กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง ศักยภาพของไมโรเอสทรอลในการเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1 เอ 1 โดยสารก่อมะเร็ง (Chemopreventive potential of miroestrol on carcinogen-induced cytochrome P450 enzyme activities) ภายใต้แผนงานวิจัย เรื่อง การผลิตไมโรเอสทรอลและดีออกซีไมโรเอสทรอลจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเพาะเลี้ยงกวาวเครือขาว *Pueraria candollei* var. *mirifica* และศักยภาพของไมโรเอสทรอลต่อฤทธิ์ทางประสาทวิทยาและการแปลงรูปทางชีวภาพในแบบจำลองหนูเมาส์ (Production of miroestrol and deoxymiroestrol from callus and cell suspension cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica* and potential of neuropharmacology and biotransformation in related mouse models) นี้ ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้วิจัย ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการเภสัชอณูชีววิทยาและห้องปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ หน่วยเครื่องมือวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงความมุ่งมั่นของสมาชิกกลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์

รศ.ดร.กนกวรรณ จารุกำจร

1 พฤศจิกายน 2556

บทคัดย่อ

กวาวเครือขาว หรือ *Pueraria candollei* เป็นสมุนไพรไทยในวงศ์ Leguminosae ที่มีการนำมาใช้เป็นอายุวัฒนะอย่างแพร่หลายและยาวนาน หัวกวาวเครือขาวมีไมโรเอสทรอล (miroestrol) ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) กลุ่มโครมีน (chromenes) ที่มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) สูงกว่าสารอื่นๆ การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสารสกัดกวาวเครือขาวพบว่า มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน และมีผลในการป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนูที่ตัดรังไข่ รวมถึงมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง ยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นสารก่อมะเร็ง (carcinogen bioactivity) และสามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดยสารก่อมะเร็งหลายชนิด การศึกษาวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาศักยภาพของไมโรเอสทรอลในการต้านการเหนี่ยวนำการแสดงออกทีระดับทรานสคริปชั่นของยีนของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับหนูเมาส์โดยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวนเปรียบเทียบกับเอสตราไดออล เพื่อสนับสนุนข้อดีที่เหนือกว่าการใช้เอสตราไดออลในกรณีหวังผลการเป็นฮอร์โมนทดแทน (hormone replacement therapy) ในแง่ผลกระทบต่อกลไกการแปลงรูปของสารทางชีวภาพ การศึกษาพบว่าไมโรเอสทรอลสามารถลดการแสดงออกของยีน *Cyp1a2* ในตับหนูเมาส์ในสภาวะปกติและการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ในตับหนูเมาส์ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทฟลาโวนได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เอสตราไดออลไม่มีผลในเชิงบวกต่อการแสดงออกของยีนทั้งสอง และจากการศึกษาก่อนหน้าไมโรเอสทรอลไม่มีผลรบกวนเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2B9/10 ในตับหนูเมาส์แตกต่างจากเอสตราไดออล ดังนั้น ข้อมูลเหล่านี้จึงสนับสนุนศักยภาพในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งผ่านกลไกการแปลงรูปทางชีวภาพของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของการใช้ไมโรเอสทรอลในการแพทย์ทางเลือกที่เหนือกว่าเอสตราไดออล ในลักษณะฮอร์โมนทดแทนในผู้มีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนแทนการใช้ยาแผนปัจจุบันได้

คำสำคัญ: ไมโรเอสทรอล, กวาวเครือขาว, CYP1A1, CYP1A2, สารก่อมะเร็ง

Abstract

Pueraria candollei or white Kwao kruae (family Leguminosae) is a rejuvenating herb in Thai folk medicine, in which a chromene isoflavonoid, miroestrol, is the most potent phytoestrogen. A crude extract of *P. candollei* showed estrogenic like activity and protective effect against bone loss in ovarectomized rats. A risk-benefit assessment of miroestrol as hormonal replacement therapy in a menopausal woman has been reported. Cytochrome P450 (P450) 1A1 and 1A2 play important roles in carcinogen bioactivity, and are inducible by (pro)carcinogens vice versa. The present study aims to study the chemopreventive potential of miroestrol on carcinogen-induced cytochrome P450 enzyme activities. The results showed a beneficial suppressive effect of miroestrol on the expression of mouse hepatic CYP1A1 and CYP1A2 mRNA, namely the levels of beta-naphthoflavone-induced CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs were significantly lowered by miroestrol whereas those of the expression by estradiol were unchanged. These findings revealed the chemopreventive potential of miroestrol and supported extra-beneficent of using miroestrol as an alternative medicine for hormone replacement therapy based on their promising bioactivity on regulation of P450s.

Keywords: miroestrol, *Pueraria candollei* var. *mirifica*, CYP1A1, CYP1A2, enzyme activity, carcinogen

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อ ข

Abstract ค

สารบัญตาราง ฉ

สารบัญภาพ ช

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย ซ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย 1

การทบทวนวรรณกรรม 3

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 6

ขอบเขตการวิจัย 6

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

ระเบียบวิธีวิจัย 7

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 7

การศึกษาแบบในกาย 8

การศึกษาพฤติกรรมและลักษณะทางกายภาพของสัตว์ทดลอง 8

การสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์ตับหนูเมาส์ 8

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอทั้งหมด 9

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Cyp1a1, Cyp1a2* และ *Gapdh* ที่ระดับทรานสคริปชั่น โดยเทคนิค Real time RT-PCR 9

การวิเคราะห์ข้อมูล 9

ผลการทดลอง 10

พฤติกรรมและลักษณะทางกายภาพภายนอกของสัตว์ทดลอง 10

การสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ตับหนูเมาส์และการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมด 12

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ที่ระดับทรานสคริปชั่น โดยเทคนิค Real time RT-PCR 14

อภิปรายผลการทดลอง 16

บทสรุปและข้อเสนอแนะ 17

เอกสารอ้างอิง 18

หน้า

ภาคผนวก 22
ภาคผนวก ก หนังสืออนุมัติโครงการฯ โดยคณะกรรมการจรรยาบรรณการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 23
AEKKU27/2553 24
ภาคผนวก ข ผลลัพธ์จากงานวิจัย 25
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 26
การเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 26
สำเนาผลงานตีพิมพ์ Udomsuk L, Jeungwatanatrakul T, Putalun W. and Jarukamjorn K.* Phytomedicine. 19: 1332-1335, 2012. [IF 3.268] 27
สำเนาผลงานตีพิมพ์ Udomsuk L, Chatuphonprasert W, Monthakantirat O, Churikhit Y and Jarukamjorn K.* Fitoterapia. 83: 1687-1692, 2012. [IF 2.231] 31
สำเนาการเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
The 1st ICHTAM. เรื่อง Antioxidant potentials of miroestrol, a phytoestrogen from *Pueraria candollei* var. *mirifica* in mouse livers. [oral presentation] 37
The 1st ICHTAM. เรื่อง Miroestrol improved the expression ratio of hepatic OPG to RANKL mRNAs of ovariectomized mice. [poster presentation] 39

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยและแหล่งที่มาของสารเคมี	7
ตารางที่ 2	แสดงเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการวิจัยและสถานที่ตั้งของเครื่องมือ	7
ตารางที่ 3	แสดงความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ	12

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1	สูตรโครงสร้างของไมโรเอสทรอล	3
รูปที่ 2	สูตรโครงสร้างของเบต้าแนฟโทฟลาโวน	4
รูปที่ 3	แสดงโปรไฟล์ของน้ำหนักหนูเมาส์ระหว่างการได้รับสารทดสอบต่างๆ	10
รูปที่ 4	แสดงน้ำหนักและขนาดของ uetrus ของหนูเมาส์หลังได้รับสารทดสอบต่างๆ	11
รูปที่ 5	การแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *Cyp1a1* ต่อ *Gapdh* ที่ระดับทรานสคริปชั่นในตับหนูเมาส์	14
รูปที่ 6	การแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *Cyp1a2* ต่อ *Gapdh* ที่ระดับทรานสคริปชั่นในตับหนูเมาส์	15

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

BNF	Beta-naphthoflavone
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2
CYP2B9/10	Cytochrome P450 2B9/10
E2	Estradiol benzoate
MR	Miroestrol
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
P450	Cytochrome P450s