial-like Caco-2  
monolayer

### หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

นายณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

- 8 ส.ค. 2556

AQ. 0094610

316540  
0155066

เริ่มบริการ

14 ส.ค. 2556

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา

และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

อภิธานนาการ

## บทคัดย่อ

การได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานานส่งผลให้ปริมาณแมกนีเซียม (Mg) ในกระแสเลือดของผู้ป่วยต่ำลง ผลการวิจัยก่อนหน้าของหัวหน้าโครงการวิจัยพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ในการลดการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในแบบจำลองเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของมนุษย์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษากลไกที่ omeprazole ยับยั้งการขนส่งแมกนีเซียมแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ โดยทำการทดลองในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ซึ่งเป็นแบบจำลองแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของมนุษย์ การศึกษาโดยใช้ MTT assay พบว่า omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ng/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อศึกษาอัตราการขนส่ง Mg และ ค่าการซึมผ่านของ Mg พบว่า omeprazole ยับยั้งการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ อย่างไรก็ตามการปิดเซลล์ด้วย calcium sensing receptor (CaSR) activator (neomycin), protein kinase A (PKA) inhibitor (H89), หรือ MEK inhibitor (U-0126) นั้นไม่มีผลต่อการขนส่ง Mg ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ omeprazole บ่งชี้ว่าการขนส่ง Mg ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ CaSR, PKA, และ MEK ในทางตรงกันข้าม protein kinase C (PKC) inhibitor GF-109203X มีผลลดการขนส่ง Mg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่าการขนส่ง Mg ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 อาศัยการทำงานของ PKC และ omeprazole น่าจะออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของ PKC การศึกษาคุณสมบัติของ tight junction พบว่า omeprazole ลดคุณสมบัติการคัดเลือกประจุบวก แต่เพิ่มคุณสมบัติการคัดเลือกประจุลบ และเพิ่มค่าความต้านทานไฟฟ้าของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 การศึกษายีนและโปรตีนของที่เป็นองค์ประกอบของ tight junction พบว่า omeprazole ลดการแสดงออกของ claudin (Cldn) -7 และ Cldn-12 mRNA และโปรตีน และเมื่อศึกษาโครงสร้างของ tight junction โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า omeprazole ลดความกว้าง แต่เพิ่มความยาวของช่องว่างระหว่างเซลล์ใน tight junction ผลการศึกษานี้แสดงกลไกระดับเซลล์ของภาวะ omeprazole ลดการดูดซึม Mg ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้

## Abstract

Prolong omeprazole administration led to hypomagnesemia. My previous study found demonstrated the inhibitory effect of omeprazole on paracellular Mg in human small intestinal epithelium modal, Caco-2 cells. The present study aim to elucidate the underlying mechanism of omeprazole suppressed paracellular Mg transport. All experiments were performed by using Caco-2 monolayers. MTT assay demonstrated that omeprazole (200, 400, 600, 800 and 1,000 ng/ml) had no effect on Caco-2 viability. Omeprazole suppressed rate of Mg transport and absolute Mg permeability ( $P_{Mg}$ ) of Caco-2 monolayers. Calcium sensing receptor (CaSR) activator (neomycin), protein kinase A (PKA) inhibitor (H89), or MEK inhibitor (U-0126) had no effect on Mg transport across control and omeprazole treated Caco-2 monolayers. On the other hand PKC inhibitor GF-109203X significantly suppressed Mg transport across Caco-2 monolayers. Indicated that intestinal Mg transport required PKC activity and omeprazole probably suppressed PKC activity. Omeprazole decreased cation selectivity, but increased anion selectivity and transepithelial electrical resistant, of Caco-2 monolayers. It also decreased tight junction associated claudin (Cldn) -7 and -12 mRNA and proteins expression. Transmission electron microscopic study revealed that omeprazole decreased width, but increased length, of paracellular channel of the tight junction. The finding of the present study revealed the cellular mechanism of omeprazole suppressed intestinal Mg absorption.

# สารบัญ

หน้า

<b>1. บทนำ</b>	
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน และการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย	4
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	6
1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
<b>2. เนื้อเรื่อง</b>	
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	6
2.2 ผลการทดลอง	10
<b>3. อภิปรายผลการทดลอง</b>	18
<b>4 สรุป และเสนอแนะ</b>	19
<b>5 ผลผลิต</b>	19
รายงานการเงิน	20
บรรณานุกรม	21
ประวัตินักวิจัย	25 - 27

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1. กลไกการดูดซึม Mg ในเซลล์เยื่อบุลำไส้	2
2. ภาพแสดงแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell® inserts	7
3. แสดงค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ng/ml เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole	10
4. แสดงอัตราการขนส่ง $Mg^{2+}$ ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในภาวะปกติ (A) และในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ร่วมกับ neomycin (B)	11
5. แสดงค่าการซึมผ่านของ $Mg^{2+}$ ( $P_{Mg}$ ) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในภาวะปกติ (A) และในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ร่วมกับ neomycin (B)	12
6. A แสดงอัตราการขนส่ง $Mg^{2+}$ , B ค่าการซึมผ่านของ $Mg^{2+}$ ( $P_{Mg}$ ) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ร่วมกับ 50 $\mu\text{mol/l}$ H89, 10 $\mu\text{mol/l}$ U-0126, หรือ 1 $\mu\text{mol/l}$ GF-109203X	13
7 แสดงค่า $P_{Na}/P_{Cl}$ (A), $P_{Na}$ (B), และ $P_{Cl}$ (C) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติและแผ่นเซลล์ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, และ 1,000 ng/ml	14
8 แสดงค่า TEER ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติและแผ่นเซลล์ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, และ 1,000 ng/ml	14
9 แสดงการแสดง relative fold of Cldn-2 (A), -7 (B), -12 mRNA (C) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเทคนิค Rt-PCR.	15
10 แสดงการแสดงออกของ Cldn-2, -7, -12 โดยเทคนิค western blot (A) และร้อยละการแสดงออกของ Cldn-2 (B), Cldn -7 (C), และ Cldn -12 (D) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม	16
11 แสดงผลการศึกษาโครงสร้างของ TJ ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ (A, B) และแผ่นเซลล์ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 600 ng/ml (C) โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	17

## คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

คำแปล/ความหมาย

CaSR	calcium sensing receptor
Cl <sup>-</sup>	Chloride ion
Cldn	claudin
Cs <sup>+</sup>	Cesium ion
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
$\Delta$ MgCl <sub>2</sub>	ความแตกต่างของปริมาณ MgCl <sub>2</sub> ในด้าน apical และ basolateral
K <sup>+</sup>	Potassium ion
Li <sup>+</sup>	Lithium ion
Mg	แมกนีเซียม
Na <sup>+</sup>	Sodium ion
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase A
$P_{Mg}$	absolute permeability ของ Mg
qRT-PCR	Quantitative-real time PCR
Rb <sup>+</sup>	Rubidium ion
TEER	transepithelium electrical resistance,
TEM	Transmission electron microscopy
TJ	tight junction
TRPM	transient receptor potential melastatin

## ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง

### 1. บทนำ

#### 1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน และการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

##### 1.1.1 สมดุลของ Mg ในร่างกาย

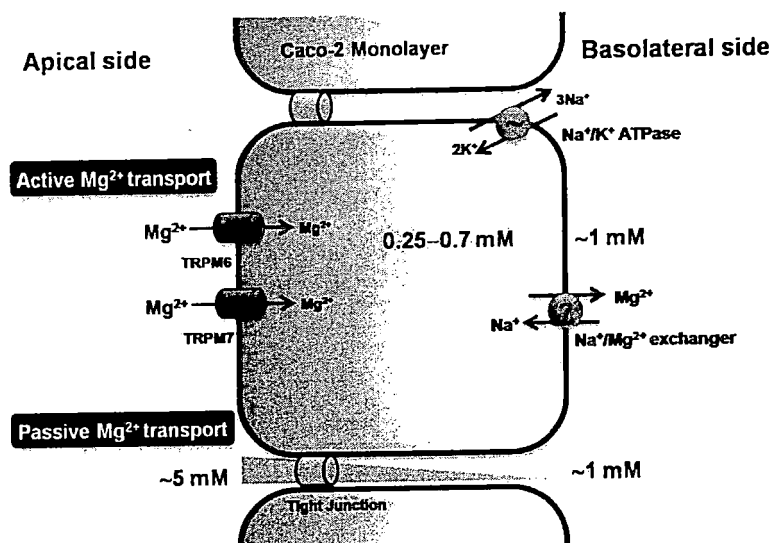
ร่างกายของมนุษย์มีแมกนีเซียม (Mg) อยู่ประมาณ 24 g [36] ส่วนใหญ่ (~53%) จะสะสมในกระดูก และอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย (~46%) ส่วนที่เหลือประมาณ 1% นั้นอยู่ในกระแสเลือด และของเหลวต่างๆ นอกเซลล์ [20, 27, 36] หากพิจารณาเฉพาะภายในเซลล์ Mg จะรวมอยู่กับ ATP ประมาณ 80–90% อีกประมาณ 6.5–9% จะรวมอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์ และส่วนที่เหลือประมาณ 1–3.5% หรือ 0.25–0.7 mmol อยู่ในรูปอิสระ [12] ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ทั่วร่างกาย เนื่องจากเป็น อีออนที่ควบคุมการทำงานของ ion channel การคงรูปของโปรตีนภายในเซลล์ กระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ และยังเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์สำคัญภายในเซลล์มากกว่า 300 ชนิด [20, 27] ดังนั้นปริมาณ Mg ในกระแสเลือดจึงจำเป็นต้องถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมคือประมาณ 0.7–1.1 mmol/l โดยอาศัยการทำงานของลำไส้และไต [17]

ในแต่ละวันเรารับประทาน Mg ประมาณ 300–360 mg ในจำนวนนี้ 30–50% จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด [27] อย่างไรก็ตามในกรณีที่รับประทาน Mg ในปริมาณน้อย ลำไส้สามารถเพิ่มการดูดซึมเป็นประมาณ 60–80% ของปริมาณทั้งหมดที่รับประทาน [10, 25] ซึ่งหากพิจารณาแต่ละส่วนของลำไส้ ในภาวะปกติลำไส้เล็กส่วน duodenum ดูดซึม Mg ประมาณ 15 mg ลำไส้เล็กส่วน jejunum ดูดซึมประมาณ 30 mg ลำไส้เล็กส่วน ileum ดูดซึมประมาณ 75 mg หรือคิดเป็น 56% ของปริมาณ Mg ทั้งหมดที่ดูดซึมโดยลำไส้ [20] ดังนั้นหากสูญเสียการดูดซึม Mg โดยลำไส้เล็กส่วนนี้ย่อมส่งผลให้ปริมาณ Mg ในร่างกายลดลง [34] ส่วนลำไส้ใหญ่จะดูดซึมประมาณ 15 mg [20] เซลล์เยื่อบุลำไส้ดูดซึม Mg ผ่านทาง 2 กลไกคือ แบบผ่านเซลล์ และแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ (รูปที่ 1)

การดูดซึม Mg แบบผ่านเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงาน (active Mg transport) โดย Mg จากโพรงลำไส้จะเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง transient receptor potential melastatin (TRPM) 6 และ TRPM7 [25, 29] จากนั้น Mg จะถูกนำออกนอกเซลล์เพื่อเข้าสู่กระแสเลือดโดย  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$  exchanger [25, 26] การดูดซึม Mg ด้วยกลไกนี้มีความสำคัญในภาวะที่รับประทาน Mg ในปริมาณน้อย [25]

การดูดซึม Mg แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้พลังงาน (passive Mg transport) โดยอาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg ซึ่งปริมาณ Mg อิสระในโพรงลำไส้มีค่ามากกว่าหรือประมาณ 5 mmol/l [25] ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของ Mg อิสระในกระแสเลือดที่มีค่าประมาณ

0.7–1.1 mmol/l [17, 25] การขนส่ง Mg ด้วยกลไกนี้ถูกควบคุมด้วยโปรตีนของ tight junction ที่มีชื่อว่า claudin (พบประมาณ 24 ชนิดในมนุษย์) ซึ่งสามารถคัดเลือกประจุและขนาดสารที่ผ่าน tight junction [11, 35] โดยเฉพาะ claudin-16 [15] กลไกการดูดซึมแบบผ่านช่องระหว่างเซลล์นี้ถือเป็นกลไกหลักของร่างกาย เนื่องจากดูดซึม ~ 90% ของปริมาณ Mg ทั้งหมดที่ดูดซึมที่ลำไส้ [25]



รูปที่ 1. กลไกการดูดซึม Mg ในเซลล์เยื่อบุลำไส้

เพื่อป้องกันการดูดซึมที่มากเกินไปจึงมีกลไกควบคุมซึ่งอาศัยการทำงานของ CaSR ในลำไส้ กล่าวคือเมื่อมีระดับ Ca และ Mg มากขึ้นจะกระตุ้นการทำงานของ CaSR ส่งผลยับยั้งการดูดซึมที่อื่น ๆ ในลำไส้ [6] กลไกระดับเซลล์นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาของ Ikari และคณะซึ่งศึกษาการขนส่ง Mg ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK-II พบว่าการกระตุ้น CaSR ส่งผลรบกวนการแสดงออกของ claudin-16 บน tight junction ทำให้ลดการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ [16] ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้น CaSR จะส่งสัญญาณคำสั่งภายในเซลล์ผ่านหลายกลไก อาทิเช่น PKA, PKC และ mitogen-activated protein kinases (MAPK) [16, 39]

### 1.1.2 Omeprazole และสมดุล Mg

omeprazole เป็นยาในกลุ่ม proton pump inhibitors (PPIs) ที่ประกอบด้วยสารเคมีประเภท pyridyl methylsulfinyl benzamidazoles เมื่อถูกกระตุ้นด้วยภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารจะเปลี่ยนเป็น sulphenamides ซึ่งจะจับกับหมู่ sulphhydryl ของกรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 813 ของ H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ด้วยพันธะโควาเลนต์ และยับยั้งการทำงานของ H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [22] ดังนั้น omeprazole จึงนิยมใช้รักษาโรคของระบบทางเดินอาหารที่จำเป็นต้องยับยั้งการหลั่งกรดจาก parietal cells ในกระเพาะอาหาร อาทิเช่น peptic ulcer, gastro-oesophageal reflux disease, erosive oesophagitis, heartburn,



และ Barret's disease [3] ถึงแม้ว่าการได้รับ omeprazole เพียงครั้งเดียวจะสามารถยับยั้งการหลั่งกรดได้นาน 2–3 วัน [3] แต่การที่ร่างกายสามารถกำจัด omeprazole ได้เร็ว (half life ~0.5–2 ชั่วโมง) จึงทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการป่วยเรื้อรัง อาทิเช่น peptic ulcer, Barret's disease, และ erosive oesophagitis ต้องได้รับ PPIs ติดต่อกันเป็นเวลานาน [3, 9]

ร่างกายมนุษย์ควบคุมระดับ Mg ในกระแสเลือดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมโดยอาศัยการทำงานของลำไส้ซึ่งมีหน้าที่ดูดซึม Mg เข้าสู่ร่างกาย และไตซึ่งมีหน้าที่ขับ Mg ส่วนเกินออกจากร่างกาย [17] ดังนั้นภาวะปริมาณ Mg ต่ำจากการใช้ยา omeprazole นั้น อาจเกิดจาก omeprazole รบกวนการทำงานของอวัยวะทั้งสองส่วนนี้ ในแต่ละวันประมาณ 80% ของ Mg ทั้งหมดในกระแสเลือดจะถูกกรองเข้าสู่ท่อไต ในจำนวนนี้ประมาณ 95% จะถูกดูดกลับเข้าสู่กระแสเลือด [17] หากไตทำงานผิดปกติยอมทำให้ร่างกายสูญเสีย Mg ไปกับปัสสาวะเป็นจำนวนมาก แต่จากการศึกษาของ Cundy และ Dissanayake [5] พบว่าการทำงานของไตในการจัดการ Mg ของผู้ป่วยที่มีภาวะ Mg ในกระแสเลือดต่ำจากการใช้ omeprazole นั้นเป็นปกติ มิได้มีการสูญเสีย Mg ไปกับปัสสาวะแต่อย่างใด บ่งชี้ว่าความผิดปกติน่าจะเกิดจากการดูดซึม Mg ของลำไส้

Epstein และคณะรายงานการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะปริมาณของ Mg ในกระแสเลือดต่ำโดยการให้ Mg ปริมาณสูงเสริมทางการรับประทานไม่สามารถรักษาระดับของ Mg ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้ในทางตรงกันข้ามการให้ Mg เสริมทางหลอดเลือดดำโดยตรง และการหยุดใช้ omeprazole กลับทำให้ระดับ Mg ในกระแสเลือดกลับสู่ระดับปกติได้ [9] แสดงว่าโอมิพราโซลมีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึม Mg ในลำไส้ และจากการศึกษาของหัวหน้าโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ [32] แสดงให้เห็นว่าเมื่อปมแบบจำลองแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของมนุษย์ด้วย omeprazole ส่งผลยับยั้งการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ลดการยอมให้ Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ นอกจากนี้ยังลดการยอมให้อيونประจุบวกอื่นได้แก่  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ , และ  $\text{Cs}^+$  ไหลผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ แต่เพิ่มการยอมให้อيونประจุลบคือ  $\text{Cl}^-$  ไหลผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้

### 1.1.3 แบบจำลองในการศึกษาการขนส่ง Mg ในลำไส้

Caco-2 epithelial cell เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ แต่แสดงคุณสมบัติสำคัญของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก ไม่ว่าจะเป็นต้นโครงสร้างที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อลำไส้เล็ก อาทิเช่น sucrase, isomaltase, lactase, alkaline phosphatase, และ aminopeptidase N [4, 23, 38] หรือด้านบทบาทหน้าที่ในการดูดซึมสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นยา สารอาหาร และอออน คล้ายคลึงกับลำไส้เล็กของมนุษย์ [2, 13, 18, 37] ดังนั้นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จึงได้รับการยอมรับ และนิยมใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการขนส่งสารต่างๆ ผ่านลำไส้มนุษย์ นอกจากนี้เซลล์

เพาะเลี้ยง Caco-2 ยังเป็นแบบจำลองที่เหมาะสมในการศึกษาการขนส่ง Mg ผ่านแผ่นเซลล์ลำไส้ [8, 32] และจากการศึกษาของ Abrahamse และคณะ แสดงให้เห็นว่า Caco-2 cell มีการแสดงออกของ  $H^+/K^+$ -ATPase ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ [1] และ  $H^+/K^+$ -ATPase ก็เป็นโปรตีนเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของ omeprazole แสดงว่าเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะตอบสนองต่อ omeprazole [32] ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงเลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เป็นแบบจำลองในการศึกษาผลและกลไกระดับเซลล์ของ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg ในเซลล์ลำไส้

## 1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

แมกนีเซียม (Mg) เป็นอิลอนที่สำคัญยิ่งต่อร่างกายมนุษย์ หากปริมาณ Mg ในร่างกายลดลงอาจก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย อาทิเช่น โรคกระดูกพรุน [28], Alzheimer's disease [7], และ ความดันโลหิตสูง [33] ดังนั้นระดับ Mg ในกระแสเลือดจึงถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมประมาณ 0.7–1.1 mmol/l [17, 20, 36] โดยอาศัยการทำงานของลำไส้ซึ่งมีหน้าที่ดูดซึม Mg เข้าสู่ร่างกาย และไตซึ่งมีหน้าที่ขับ Mg ส่วนเกินออกจากร่างกาย [17] โดยปกติประมาณ 90% ของปริมาณ Mg ทั้งหมดที่ดูดซึมโดยลำไส้ จะดูดซึมผ่านทางช่องระหว่างเซลล์ของเยื่อบุลำไส้ [25] จึงถือเป็นกลไกหลักในการดูดซึม Mg เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ โดยกลไกนี้เป็นกลไกที่ไม่ใช้พลังงานแต่อาศัยความลาดเอียงทางความเข้มข้นของ Mg [17, 25, 29] และถูกควบคุมโดยโปรตีนใน tight junction ได้แก่ claudin ซึ่งมีประมาณ 24 ชนิดกระจายอยู่ในเซลล์เยื่อบุทั่วร่างกาย โดย claudin มีคุณสมบัติในการคัดเลือกชนิดประจุ และคัดเลือกขนาดของสารที่เคลื่อนที่ผ่าน tight junction [11, 35] จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า claudin-16 นั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ [15] อย่างไรก็ตามในเซลล์เยื่อบุลำไส้กลับไม่พบการแสดงออกของ claudin-16 [40] จึงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า claudin ชนิดใดที่ทำหน้าที่ควบคุมการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้

omeprazole เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ  $H^+/K^+$ -ATPase และนิยมใช้รักษาโรคที่จำเป็นต้องยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร [3] มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ได้รับ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานานส่งผลให้ระดับ Mg และ แคลเซียม (Ca) ในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ [5, 9] เป็นที่น่าสนใจว่าการรักษาโดยให้ Ca เสริมนั้นสามารถทำให้ระดับ Ca ในกระแสเลือดกลับเป็นปกติได้ แต่การให้ Mg เสริมในปริมาณที่สูงกลับไม่สามารถเพิ่มระดับ Mg ในกระแสเลือดให้กลับเป็นปกติได้ [9] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า omeprazole มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึม Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ โดยเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการยอมให้สารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในแบบจำลองแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กมนุษย์ [32] โดย omeprazole ยับยั้งการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ลดการยอมให้  $Mg^{2+}$  ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ลดการยอมให้อิลอนประจุบวก ( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ , และ  $Cs^+$ ) โดยเฉพาะ  $Na^+$  ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ แต่เพิ่มการยอมให้อิลอนประจุลบคือ  $Cl^-$  ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ เป็นไปได้ว่า

omeprazole จะมีฤทธิ์รบกวนการทำงานของ Claudin ที่ขนส่ง  $\text{Na}^+$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  Fujita และคณะ (2008) รายงานว่า claudin -2 และ -12 มีความสำคัญต่อขนส่งไอออนประจุ 2 บวก (Ca) ในลำไส้ [41] Alexandre และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่า claudin -7 ทำงานโดยเพิ่มการขนส่ง  $\text{Na}^+$  แต่ลดการขนส่ง  $\text{Cl}^-$  ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ [42] ยิ่งไปกว่านั้น claudin-2, -7, และ -12 มีปริมาณค่อนข้างมากในลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ileum [41, 42] ซึ่งเป็นบริเวณหลักที่มีการดูดซึม Mg เข้าสู่ร่างกาย [20] บ่งชี้ว่า omeprazole อาจรบกวนการทำงานของ claudin-2, -7, และ -12 ในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก

นอกจากจะมีฤทธิ์ลดระดับ Mg และ Ca ในกระแสเลือด omeprazole ยังมีฤทธิ์ลดระดับ parathyroid hormone [PTH] ในผู้ป่วยที่ใช้ omeprazole ติดต่อกันเป็นเวลานาน [9] เนื่องจากการหลั่ง PTH จากต่อมพาราไทรอยด์นั้นควบคุมโดย polyvalent-cation sensing receptor (CaSR) หากกระตุ้น CaSR จะส่งผลยับยั้งการหลั่ง PTH เป็นไปได้ว่า omeprazole อาจมีฤทธิ์กระตุ้นหรือส่งเสริมการทำงานของ CaSR จึงลดระดับ PTH ในกระแสเลือด ซึ่งนอกจากต่อมพาราไทรอยด์แล้ว CaSR ยังแสดงออกในลำไส้เช่นกัน [6] โดยมีหน้าที่ควบคุมการดูดซึมไอออนของเซลล์เยื่อบุลำไส้เพื่อป้องกันการดูดซึมไอออนที่มากเกินไป [6] จากการศึกษาของ Ikari และคณะแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น CaSR ส่งผลรบกวนการแสดงออกของ claudin บน tight junction และลดการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ [16] เป็นไปได้ว่า omeprazole จะมีฤทธิ์กระตุ้นหรือส่งเสริมการทำงานของ CaSR จึงทำให้ลดการดูดซึม Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ อย่างไรก็ตามก็ตีบทบาทของ CaSR และ claudin ใน tight junction ในภาวะ omeprazole ยับยั้งการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ในลำไส้ นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

Caco-2 epithelial cell เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ แต่แสดงคุณลักษณะสำคัญของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กไม่ว่าจะเป็นด้านโครงสร้าง [4, 23, 38] หรือการทำงานซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำไส้เล็กของมนุษย์ [2, 13, 18, 37] และจากการศึกษาของ Abrahamase และคณะ พบว่า Caco-2 cell มีการแสดงออกของ  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase [1] ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของ omeprazole [3] และการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า Caco-2 cell ตอบสนองต่อการให้ omeprazole ได้ [32] นอกจากนั้น เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ยังมีการแสดงออกของ CaSR [6] ดังนั้นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จึงเป็นแบบจำลองที่เหมาะสมในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ยับยั้งการขนส่ง Mg ในเซลล์ลำไส้

### 1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลของ omeprazole ต่อการทำงานของ CaSR ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

1.3.2 ศึกษาผลของ omeprazole ต่อการแสดงออกของ claudin ใน tight junction ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

1.3.3 ศึกษาผลของ omeprazole ต่อกลไกควบคุมการทำงานและควบคุมแสดงออกของ claudin ใน tight junction ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

#### 1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยทั้งหมดในโครงการนี้ครอบคลุมการศึกษาผล และกลไกการการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ของ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

#### 1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐาน: omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการทำงานและการแสดงออกของ claudin ชนิดที่ใช้ขนส่ง Mg โดยกระตุ้นหรือเพิ่มความไวต่อการกระตุ้นของ CaSR จึงส่งผลกระทบต่อการทำงานและการแสดงออกของ claudin ใน tight junction และลดการขนส่ง Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย: สืบเนื่องจากรายงานทางการแพทย์ถึงผลข้างเคียงของการใช้ยา omeprazole ส่งผลให้เกิดภาวะปริมาณ Mg ในกระแสเลือดต่ำอย่างรุนแรงจนนำพามาซึ่งปัญหาทางสุขภาพอื่นๆ และผลการวิจัยที่ผ่านมาบ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึม Mg ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้จากการได้รับ omeprazole ทั้งนี้เพื่อหาแนวทางป้องกันผลข้างเคียงของการใช้ยา omeprazole

#### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้จะทำให้เข้าใจผล และกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของภาวะ omeprazole ยับยั้งการดูดซึม Mg ในแบบจำลองแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กมนุษย์ เพื่อหาแนวทางป้องกันผลข้างเคียงของการใช้ยา omeprazole นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้จะทำให้เข้าใจกลไกควบคุมการดูดซึม Mg ในลำไส้เล็ก ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยที่มีความต้องการ Mg ในปริมาณสูงต่อไป

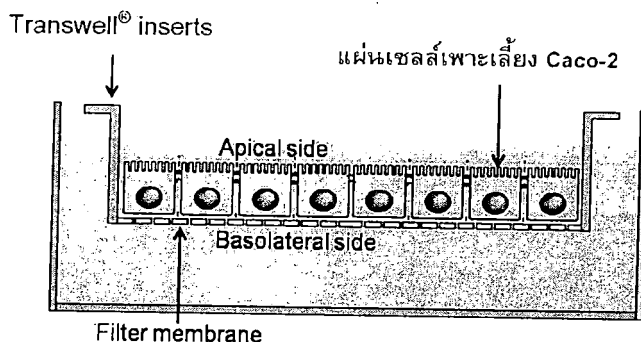
## 2. เนื้อเรื่อง

### 2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 2.1.1 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ทำการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 (ATCC<sup>®</sup> Number: HTB-37) ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) ที่ประกอบด้วย heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 12%, nonessential amino acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1% และ penicillin-streptomycin (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 1% โดยเลี้ยงใน T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 75 cm<sup>2</sup> ในตู้ปลอดเชื้อที่ 37 °C และความเข้มข้น CO<sub>2</sub> ที่ 5% [31, 32]

ในการเตรียมแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เพื่อนำไปศึกษาวิจัยนั้น เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 จะถูกเลี้ยงบน polyester Transwell (polyester Transwell® inserts, Corning, Corning, NY, USA) ที่ความหนาแน่น  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> เป็นเวลา 21 วัน ในตู้ปลอดเชื้อที่ 37 °C และความเข้มข้น CO<sub>2</sub> ที่ 5% ซึ่งจะทำให้เซลล์มีการสร้าง tight junction และกลายเป็นแผ่น epithelium (รูปที่ 2)



รูปที่ 2. ภาพแสดงแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell® inserts

### 2.1.2 การให้ omeprazole แก่เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell เช่นเดียวกับวิธีการเลี้ยงที่กล่าวถึงก่อนหน้านี้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงเลี้ยงต่อด้วย DMEM ที่มี omeprazole (Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 600 ng/mL ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของ omeprazole ในกระแสเลือดของมนุษย์หลังจากรับประทาน omeprazole [19] และยังเป็นระดับความเข้มข้นของ omeprazole ที่สามารถยับยั้งการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 [32] เป็นเวลา 14 วัน ก่อนที่จะนำแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ไปศึกษาต่อไป

### 2.1.3 การศึกษาการขนส่ง Mg ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ทำการทดลองใน Transwell โดยดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Tang และ Goodenough [30] โดยนำ culture media ออก ก่อนล้างแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 และ transwell ด้วย sterilized PBS ก่อนเติมด้าน basolateral ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย sterilized-Mg free bathing solution (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25mM, NaHCO<sub>3</sub> 23 mM, D-glucose 12 mM, L-glutamine 2.5 mM และ mannitol 2 mM และมีค่า osmolarity เท่ากับ 290-295 mmol kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O) และเติมด้าน apical ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย sterilized-40 mM Mg bathing solution (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25mM, NaHCO<sub>3</sub> 23 mM, D-glucose 12 mM และ L-glutamine 2.5 mM และมีค่า osmolarity เท่ากับ 290-295 mmol kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O) ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความลาดเอียงทางความเข้มข้นและเหนี่ยวนำให้เกิดการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ในตู้ปลอดเชื้อที่ 37 °C และความเข้มข้น

CO<sub>2</sub> ที่ 5% จากนั้นจึงเก็บตัวอย่าง 50  $\mu$ L จาก bathing solution ด้าน basolateral ทุกๆ 30 นาทีเป็นเวลา 90 นาที ก่อนผสมตัวอย่างกับ Xylidyl-Blue reagent ซึ่งประกอบด้วย Tris Buffer 250 mM, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 70 mM, EGTA 40 mM, และ Xylidyl-Blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 mM ปริมาตร 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) [32] ความเข้มข้นของ Mg จะถูกคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับเส้นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานซึ่งเกิดจากการนำ 50  $\mu$ L ของ MgCl<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 2, 8, 20, 40 หรือ 80 mM ผสมกับ Xylidyl-Blue reagent 1 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น จากนั้นจึงหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Mg โดยเส้นกราฟต้องมีค่า  $r^2 \geq 0.99$

#### 2.1.4 การศึกษาค่า absolute permeability ของ Mg ( $P_{Mg}$ )

ทำการศึกษาร่วมกับการศึกษาการขนส่ง Mg ซึ่งค่า  $P_{Mg}$  สามารถคำนวณได้โดยการนำค่าอัตราการขนส่ง Mg หาค่าความต่างความเข้มข้นของ Mg ใน bathing solution ด้าน apical และ basolateral [32]

#### 2.2.5 Quantitative-real time PCR (qRT-PCR)

นำเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 มาสกัด RNA โดยใช้ RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) แล้ววัดความเข้มข้นของ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการคำนวณเพื่อปรับปริมาณของ RNA ให้เท่ากันทุกกลุ่ม แล้วเปลี่ยนกลับไปเป็น cDNA ด้วยเครื่อง thermocycle โดยใช้ high capacity cDNA reverse transcription kit (Apply Biosystems, CA, USA) จากนั้นเพิ่มจำนวนยีนและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน claudin-2, claudin-7, และ claudin-12 ยีน housekeeping (GAPDH) ด้วยเครื่อง real-time PCR (Applied biosystems) โดยใช้ TaqMan® gene expression assay kit ซึ่งประกอบด้วย customized primer design และ DNA-probe ที่ถูกติดฉลากด้วย FAMTM dye (Apply Biosystems) และคำนวณปริมาณการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี threshold cycle (Ct method) โดยใช้ SDS software v. 1. 4 (Apply Biosystems)

#### 2.2.6 Western blot analysis

สกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้ RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, triton X-100 1%, sodium deoxycholate 0.1%, EDTA 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, NaF 50 mM) จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane และนำ membrane ไปปมใน primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน claudin-2, claudin-7, และ claudin-12 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) หรือ actin เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำ membrane มาบ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ chemiluminescent detection kit (Pierce) แล้ววัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image

### 2.1.7 Transmission electron microscopy (TEM)

นำแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ซึ่งเลี้ยงบน polyester filter มาบ่มด้วย 2.5% glutaraldehyde ที่ละลายใน 0.1 mmol/l PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 mmol/l PBS 3 ครั้ง จากนั้นจึง บ่มด้วย 1% OsO<sub>4</sub> ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 mmol/l PBS 6 ครั้ง นำตัวอย่างมา dehydrate ด้วย 50%, 70%, 80%, 95% ethyl alcohol ขึ้นตอนละ 1 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และ 100% ethyl alcohol 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ใน propylene oxide (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และ PO ที่ผสมด้วย araldite 502 ในอัตราส่วน 2:1 นาน 1 ชั่วโมง และในอัตราส่วน 1:2 นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปฝังใน araldite 502 บริสุทธิ์นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไป polymerize ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 °C ขึ้นตอนละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้มาตัด ultrathin section วางบน copper grid แล้วย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate ขึ้นตอนละ 30 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปศึกษาภายในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

### 2.1.8 การบ่มเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยสารต่าง ๆ

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 บน Transwell ดังที่กล่าวถึงในข้อ 2.1.1 เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นในวันทำการทดลอง ทำการบ่มแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย 100 และ 300  $\mu\text{mol/l}$  neomycin ซึ่งเป็น CaSR activator หรือ 50  $\mu\text{mol/l}$  H89 (PKA inhibitor; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 10  $\mu\text{mol/l}$  U-0126 (MEK inhibitor; A.G. Scientific, San Diego, CA), หรือ 1  $\mu\text{mol/l}$  GF-109203X (PKC inhibitor; A. G. Scientific, San Diego, CA, USA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษาการขนส่ง Mg ดังที่กล่าวถึงในข้อ 2.1.3 และศึกษาการแสดงออกของ claudin ใน tight junction ดังที่ได้กล่าวถึงในข้อ 2.1.5, 2.1.6 และ 2.1.7

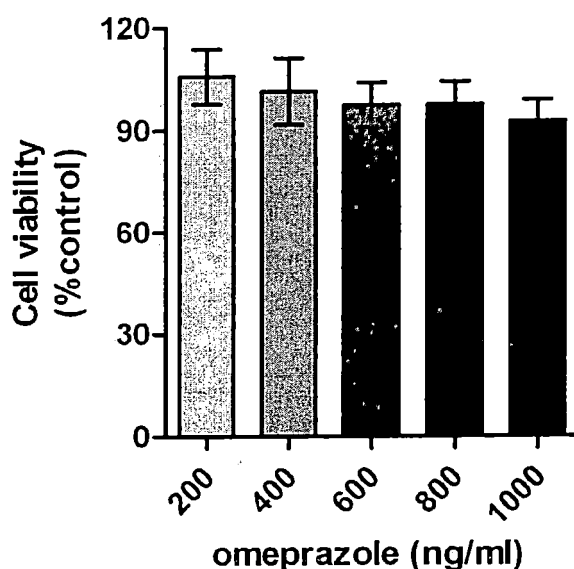
### 2.1.9 การประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means  $\pm$  SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะทดสอบโดย One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า  $P \leq 0.05$  ประเมินผลข้อมูลโดย GraphPad Prism 4.0 for Mac Os (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA)

## 2.2 ผลการทดลอง

### 2.2.1 ผลของ omeprazole ต่อการขนส่ง Mg และกลไกการกระตุ้น CaSR ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

จากการทดสอบความเป็นพิษของ omeprazole ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยวิธี MTT assay พบว่า omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ng/ml ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 (รูปที่ 3) แสดงว่า omeprazole ทุกความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์



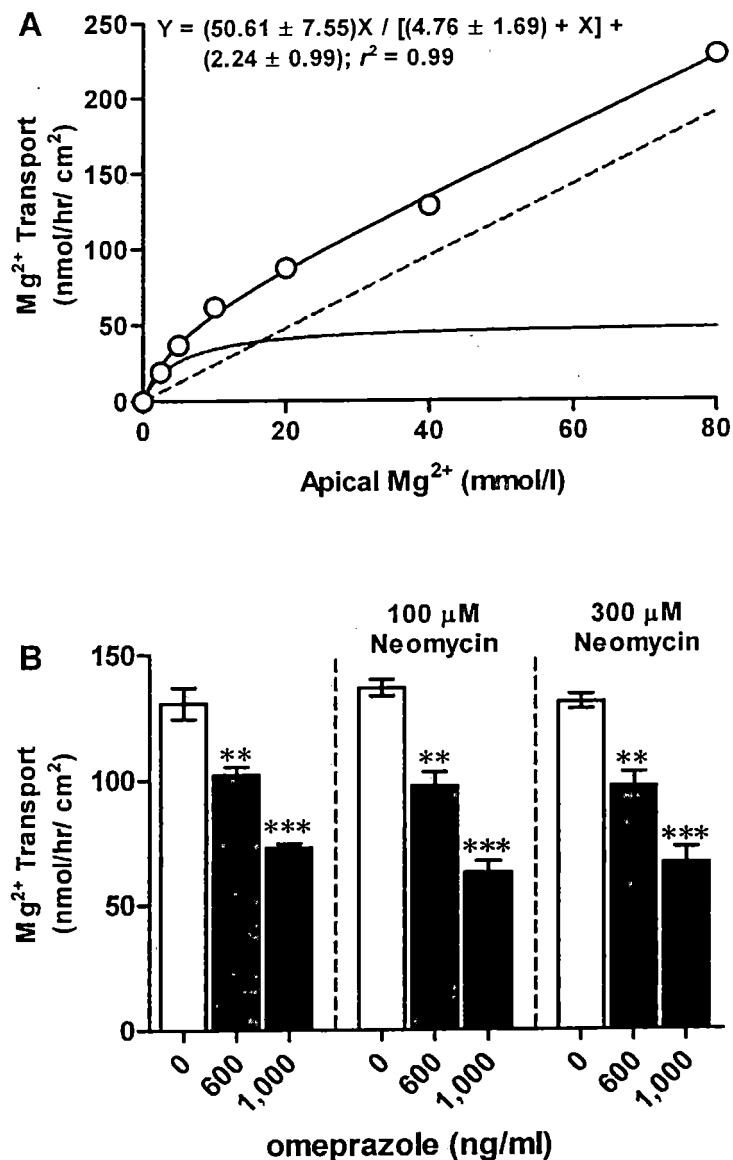
รูปที่ 3 แสดงค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ Caco-2 ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ng/ml เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole (n = 6)

เมื่อศึกษาการขนส่ง  $Mg^{2+}$  โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  ใน physiological bathing solution ด้าน apical ซึ่งแทนผนังลำไส้ด้านโพรงลำไส้ จาก 0 เป็น 2.5, 5, 10, 20, 40, และ 80 mmol/l แต่ไม่มี  $MgCl_2$  ใน physiological bathing solution ด้าน basolateral ซึ่งแทนผนังลำไส้ด้านติดกับหลอดเลือด ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความแตกต่างทางความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  และศึกษาอัตราการขนส่ง  $Mg^{2+}$  พบว่าแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 นั้นมีรูปแบบการดูดซึม  $Mg^{2+}$  เช่นเดียวกับที่พบในลำไส้ของมนุษย์ (รูปที่ 4A) คือ ประกอบด้วยการขนส่งแบบใช้พลังงานซึ่งเป็นกลไกแบบผ่านเซลล์ (ดังแสดงด้วยเส้นสีเทาที่บในรูปที่ 4A) และแบบไม่ใช้พลังงานซึ่งขนส่งผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ (ดังแสดงด้วยเส้นประสีเทาในรูปที่ 4A) เป็นการยืนยันว่าเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 นั้นเป็นแบบจำลองที่เหมาะสมต่อการศึกษากลไกการขนส่ง  $Mg^{2+}$  ในลำไส้มนุษย์

จากนั้นจึงศึกษาผลของการกระตุ้นการทำงานของ calcium sensing receptor (CaSR) โดยใช้สารกระตุ้น CaSR คือ neomycin ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 300  $\mu\text{mol/l}$  บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24



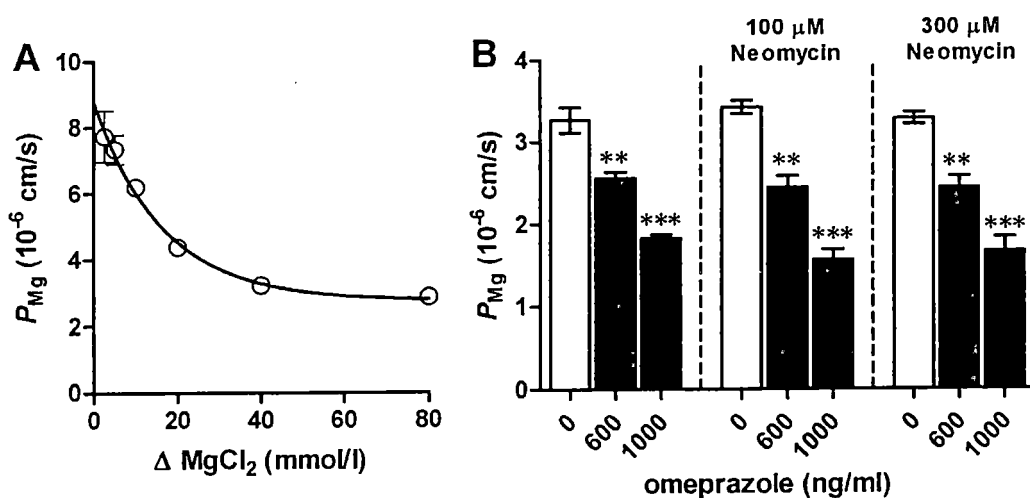
ชั่วโมงก่อนการทดลองทั้งในกลุ่มที่ได้รับ และไม่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 600 และ 1,000 ng/ml โดยในการศึกษานี้ให้ความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  ใน physiological bathing solution ด้าน apical เป็น 40 mmol/l เพื่อให้เกิดการขนส่ง  $Mg^{2+}$  แบบไม่ใช้พลังงานผ่านช่องระหว่างเซลล์ของ tight junction พบว่า omeprazole ทั้งระดับความเข้มข้น 600 และ 1,000 ng/ml มีฤทธิ์กีดการขนส่ง  $Mg^{2+}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4B) อย่างไรก็ตาม 100 และ 300  $\mu$ mol/l neomycin ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการขนส่ง  $Mg^{2+}$  ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ทั้งในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole (รูปที่ 4B) จึงสรุปได้ว่าการทำงานของ CaSR ไม่มีผลต่อการขนส่ง  $Mg^{2+}$  ในแบบจำลองเซลล์เยื่อบุลำไส้มนุษย์



รูปที่ 4 แสดงอัตราการขนส่ง  $Mg^{2+}$  ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในภาวะปกติ (A) และในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ร่วมกับ neomycin (B),  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole

ผู้วิจัยจึงศึกษาค่าการซึมผ่านของ  $Mg^{2+}$  ( $P_{Mg}$ ) เพื่อศึกษาความสามารถในการขนส่งสารแบบไม่ใช้พลังงาน จากภาพที่ 5A จะพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความแตกต่างของปริมาณ  $MgCl_2$  ในด้าน apical และ basolateral ( $\Delta MgCl_2$ ) ค่า  $P_{Mg}$  จะมีค่าลดลงซึ่งเป็นคุณสมบัติของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ และค่า  $P_{Mg}$  เริ่มคงที่เมื่อค่า  $\Delta MgCl_2 = 40$  mmol/l ผู้วิจัยจึงเลือกระดับ  $\Delta MgCl_2$  นี้เพื่อการศึกษาต่อไป

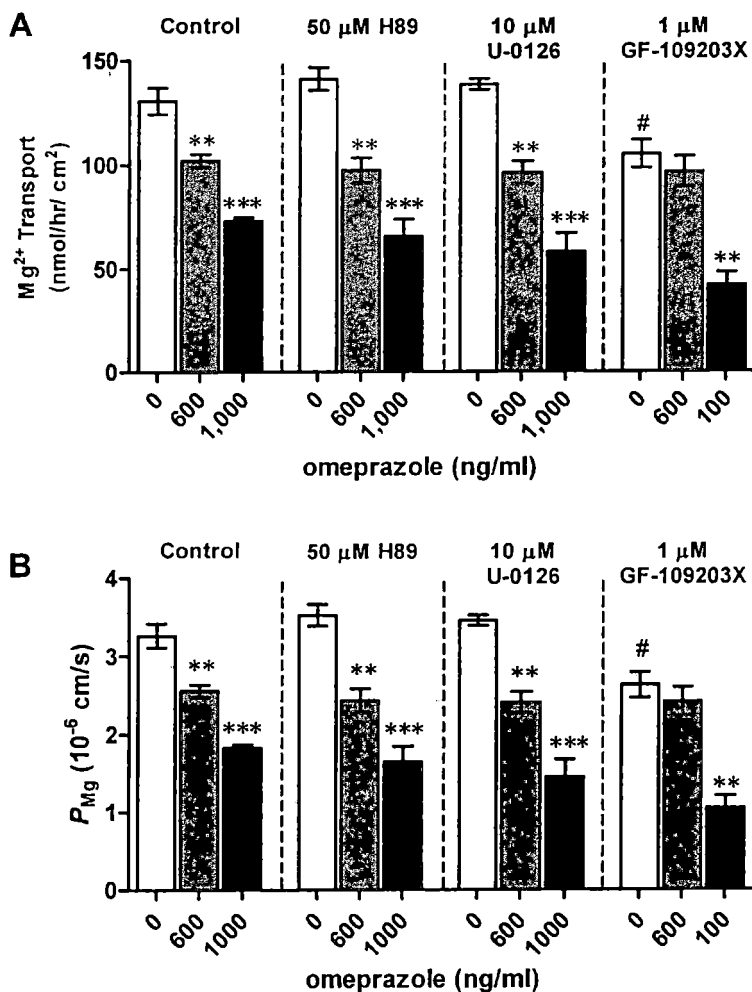
จากนั้นจึงศึกษาค่า  $P_{Mg}$  ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในภาวะที่ได้รับ omeprazole และ neomycin (รูปที่ 5B) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดค่า  $P_{Mg}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อบ่มเซลล์ด้วย neomycin ร่วมกับ omeprazole พบว่า 100 และ 300  $\mu$ mol/l neomycin ไม่มีผลต่อค่า  $P_{Mg}$  ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ omeprazole สอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 2 เป็นการยืนยันผลการทดลองข้างต้นว่าการขนส่ง  $Mg^{2+}$  ผ่านแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ CaSR



รูปที่ 5 แสดงค่าการซึมผ่านของ  $Mg^{2+}$  ( $P_{Mg}$ ) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในภาวะปกติ (A) และในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ร่วมกับ neomycin (B), \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole

เมื่อศึกษาผลของ omeprazole ต่อกลไกการส่งสัญญาณคำสั่งภายในเซลล์โดยบ่มแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่ได้รับ หรือ ไม่ได้รับ omeprazole ด้วย 50  $\mu$ mol/l H89 (PKA inhibitor), 10  $\mu$ mol/l U-0126 (MEK inhibitor), หรือ 1  $\mu$ mol/l GF-109203X (PKC inhibitor) (รูปที่ 6) พบว่า H89 และ U-0126 ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการขนส่ง Mg (รูปที่ 6A) และค่าการซึมผ่านของ  $Mg^{2+}$  ( $P_{Mg}$ ) (รูปที่ 6B) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 600 และ 1000 ng/ml แต่เมื่อบ่มแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วย PKC inhibitor GF-109203X มีผลลดอัตราการขนส่ง Mg (รูปที่ 6A) และ

$P_{Mg}$  (รูปที่ 6B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และลดลงเท่ากับค่าอัตราการขนส่ง  $Mg$  และ  $P_M$  ของกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 600 ng/ml อย่างไรก็ตาม GF-109203X ไม่มีผลต่อค่าอัตราการขนส่ง  $Mg$  และ  $P_{Mg}$  ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 600 และ 1000 ng/ml

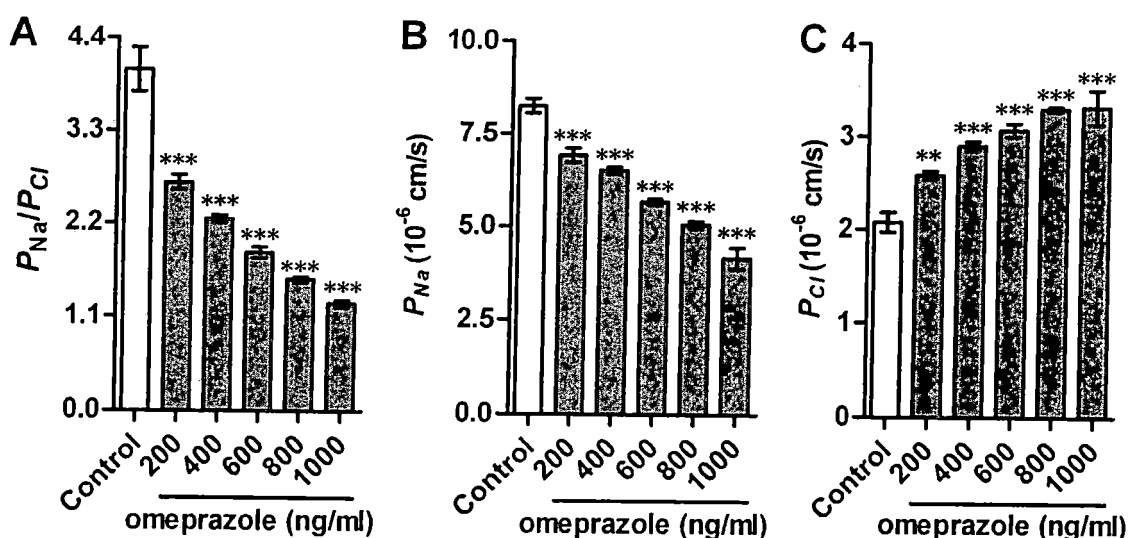


รูปที่ 6A แสดงอัตราการขนส่ง  $Mg^{2+}$ , B ค่าการซึมผ่านของ  $Mg^{2+}$  ( $P_{Mg}$ ) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ในภาวะปกติ และในกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ร่วมกับ 50  $\mu$ mol/l H89, 10  $\mu$ mol/l U-0126, หรือ 1  $\mu$ mol/l GF-109203X, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole, #  $P$  < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole ของ control condition

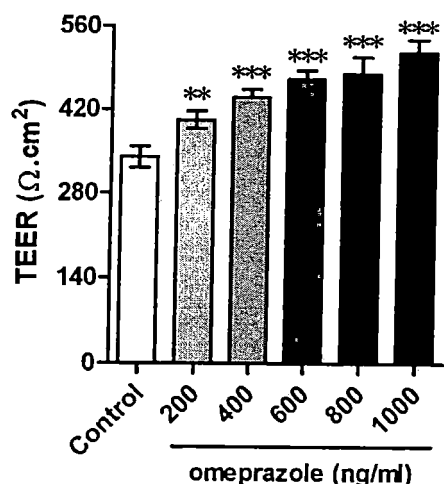
## 2.2.2 ผลของ omeprazole ต่อการทำงานของ tight junction ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

เมื่อศึกษาคุณสมบัติของ tight junction โดยใช้เทคนิค dilution potential เพื่อศึกษาคุณสมบัติการคัดเลือกประจุ และศึกษาค่าความต้านทานไฟฟ้า (transepithelium electrical resistance, TEER) พบว่า omeprazole มีผลลดสัดส่วนค่าการซึมผ่านของ  $Na^+$  ต่อ  $Cl^-$  ( $P_{Na}/P_{Cl}$ ) (รูปที่ 7A) และลดค่าการซึมผ่านของ

$\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Na}}$ ) (รูปที่ 7B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่งประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างของ tight junction ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ และเมื่อศึกษาค่าการซึมผ่านของ  $\text{Cl}^-$  ( $P_{\text{Cl}}$ ) (รูปที่ 7C) พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เพิ่ม  $P_{\text{Cl}}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดความสามารถในการขนส่งไอออนประจุบวก และเพิ่มความสามารถในการขนส่งไอออนประจุลบผ่าน tight junction ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดคุณสมบัติการคัดเลือกประจุบวก (cation selectivity) จึงส่งผลกระทบต่อ การขนส่ง  $\text{Mg}^{2+}$  ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ tight junction ในแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้



รูปที่ 7 แสดงค่า  $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$  (A),  $P_{\text{Na}}$  (B), และ  $P_{\text{Cl}}$  (C) ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติและแผ่นเซลล์ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, และ 1,000 ng/ml, \*\*\*  $P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole

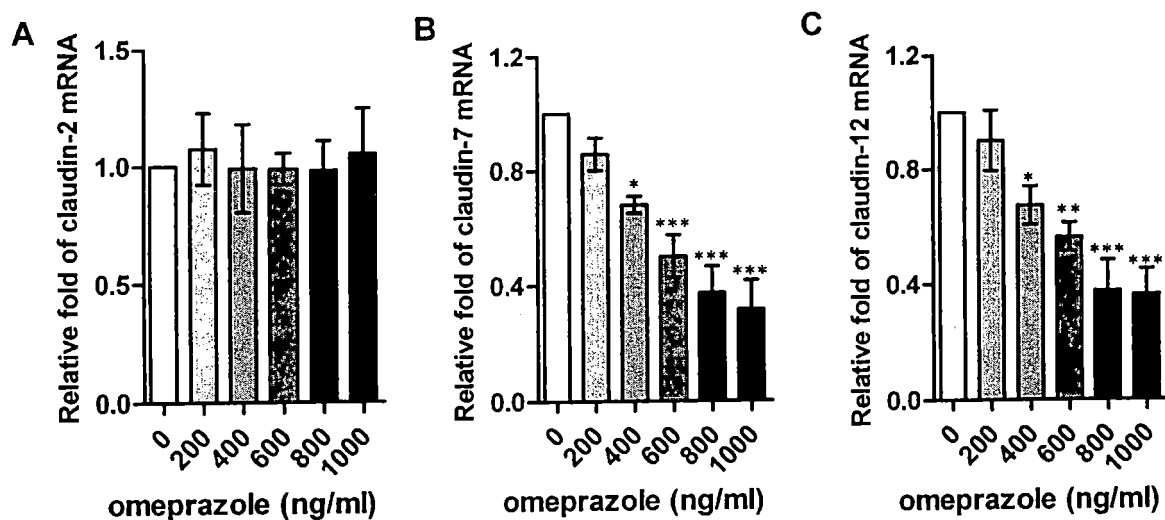


รูปที่ 8 แสดงค่า TEER ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติและแผ่นเซลล์ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, และ 1,000 ng/ml, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole

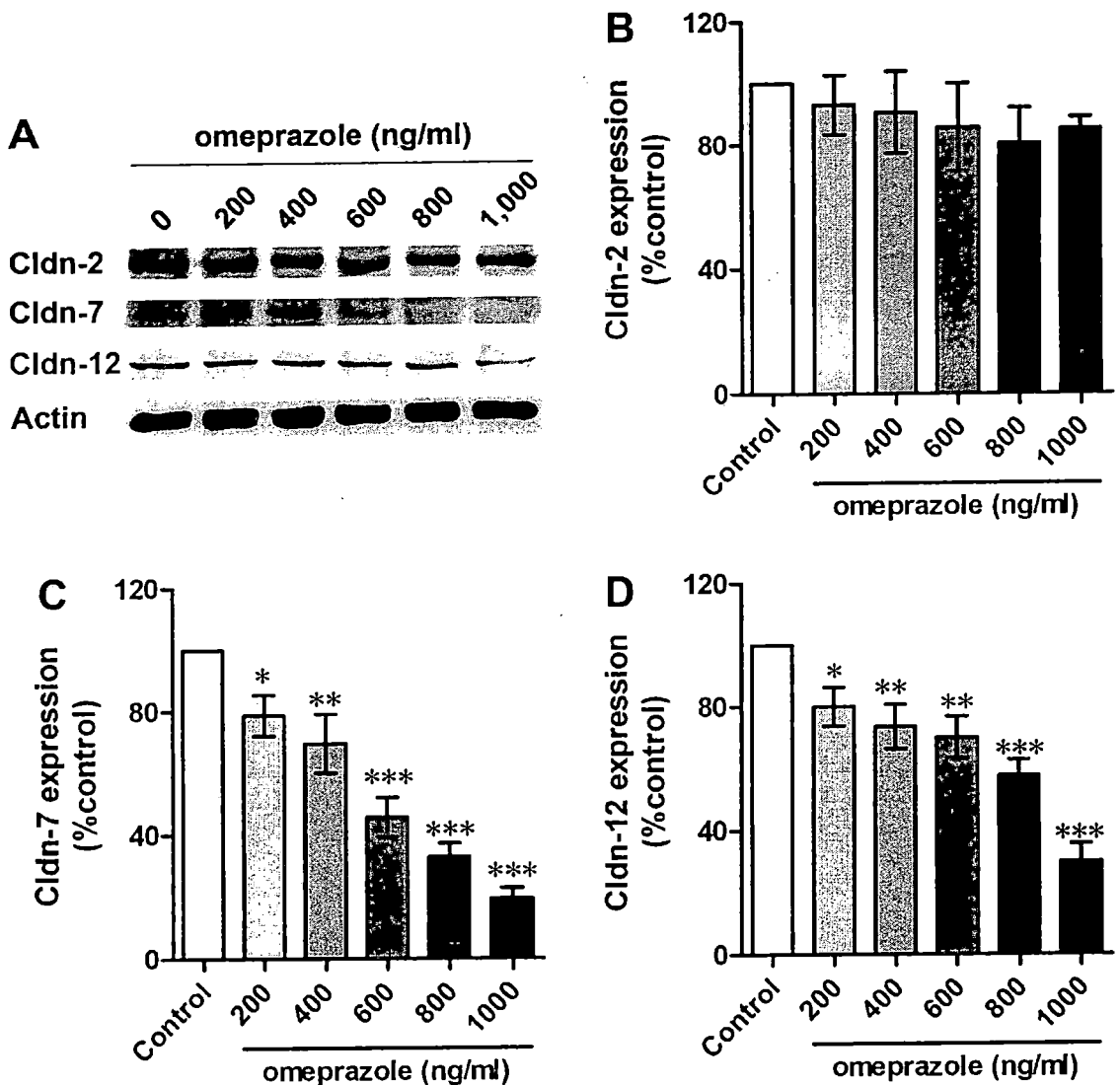
และจากผลการศึกษาค่า TEER (รูปที่ 8) พบว่า omeprazole เพิ่มค่า TEER อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการขนส่งสารผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ tight junction ในแบบจำลองเยื่อบุลำไส้

### 2.2.3 omeprazole ลดการแสดงออกของ claudin-7 และ -12 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

จากผลการทดลองข้างต้นบ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์รบกวนการทำงานของ tight junction จึงส่งผลลดการขนส่ง  $Mg^{2+}$  แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ claudin-2 (Cldn-2), -7, และ -12 ทั้งในระดับ mRNA (รูปที่ 9) และระดับโปรตีน (รูปที่ 10) ผลการศึกษาด้วยเทคนิค real-time PCR เบื้องต้นพบว่า omeprazole ลดการแสดงออกของ Cldn-7 (รูปที่ 9B) และ Cldn-12 mRNA (รูปที่ 9C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อศึกษาการแสดงออกระดับโปรตีน พบว่า omeprazole ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ Cldn-2 (รูปที่ 10A, B) แต่มีผลลดการแสดงออกของ Cldn-7 (รูปที่ 10A, C) และ Cldn-12 (รูปที่ 10A, D) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

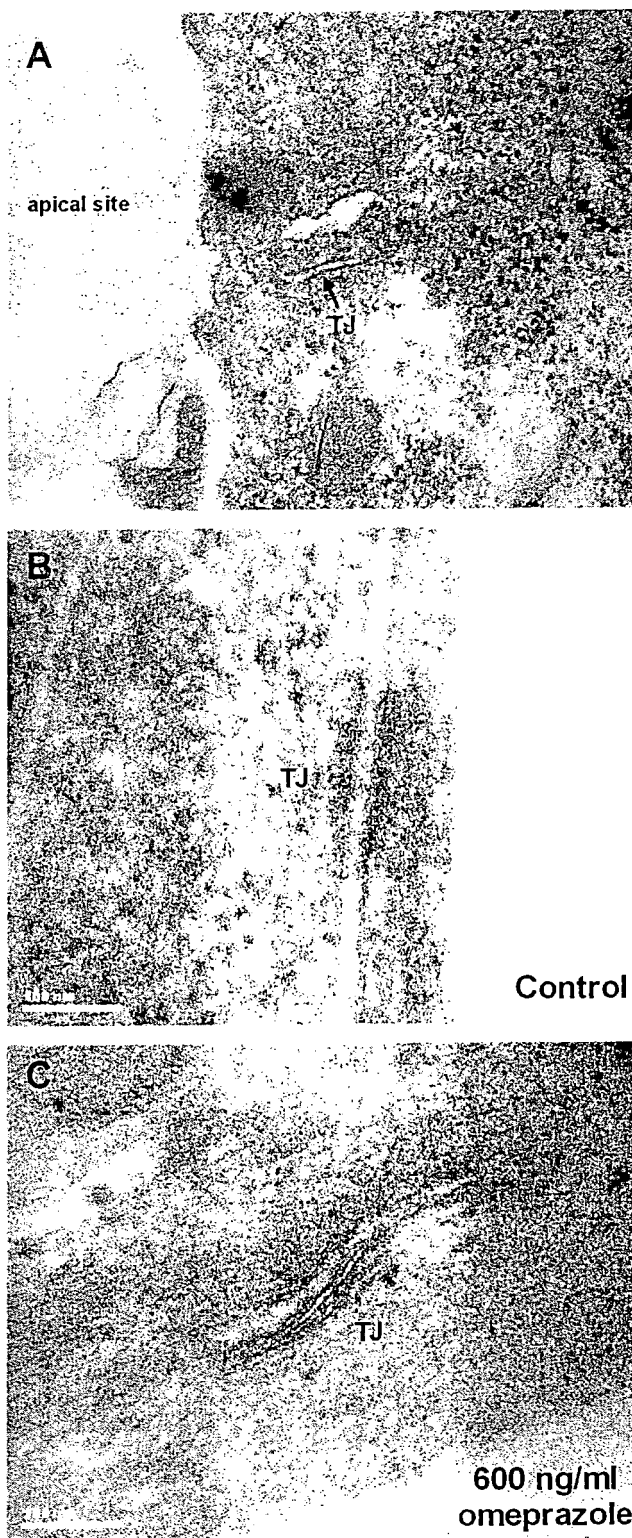


รูปที่ 9 แสดงการแสดง relative fold of Cldn-2 (A), -7 (B), -12 mRNA (C) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเทคนิค Rt-PCR. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole



รูปที่ 10 แสดงการแสดงออกของ Cldn-2, -7, -12 โดยเทคนิค western blot (A) และร้อยละการแสดงออกของ Cldn-2 (B), Cldn-7 (C), และ Cldn-12 (D) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ omeprazole

เมื่อศึกษาแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเพื่อศึกษา tight junction (TJ) โดย TJ จะวางตัวในแนวขนานกับเซลล์อยู่ถัดจากผนังเซลล์เยื่อบุด้านติดโพรงลำไส้ (apical site) การระบุตำแหน่งของ TJ แสดงในรูปที่ 11A เมื่อศึกษา TJ ในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 11B) และกลุ่มที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 600 ng/ml (รูปที่ 11C) พบว่า omeprazole มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ TJ โดยทำให้ความกว้างของ TJ ลดลง แต่เพิ่มความยาวของ TJ ซึ่งน่าจะเป็นกลไกที่ทำให้การขนส่ง Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ TJ ลดลง



รูปที่ 11 แสดงผลการศึกษาโครงสร้างของ TJ ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ปกติ (A, B) และแผ่นเซลล์ที่ได้รับ omeprazole ความเข้มข้น 600 ng/ml (C) โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

### 3. อภิปราย

ผลการศึกษาวิจัยในโครงการวิจัยนี้แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ซึ่งยับยั้งการขนส่ง Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแบบจำลองแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของมนุษย์ โดย omeprazole มีฤทธิ์ลดการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 (รูปที่ 9, 10) เนื่องจาก Cldn-7 และ -12 เป็นโปรตีนใน tight junction ที่มีคุณสมบัติในการคัดเลือกอิออนประจุบวก และส่งเสริมการขนส่งอิออนประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ tight junction [41, 42] เมื่อ Cldn-7 และ -12 ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ลดลงจึงส่งผลให้ลดความสามารถในการขนส่งอิออนประจุบวกคือ  $\text{Na}^+$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ลดลง

ลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ileum เป็นบริเวณหลักที่ทำหน้าที่ดูดซึม Mg เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ [20] ลำไส้เล็กทั้งสองส่วนนี้จะดูดซึมอิออนแบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เป็นส่วนใหญ่เนื่องจากอาหารจะอยู่ในลำไส้ส่วนนี้เป็นเวลานาน และการดูดซึม Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ถือเป็นกลไกหลักของร่างกาย เนื่องจากดูดซึม ~ 90% ของปริมาณ Mg ทั้งหมดที่ดูดซึมโดยลำไส้ [25] ทั้งนี้การดูดซึม Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์นั้นถูกควบคุมโดยโปรตีนใน tight junction โดยเฉพาะ claudin [11, 15, 35] ผลการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าลำไส้เล็กส่วน jejunum และ ileum รวมถึง Caco-2 เซลล์นั้นมีการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 [41, 42] ดังนั้นการลดลงของ Cldn-7 และ -12 จากอิทธิพลของ omeprazole จึงส่งผลให้ลดการดูดซึม Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้ (รูปที่ 4, 5) และอาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ปริมาณ Mg ในร่างกายผู้ป่วยต่ำลง

Ikari และคณะ [16] รายงานกลไกการควบคุมการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ โดยเมื่อกระตุ้นการทำงานของ CaSR ส่งผลลดการทำงานของ PKA และลดการแสดงออกของ Cldn-16 บน tight junction และลดการขนส่ง Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง MDCK ซึ่งเป็นแบบจำลองเซลล์เยื่อบุท่อไตส่วน tick ascending limb แต่จากผลการทดลองครั้งนี้บ่งชี้ว่าการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ CaSR และ PKA (รูปที่ 4, 5, 6) นอกจากนั้นยังไม่พบการแสดงออกของ Cldn-16 ในลำไส้ และ Caco-2 cell [40, 41, 43] บ่งชี้ว่ากลไกการควบคุมการขนส่ง Mg ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ลำไส้เล็กนั้นมีความจำเพาะ และต้องการการวิจัยในเชิงลึกต่อไป

จากการศึกษา tight junction ของแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า omeprazole มีผลลดความกว้าง แต่เพิ่มความยาวของ tight junction (รูปที่ 11) จากกฎของ Poiseuille อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความต้านทานการไหลของของไหลผ่านท่อกับความยาว (L) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ (r) ( $R \propto L \propto 1/r^4$ ) หากท่อมีขนาดเล็กลง หรือยาวขึ้นจะส่งผลให้ความต้านทานการไหลของสารผ่านท่อสูงขึ้น ช่องว่างระหว่างเซลล์ของ tight junction ก็เป็นเสมือนท่อเปิดสำหรับ



การขนส่งสารน้ำและไอออนผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ [30] ดังนั้นการเพิ่มความยาว และลดความกว้างของช่องว่างระหว่างเซลล์ของ tight junction จึงส่งผลเพิ่มความต้านทานการไหลของไอออนผ่าน และความต้านทานไฟฟ้า (รูปที่ 8)

ผลการศึกษาการเกี่ยวกับการกลไกควบคุมภายในเซลล์พบว่าการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์นั้นอาศัยการทำงานของ PKC (รูปที่ 6) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า PKC มีอิทธิพลความคุมการทำงานของ tight junction ในการขนส่ง Mg อย่างไร และต้องการการวิจัยในเชิงลึกต่อไป

โดยสรุปผลการวิจัยในโครงการวิจัยนี้บ่งชี้ว่า omeprazole มีฤทธิ์ลดการแสดงออกของ Cldn-7 และ -12 จึงส่งผลลดการคัดเลือกประจุบวกผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ tight junction นอกจากนี้ omeprazole ยังเพิ่มความยาว และลดความกว้างของ tight junction ส่งผลให้เพิ่มความต้านทานการไหลของไอออนผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ของ tight junction ซึ่งมีผลลดการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์

#### 4. สรุป และเสนอแนะ

4.1 ควรศึกษาต่อเนื่องกลไกการควบคุมการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้ในเชิงลึก

4.2 ควรศึกษาต่อเนื่องกลไกควบคุมการแสดงออกของ Cldn-7 และ Cldn-12 บน tight junction ของแผ่นเซลล์เยื่อบุลำไส้

4.3 ควรศึกษาต่อเนื่องอิทธิพลและการทำงานของ PCK ที่ควบคุมการทำงานของ tight junction ในการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้

4.4 ควรศึกษาต่อเนื่องกลไกการออกฤทธิ์ของ omeprazole ลดการขนส่ง Mg แบบผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุลำไส้

4.5 ผลการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญที่แสดงถึงผลข้างเคียงของยาซึ่งนิยมใช้รักษาโรคกระเพาะอาหารในปัจจุบันคือ omeprazole ทำให้เกิดภาวะปริมาณ Mg ในกระแสเลือดต่ำอย่างรุนแรง ซึ่งจะนำพามาซึ่งปัญหาทางด้านสุขภาพอื่นๆ ของผู้ป่วย ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ให้การรักษาและผู้รับการรักษาตระหนักและหาทางป้องกันผลข้างเคียงจากการใช้ยา omeprazole ดังกล่าว

4.6 องค์ความรู้จากโครงการวิจัยและงานวิจัยต่อเนื่องจะทำให้เข้าใจกลไกการควบคุมการดูดซึม Mg ระดับเซลล์ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยที่มีความต้องการ Mg ในปริมาณสูงต่อไป

#### 5. ผลผลิต

ผู้วิจัยกำลังจัดทำ manuscript เพื่อขอตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยต่อไป

รายงานการเงิน

## แบบรายงานการเงิน โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา

โครงการ: บทบาทของ CaSR และ tight junction ในภาวะ omeprazole ยับยั้งการขนส่งแมกนีเซียม  
แบบผ่านช่องระหว่างเซลล์ในแผ่นเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน นายณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

รายงานในช่วงตั้งแต่ วันที่ 1 มีนาคม 2554 ถึง วันที่ 26 มีนาคม 2555

## รายจ่าย

หมวด (ตามสัญญา)	รายจ่ายสะสมจาก รายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวด ปัจจุบัน	รวมรายจ่าย สะสมถึงปัจจุบัน	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	คงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	-	-	-	-	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	165,000	-165,000	330,000	330,000	-165,000
4. ค่าใช้สอย	-	-	-	-	-
5. อื่นๆ	-	-	-	-	-
รวม	165,000	-165,000	330,000	330,000	-165,000

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

## จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 165,000 บาท ได้รับวันที่ 17 สิงหาคม 2554

งวดที่ 2 ณ วันทำรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ยังไม่ได้รับงบประมาณวิจัย

เปิดบัญชีและดอกเบีย ผู้ให้ทุนไม่ได้รับไว้จึงไม่ได้ดำเนินการเปิดบัญชีตั้งแต่นั้น อีกทั้งงบประมาณที่ได้ทั้งงวดที่ 1 และงวดปัจจุบันล่าช้า ไม่ทันจ่ายค่าสารเคมีและวัสดุซึ่งต้องชำระใน 90 วัน นับจากวันที่ได้รับสารเคมีนั้นๆ

รวม 165,000 บาท

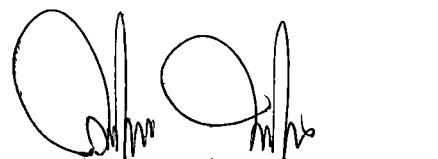
## ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1 รวม 165,000 บาท

งวดที่ 2 รวม 165,000 บาท

จำนวนเงินคงเหลือ -165,000 บาท บาท

  
 ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

  
 ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการวิจัย

## บรรณานุกรม

1. Abrahamse SL, Bindels RJ, van Os CH. The colon carcinoma cell line Caco-2 contains an  $H^+/K^+$ -ATPase that contributes to intracellular pH regulation. *Pflugers Arch* 1992; 421(6): 591–597.
2. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175(3): 880–885.
3. Boparai V, Rajagopalan J, Triadafilopoulos G. Guide to the use of proton pump inhibitors in adult patients. *Drugs* 2008; 68(7): 925–947.
4. Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988; 48(7): 1936–1942.
5. Cundy T, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol* 2008; 69, 338–341.
6. Davies SL, Gibbons CE, Steward MC, Ward DT. Extracellular calcium- and magnesium-mediated regulation of passive calcium transport across Caco-2 monolayers. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 2318–2324.
7. Durlach J. Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Magnes Res* 1990; 3(3): 217–218.
8. Ekmekcioglu C, Ekmekcioglu A, Marktl W. Magnesium transport from aqueous solutions across Caco-2 cells--an experimental model for intestinal bioavailability studies. Physiological considerations and recommendations. *Magnes Res* 2000; 13(2): 93–102.
9. Epstein M, McGrath S, Law F. Proton-pump inhibitors and hypomagnesemic hypoparathyroidism. *N Engl J Med* 2006; 355(17): 1834–1836.
10. Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J Clin Invest* 1991. 88(2): 396–402.
11. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 2006; 16(4): 181–188.

12. Grubbs RD. Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biometals* 2002; 15(3): 251–259.
13. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96(3): 736–749.
14. Hoenderop JG, Bindels RJ. Calciotropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology* 2008; 23: 32–40.
15. Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Pual DL, Waldegger S, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008; 118(2): 619–628.
16. Ikari A, Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M. Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778(1):283-290.
17. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4): F599–F605.
18. Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Intl J Pharm* 1996; 127: 103–107.
19. Macek J, Klíma J, Ptáček P. Rapid determination of omeprazole in human plasma by protein precipitation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 852(1-2): 282–287.
20. McCarthy JM, Kumar R. Divalent cation metabolism: Magnesium, In: Glasscock RJ, Cohen AH, Grunfeld JP, eds. *The Schrier Atlas of Diseases of the Kidney*. Philadelphia: Current Medicine Inc. 1999: 4.1–4.12.
21. Nicholson C, Tao L. Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. *Biophys J* 1993; 65(6): 2277–2290.

## ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

22. Olbe L, Carlsson E, Lindberg P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(2): 132–139.
23. Pinto M, Robin-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadow N, Dussaulx E. Enerocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 1983; 47: 323–330.
24. Quamme GA, de Rouffignac C. Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front Biosci* 2000; 5: D694–D711.
25. Quamme GA. Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(2): 230–235.
26. Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458(1): 90–102.
27. Rude RK. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4): 749–758.
28. Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem* 2004; 15(12): 710–716.
29. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(8): 813–821.
30. Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 2003; 84(3):1660–1673.
31. Thongon N, Nakkrasae L-I, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294(5): C1158–C1168.
32. Thongon N, Krishnamra N. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol* 2010. (Accepted)
33. Touyz RM. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 107–136.

34. Van Gaal L, Delvigne C, Vandewoude M, Cogge E, Vaneerdeweg W, Schoofs E, De Leeuw I. Evaluation of magnesium before and after jejuno-ileal versus gastric bypass surgery for morbid obesity. *J Am Coll Nutr* 1987; 6(5): 397–400.
35. Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Protor W, Colegio OR, Anderson JM. The density of small cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 2008; 121: 298–305.
36. Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 2003; 24(1-3): 27–37.
37. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man: fact or myth. *Pharm Res* 1997; 14(6): 763–766.
38. Yoshioka M, Ericksøn RH, Matsumoto H, Gum E, Kim ES. Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV during enterocytic differentiation of human colon cancer (Caco-2) cells. *Int J Cancer* 1991; 47(6): 16–21.
39. Ward T. Calcium receptor-mediated intracellular signaling. *Cell Calcium* 2004; 35: 217–228.
40. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, Kojima T, Yamashita T, Sawada N. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem* 2006;54(8): 933–44.
41. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008; 19(5): 1912–1921.
42. Alexandre MD, Lu Q, Chen YH. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular  $\text{Cl}^-$  conductance and increases the paracellular  $\text{Na}^+$  conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci* 2005; 118: 2683–2693.
43. Charoenphandhu N, Nakkrasae L, Kraidith K, Teerapornpantakit J, Thongchote K, Thongon N, Krishnamra N. Two-step stimulation of intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption during lactation by long-term prolactin (PRL) exposure and suckling-induced PRL surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E609–E619.