

บทความวิจัย (Research Article)

คุณสมบัติลดคอเลสเตอรอลของสารสกัดใบย่านางในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เลี้ยงต่อเนือง Caco-2

อัจฉราภรณ์ ดวงใจ^{1*}, นันทิทิพ ลิ้มเพียรชอบ², ขนิษฐพร ไตรศรัทธ²

Cholesterol lowering properties of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels leaf extract in the Caco-2 cell line

Acharaporn Duangjai^{1*}, Nanteetip Limpeanchob², Kaniittaporn Trisat²

¹ Department of Physiology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao Province, 56000

² Pharmacological Research Unit, Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok Province 65000

* Corresponding author, E-mail: achara.phso@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2015;8(2):87-92.

บทคัดย่อ

การศึกษามุ่งหมายได้สวนประสิทธิภาพของสารสกัดใบย่านางต่อการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านการยับยั้งการนำเข้าคอเลสเตอรอล การละลายคอเลสเตอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก และการจับกรดน้ำดี การนำเข้าคอเลสเตอรอลกำหนดหาโดยกัมมันตภาพรังสีในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เลี้ยงต่อเนือง Caco-2 เตรียมอนุภาคชั้นเล็กผสมคอเลสเตอรอล ประเมินค่ากิจกรรมกรดน้ำดีใช้สารสกัดจับกับกรดทอโรคอลิก กรดไกลโคดีออกซีโคลิก และกรดทอโรดีออกซีโคลิก ใช้คอเลสเตอรามีนเป็นตัวควบคุมเชิงบวก สิ่งที่พบแสดงว่า สารสกัดใบย่านางมีศักยภาพลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลโดยลดการนำเข้าคอเลสเตอรอลในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ Caco-2 ระหว่างร้อยละ 27 ถึง 43 ยิ่งกว่านั้นสารสกัดยับยั้งการละลายเป็นอนุภาคชั้นเล็กและยับยั้งการจัดกับกรดน้ำดีต่างชนิดพิสัยร้อยละ 18.98 ถึง 45.87 และร้อยละ 26.80 ถึง 42.65 ตามลำดับ อันซึ่งอาจส่งผลให้การดูดซึมคอเลสเตอรอลลำช้า สิ่งเหล่านี้ให้หลักฐานวิทยาศาสตร์สำหรับคุณสมบัติการลดคอเลสเตอรอลของสารสกัดใบย่านาง

คำสำคัญ: ย่านาง, สารสกัดใบ, การนำเข้าคอเลสเตอรอล, จับกรดน้ำดี, ละลายเป็นอนุภาคชั้นเล็กได้

Abstract

The study aimed to investigate the effect of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels leaf extract on cholesterol absorption through inhibition of cholesterol uptake, micellar cholesterol solubility, and bile acids binding. The uptake of cholesterol was determined by radioactivity in Caco-2 cells. Cholesterol mixed micelles was prepared for cholesterol solubility study. Taurocholic acid, glycodeoxycholic acid, and taurodeoxycholic acid were evaluated the activity of extract to bind with bile acids. Cholestyramine was also used in the positive control. The finding showed that *T. triandra* leaf extract has a potential to decrease cholesterol absorption by

¹ สาขาวิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² หน่วยวิจัยเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

รับต้นฉบับวันที่ 18 ธันวาคม 2558, รับลงตีพิมพ์วันที่ 18 มิถุนายน 2558

reducing cholesterol uptake in Caco-2 cells between 27 to 43%. Furthermore, the extract inhibited micelles solubility and bound with bile acids in range of 18.98 to 45.87% and 26.80 to 42.65%, respectively which may result in delayed cholesterol absorption. These provided the scientific evidences for the cholesterol lowering properties of *T. triandra* leaf extract.

Keywords: *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels, leaf extract, cholesterol uptake, bile acid binding, micelles solubility

บทนำ

ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) [1] และเหตุเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดอันเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของคนไทย [2] และทั่วโลก [3] ด้วยแนวโน้มน้ำหนักตัวมากเกินไป (obesity) และคอเลสเตอรอลเพิ่มสูง [2] พืชสมุนไพรและผักพื้นบ้านเป็นทางเลือกหนึ่ง และมีการศึกษาแสดงให้เห็นความสามารถลดคอเลสเตอรอลและไขมัน [4-8] *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels หรือชื่อไทยท้องถิ่นเรียกว่า ยานาง เป็นพืชวงศ์บอเรเพ็ด (Menispermaceae) พบทุกภูมิภาค ใช้ใบคั้นเป็นน้ำปรุงอาหาร คุณค่าทางโภชนาการประกอบด้วยวิตามินซี โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ไฟเบอร์ แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน ไนอะซิน และวิตามินเอสูง [9] รากประกอบด้วยสารอินทรีย์จากพืช (alkaloid) กลุ่มโครงสร้างไอโซควิโนไลน์ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกัน (bisbenzylisoquinoline) ได้แก่ tiliacornine, 2'-nortiliacornine และ tiliacornine [10] ใบยังประกอบด้วยเบต้า โพลีแซคคาไรด์ และโพลีฟีนอล [11,12]

คุณสมบัติของยานางประกอบด้วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) ต้านจุลชีพ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ต้านไข้ และต้านอนุมูลอิสระ [13-16] ยานางปราศจากอันตรกิริยา (interaction) กับยารักษาโรคเรื้อรังเช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคกระดูกและข้อ โรคเบาหวาน โรคระบบทางเดินหายใจ [17] การศึกษามุ่งหมายได้ส่วนประสิทธิภาพของสารสกัดยานางต่อการยับยั้งการนำเข้าคอเลสเตอรอล การละลายคอเลสเตอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก และการจับกรดน้ำดี

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัด

เก็บตัวอย่างใบยานางจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ หลังล้างและผึ่งแห้ง ขยี้ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหรือปั่นในน้ำกลั่นด้วยเครื่องปั่นแรงรอบต่ำ กรองด้วยผ้าขาวบาง ปั่นแข็งส่วนน้ำและผ่านเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) ได้สารสกัดและเก็บอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษา

การวัดปริมาณฟีนอลิก

หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Ciocalteu reagent method ละลายสารสกัดกระทั่งความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ส่วนใสของสารสกัด 20 ไมโครลิตรเติมด้วย 100 ไมโครลิตรของสารเคมี Folin-Ciocalteu phenol reagent ต่อน้ำ อัตราส่วน 1 ต่อ 10 และ 80 ไมโครลิตรของโซเดียมไบคาร์บอเนต 15 กรัมต่อลิตรในแผ่น 96 หลุม บ่มมืด อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ใช้น้ำเป็นสิ่งแวดล้อม และกรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน เปรียบเทียบกับกรดแกลลิก ด้วยการเทียบเคียงกับกรดแกลลิก (gallic acid equivalent - GAE) แสดงหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้

ใช้เซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 ของบริษัท American Type Culture Collection (ATCC) เลี้ยงเซลล์ด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 (DMEM)/F12 อันมี

ร้อยละ 10 น้ำเหลืองของเลือดทารกวัว (fetal bovine serum - FBS) และร้อยละ 1 เพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin) บ่มในตู้กายไต์ร้อยละ 95 ความชื้นของอากาศ ร้อยละ 5 คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เซลล์เจริญในคอนโทแก้ว (flask) ขนาด 75 ลูกบาศก์ เซนติเมตร และเลี้ยงในแผ่น 96 หลุมเพื่อทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ หรือเลี้ยงในแผ่น 24 หลุมเพื่อทดสอบการนำคอเลสเทอรอลนำเข้าเซลล์

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

ใช้วิธี 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 3-diphenyl tetrazolium bromide assay หรือชื่อย่อ MTT assay เลี้ยงเซลล์ในแผ่น 96 หลุม บ่มด้วยสารสกัดต่างความเข้มข้น นาน 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT เซลล์มีอาหาร 2 ชั่วโมงก่อนครบเวลาบ่ม ดูดอาหารออกและละลายตะกอนอาหารสารมีสีฟอร์มาซาน (formazan) ด้วยเอทานอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (ethanol-dimethyl sulfoxide - DMSO) อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตรต่อปริมาตร วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านผ่านหลุม

การเตรียมคอเลสเทอรอลอนุภาคชั้นเล็ก

ประยุกต์วิธีของ Yamanashi [18] ด้วยการเตรียมสารละลายคอเลสเทอรอล และฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) ในคลอโรฟอร์ม (chloroform) ส่วนสารละลายโซเดียมทอโรโคลเลต (sodium taurocholate) เตรียมในเมทานอล (methanol) นำสารละลายของไขมันและเกลือน้ำดี (bile salt หรือ sodium glycocholate) รวมเข้ากัน และระเหยแห้งในบรรยากาศไนโตรเจน เก็บแผ่นเยื่อบางในบรรยากาศไนโตรเจน ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าใช้ละลายคอเลสเทอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก

การนำคอเลสเทอรอลเข้าเซลล์

เลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 ในแผ่น 24 หลุม จำนวน 50,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 14 ถึง 21 วัน เปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน จากนั้นใส่สารสกัดร่วมกับคอเลสเทอรอลอนุภาคชั้นเล็ก หลังบ่มนาน 4 ชั่วโมง ดูดอาหารออก ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง

ทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายร้อยละ 0.1 Triton-X ที่มี 0.2 normality (N) ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ แบ่งเซลล์เป็น 2 ส่วน ส่วนแรกวัดปริมาณโปรตีน ส่วนที่สองใช้เครื่องนับรังสีจากแสงวับในของเหลว (liquid scintillation counter) วัดปริมาณคอเลสเทอรอลติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี

การศึกษาหลอดทดลอง

ความสามารถละลายคอเลสเทอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก

เตรียมคอเลสเทอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็กตามวิธีข้างต้น ประยุกต์วิธีการวัดความสามารถละลายคอเลสเทอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็กของ Kirana [19] สารละลายประกอบด้วย 1 มิลลิโมลของคอเลสเทอรอล 1 มิลลิโมลของโซเดียมทอโรโคลเลต และ 0.6 มิลลิโมลของฟอสฟาติดีลโคลีน เติมสารสกัดต่างความเข้มข้นในสารละลายคอเลสเทอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก หลังบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง กรองคอเลสเทอรอลด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตร และวัดปริมาณคอเลสเทอรอล

การจับกับกรดน้ำดี

ประยุกต์วิธีของ Yoshie-Stark [20] และ Adisakwattana [21] บ่ม 200 ไมโครลิตรของสารสกัดกับ 200 ไมโครลิตรของกรดทอโรคอลิก กรดไกลโคลิด ออกซีโคลิก และกรดทอโรไดออกซีโคลิก ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล [ละลายด้วยน้ำเกลือรักษาความเป็นกรดต่างของฟอสเฟต (phosphate buffered saline - PBS) 100 มิลลิโมล] ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที สูดถ่ายกรองผ่านกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตร เพื่อแยกส่วนไม่ละลายของกรดน้ำดีตัวยึดจับกับสารสกัดกลายเป็นกรดน้ำดีอิสระ (free bile acid) วัดความเข้มข้นด้วยการวิเคราะห์กรดน้ำดีทั้งหมด (total bile acid assay) รุ่นที่ 5 ของ Randox laboratory

ผสม 20 ไมโครลิตรของกรดน้ำดีกรองได้กับ 170 ไมโครลิตร ของส่วนผสมปฏิกิริยาเคมี (0.122 โมลต่อลิตร Tris buffer ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9.5 กับ 1 โมลต่อลิตร hydrazine hydrate และ 7.7 มิลลิ

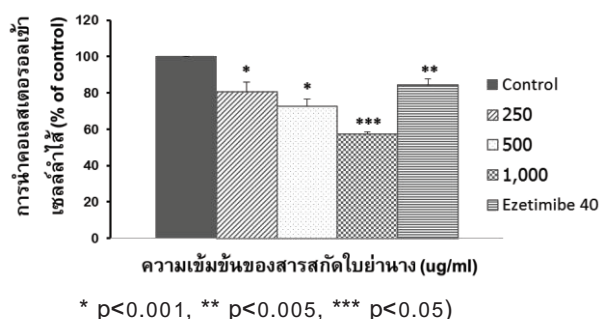
โมลต่อลิตร (nicotinamide adenine – NAD) และเติม 10 ไมโครลิตรของ 3α -hydroxysteroid dehydrogenase 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นป้อนอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทั้งนี้กำหนดคอเลสไทรามีน (cholestyramine) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และสารลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลอีเซทิไมบ์ (ezetimibe) เป็นตัวเปรียบเทียบ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation – SD) เปรียบเทียบระหว่างต่างกลุ่มทดลองด้วยสถิติวิเคราะห์การแปรผัน (analysis of variance - ANOVA) ตามด้วยการทดสอบความแตกต่างรายคู่เปรียบเทียบฟิชเชอร์ (Fisher post hoc test) ค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

สารสกัดใบย่านางด้วยน้ำเป็นผงสีเขียวยับยั้งการละลายน้ำง่าย สัดส่วนสกัดได้ร้อยละ 4.79 มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 4.99 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อลิตรของกรดแกลลิก ยิ่งสารสกัดมีความเข้มข้นยิ่งสูงยับยั้งการนำคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นที่ 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลดการนำคอเลสเตอรอลเข้าจากน้อยไปหามากเท่ากับร้อยละ 27, 40 และ 43 ตามลำดับ อีเซทิไมบ์ตัวควบคุมเท่ากับร้อยละ 16 แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 สัดส่วนยับยั้งการนำคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์มะเร็งลำไส้ระหว่างสารสกัดใบย่านางต่างความเข้มข้น อีเซทิไมบ์ และตัวควบคุม

สารสกัดใบย่านางความเข้มข้นยิ่งสูงยับยั้งการละลายคอเลสเตอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็กเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นที่ 0.1, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดการละลายคอเลสเตอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็กเป็นสัดส่วนจากน้อยไปหามาก (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เท่ากับร้อยละ 18.98 (9.07), 25.15 (9.19) และ 45.87 (26.64) ตามลำดับ

สารสกัดใบย่านางจับกับกรดน้ำดีต่างชนิด 0.2 มิลลิโมล ได้แก่ กรดทอโรไดออกซีโคลิก กรดไกลโคไดออกซีโคลิก และกรดทอโรคอลิก เป็นสัดส่วน (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) จากมากไปหาน้อยเท่ากับ 42.65 (4.21), 31.63 (2.55) และ 26.80 (3.71) สารสกัดจับกรดทอโรไดออกซีโคลิกและกรดทอโรคอลิกจับดีกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของคอเลสไทรามีนตัวควบคุมเชิงบวก แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สัดส่วนการจับกับกรดน้ำดีต่างชนิดของสารสกัดใบย่านางเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก

กรดน้ำดี	สัดส่วนการจับเป็นร้อยละ (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	
	สารสกัด	ตัวควบคุมเชิงบวก
กรดทอโรไดออกซีโคลิก	42.65 (4.21)	25.22 (0.80)
กรดไกลโคไดออกซีโคลิก	31.63 (2.55)	67.09 (3.48)
กรดทอโรคอลิก	26.80 (3.71)	17.63 (1.15)

วิจารณ์

สารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบย่านางมีคุณสมบัติยับยั้งการละลายคอเลสเตอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก เช่นเดียวกับฟิสิกเคมีคล้ายคอเลสเตอรอลในพืช (phytosterol) ประกอบด้วยสเตอรอล (sterol) และสแตนอล (stanol) พบในธัญพืช สามารถลดดูดซึมคอเลสเตอรอลด้วยการแย่งแทนที่ละลายคอเลสเตอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก [22,23] ยังมีคุณสมบัติคล้ายโพลีฟีนอลของน้ำมันเมล็ดองุ่นลดการละลายคอเลสเตอรอลเป็นอนุภาคชั้นเล็ก [24]

แม้ว่ากลไกการยับยั้งไม่ชัดเจน แต่มีการศึกษาการจับกับน้ำดีของผลไม้และพืชผักกับกรดน้ำดีปรากฏว่ากล้วยจับกับกรดน้ำดีสูงกว่าลูกท้อ สับปะรด องุ่น แอปริคอต และลูกท้อผิวสีนํ อยาง

มีนัยสำคัญ [25] กระเจียบจับกับกรดน้ำดีมากกว่าหัวบีท มะเขือม่วง หัวผักกาด ถั่วเขียว แครอท และกะหล่ำดอก ตามลำดับ [26]

การลดคอเลสเตอรอลและศักยภาพการแตกสลายอาหารเป็นชิ้นเล็ก ประเมินค่าด้วยการจับกับกรดน้ำดีอิงกับสหสัมพันธ์ระหว่างการศึกษานี้ในร่างกายและหลอดทดลอง ประยุกต์ด้วยการเปรียบเทียบกับสารจับกับน้ำดีเช่น คอเลสเตอรามีน [27] การศึกษาเกี่ยวกับการลดคอเลสเตอรอลควรประเมินค่าการจับกับน้ำดีโดยกำหนดให้คอเลสเตอรามีนมีคุณค่าร้อยละ 100 ร่วมกับการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ต้องการศึกษากับกรดน้ำดีต่างชนิดและสารลดคอเลสเตอรอลอื่น เช่นเดียวกับ การยับยั้งการนำคอเลสเตอรอลเข้าเซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยง เพื่อความชัดเจนของการเทียบเคียงประสิทธิภาพต่างลักษณะเฉพาะ

โดยสรุปสารสกัดใบย่านางมีคุณสมบัติลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในหลอดทดลอง จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื่อมไปถึงการศึกษาทางคลินิก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้อำนวยความสะดวกให้เครื่องมือและสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Frishman WH. Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. Am J Med. 199;104:S18-27.
2. World Health Organization. Noncommunicable diseases (NCD) country profile: Proportional mortality, Thailand. 2014 (cited 2013 May 13) Available from: http://www.who.int/nmh/countries/tha_en.pdf.
3. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2011 [cited 2013 May 13]. Available from: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/.
4. Chen CC, Liu LK, Hsu JD, Huang HP, Yang MY, Wang CJ. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Food Chem. 2005; 91(4):601-7.
5. Choi H, Eo H, Park K, Jin M, Park EJ, Kim SH, et al. A water-soluble extract from Cucurbita moschata shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in a high fat diet-induced obesity mouse model. Biochem Biophys Res Commun. 2007;359(3):419-25.
6. Duangjai A, Ingkaninan K, Limpeanchob N. Potential mechanisms of hypocholesterolaemic effect of Thai spices/dietary extracts. Nat Prod Res. 2011;25(4):341-52.
7. อนันต์ อุ่นอรุณ, อัจฉราภรณ์ ดวงใจ, นันทิทิพย์ ลิ้มเพียรชอบ.ฤทธิ์ของการดูดซึมคอเลสเตอรอลของสารสกัดกล้วยสุกในเซลล์ Caco-2. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 2554;16(2):83-8.
8. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsale A, et al. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of Hibiscus sabdariffa L. in hypercholesterolemic rats. J Ethnopharmacol. 2006;103(2):252-60.
9. กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติชนะ. มหัศจรรย์ย่านางจากชุปหน่อไม้ถึงเครื่องดื่มสุขภาพ [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน; 2553 [อ้างถึง 15 เมษายน 2558]. หาได้จาก : <http://www.doctor.or.th/article/detail/10740>.
10. Sureram S, Senadeera SP, Hongmanee P, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of mycobacterium tuberculosis. Bioorg Med Chem Lett. 2012;22(8):2902-5.

11. ปานทิพย์ บุญส่ง, นัฏฐา เล่าหกุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น. การวิเคราะห์สารประกอบ polyphenolic compound และสารให้สีจากใบ *Tiliacora triandra* (Diels). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 2552;40(3):13-6.
12. Singthong J, Ningsanond S, Cui SW. Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. Food Chem. 2009;114(4):1301-7.
13. Phomkaivon N, Areekul V. Screening for antioxidant activity in selected Thai wild plants. Asian J Food Agro-Ind. 2009;2(4):433-40.
14. Naibaho NM, Laohankunjit N, Kerdchoechuen O. Volatile composition and antibacterial activity of essential oil from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. Agri Sci J. 2012;43(2):529-32.
15. Fumio I, Supanee D, Naoko K, Yuichi F, Masaki A, Nijsiri R, et al. Chemical and biological studies on some Thai medicinal plants. J Sci Soc. 1990;16:25-31.
16. ชูตินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา, เอกชัย ดำเกลี้ยง, พยุงศักดิ์ สุรินตะ, วสันต์ ดีล้ำ.ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ต้านออกซิชั่น และต้านจุลชีพของสารสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพรอีสาน. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 2555;5(2):99-107.
17. ชูลีกร สอนสุวิทย์, ชบาไพร โพธิ์สุยะ, ดวงกมล จรูญวนิชกุล, นรภัทร พิริยะชนานุสรณ์. การใช้สมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีโอกาสเกิดอันตรกิริยากับยาที่ใช้ในผู้ป่วยเรื้อรัง. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2555;7(4):149-54.
18. Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. Niemann-Pick C1-Like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and β -sitosterol uptake in Caco-2 cells. J Pharmacol Exp Ther. 2007;320(2):559-64.
19. Kirana C, Rogers PF, Bennett LE, Abeywardena MY, Patten GS. Naturally derived micelles for rapid in vitro screening of potential cholesterol-lowering bioactives. J Agric Food Chem. 2005;53(11):4623-7.
20. Yoshie-Stark Y, Wäsche A. In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. Food Chem. 2004;88(2):179-84.
21. Adisakwattana S, Intrawangso J, Hemrid A, Chanathong B, Mäkynen K. Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. Food Technology and Biotechnol 2012;50(1):11-6.
22. Brufau G, Canela MA, Rafecas M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. Nutr Res. 2008;28(4):217-25.
23. Jesch ED, Carr TP. Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. Nutr Res. 2006;26(11):579-84.
24. Ngamukote S, Mäkynen K, Thilawech T, Adisakwattana S. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. Molecules. 2001;16(6):5054-61.
25. Kahlon TS, Smith GE. In vitro binding of bile acids by bananas, peaches, pineapple, grapes, pears, apricots and nectarines. Food Chem. 2007;101(3):1046-51.
26. Kahlon TS, Chapman MH, Smith GE. In vitro binding of bile acids by okra, beets, asparagus, eggplant, turnips, green beans, carrots, and cauliflower. Food Chem. 2007;103(2):676-80.
27. Kahlon TS, Chow FI. (2000). In vitro binding of bile acids by rice bran, oat bran, wheat bran and corn bran. Cereal Chem. 2000;77(4):518-21.