

บทนำ

กวาวเครือขาว หรือ *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham วงศ์ Leguminosae เป็นสมุนไพรไทยที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายและยาวนาน หัวกวาวเครือตามตำรายาของหลวงอนุสรสุนทรใช้เป็นยาอายุวัฒนะได้ทั้งชายและหญิง ทำให้ผิวหนังที่เหี่ยวกลับมาเต่งตึงเสริมหน้าอก ทำให้เส้นผมดกดำ และ บำรุงเลือด จากรายงานการศึกษาพบว่าหัวกวาวเครือขาวมีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) โดยแบ่งเป็น กลุ่ม chromenes ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol (Chansakaow et al., 2000a) กลุ่ม isoflavones glycosides ได้แก่ puerarin, daidzin และ genistin กลุ่ม isoflavones ได้แก่ daidzein และ genistein (Chansakaow et al., 2000b) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจนจากพืช โดยสารในกลุ่ม chromenes เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่พบปริมาณน้อยมากในธรรมชาติ (0.002-0.004%) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสารสกัดกวาวเครือขาวพบว่า มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคลายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง (Chansakaew et al., 2000a, 2000b; Trisomboon et al., 2006; Cherdshewasart et al., 2007a; Cherdshewasart et al., 2008) และมีผลในการป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนูที่ตัดรังไข่ (Urasopon et al., 2008) โดยมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง (Chandeying, Lamlertkittikul, 2007; Manonai et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Cherdshewasart, Sutjit, 2008) และเมื่อกล่าวถึงการใช้สมุนไพรทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน การศึกษาความเป็นพิษหรือกลไกการเปลี่ยนแปลงยาและสารทางชีวภาพ (drug metabolism or biotransformation) เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สำคัญและจำเป็นต้องศึกษาควบคู่ไปกับการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งปัจจุบันการศึกษาทางด้านพิษวิทยาและกลไกการเปลี่ยนแปลงยาและสารทางชีวภาพของกวาวเครือขาว ตลอดจนสารในกลุ่ม chromenes นี้ ยังไม่มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องปรากฏในฐานข้อมูลใดๆ เลยเป็นเหตุให้ขาดข้อมูลการศึกษาทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรมอย่างเป็นระบบที่ชัดเจนและเชื่อถือได้ ที่จะสนับสนุนการนำสมุนไพรและยาในตำรับยาแผนโบราณมาใช้ประโยชน์จริงในทางคลินิก

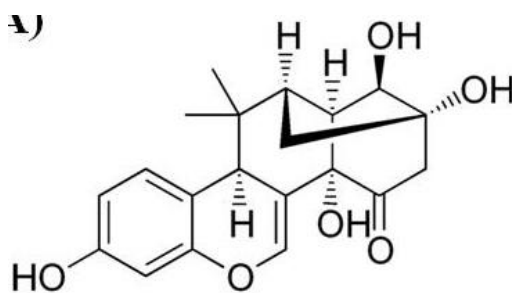
เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบมากในเซลล์ตับ ชนิดของเอนไซม์ที่เป็นเอนไซม์หลักจะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำหน้าที่หลักในการเปลี่ยนแปลงยา (drugs) และสารต่างๆ (xenobiotics) ที่ร่างกายได้รับให้อยู่ในสภาพหรือรูปแบบที่ร่างกายสามารถกำจัดออกได้โดยง่าย และมีความเป็นพิษต่อร่างกายลดลง (Gonzalez FJ and Gelboin, 1994; Poulos, 1995; Woof, 1995) เนื่องจากเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 จะมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดในอวัยวะหนึ่งๆ สำหรับสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง การได้รับยาหรือสารใดๆ เข้าสู่ร่างกายร่วมกันจึงมีผลต่อการถูกกำจัดของยาหรือสารต่างๆ เหล่านี้ นอกจากร่างกายโดยเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเชิงสัมพัทธ์ทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราเร็วในการกำจัด ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเป็นต้องบริโภคอย่างต่อเนื่องทั้งผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยา และเครื่องสำอางต่างๆ ต้องได้รับการตรวจสอบให้ชัดเจนว่าไม่ก่อให้เกิด

ผลลัพธ์ต่อร่างกายในเชิงลบ การศึกษาผลของยาสมุนไพรรวมทั้งสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นการศึกษาทางด้านพิษวิทยาในระดับเซลล์และชีวโมเลกุลแขนงหนึ่งที่ยังไม่มีการรายงานอย่างชัดเจน และการศึกษายังไม่แพร่หลายเท่าที่ควรเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในยาแผนปัจจุบัน ดังนั้นเพื่อให้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ของความปลอดภัย ตลอดจนผลการปฏิสัมพันธ์กันของยาตำรับสมุนไพรด้วยกันเองหรือต่อยาแผนปัจจุบันตำรับอื่นๆ ที่อาจได้รับร่วมด้วย และเพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาขนาดรับประทานที่ให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตำรับยาต่างๆ ที่ให้ร่วมกัน

สารในกลุ่ม isoflavones glycosides และ isoflavones มีรายงานการศึกษาผลต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 บ้างแล้ว (Guerra et al., 2000; Helsby et al., 1998) ในขณะที่สารในกลุ่ม chromenes ยังไม่พบรายงานการศึกษา ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาศักยภาพทางชีวภาพของสารกลุ่ม chromenes คือ miroestrol ในกวาวเครือขาวที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (ที่นิยมใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนชนิดหนึ่งในการรักษาแผนปัจจุบัน) ในการมีฤทธิ์เสริมในการปกป้องเซลล์จากเคมี (chemopreventive phytoestrogen) เป็นการต่อยอดการศึกษาผลของ miroestrol ต่อการเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเปรียบเทียบกับฮอร์โมนเพศสังเคราะห์เอสตราไดออล เพื่อให้ได้ข้อมูลยืนยันศักยภาพของ miroestrol ในการใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในแง่ของผลกระทบต่อกลไกการแปลงรูปของสารทางชีวภาพ (biotransformation) และสนับสนุนข้อดีของไมโรเอสทรอลที่เหนือกว่าฮอร์โมนเพศสังเคราะห์เอสตราไดออล ตลอดจนการประเมินศักยภาพของไมโรเอสทรอลต่อการนำไปพัฒนาเป็นยาเสริมในการปกป้องเซลล์จากเคมี ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังให้เกิดผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับนโยบายสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทยและจะช่วยส่งเสริมการแพทย์ทางเลือกในกระบวนการพัฒนายาจากสมุนไพรทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบันได้ด้วย

การทบทวนวรรณกรรม

กวาวเครือขาว มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Pueraria candollei* Wall. Ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham หรือ *Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatabandhu จัดเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae มีชื่ออื่นๆ คือ กวาวเครือ กวาว ทองเครือ (ไทย) ตามจอมทอง (ชุมพร) จานเครือ (อีสาน) โปเครือ กวาวเครือขาว ทองเครือ (เหนือ) โปะตะกู ตานเครือ ทางกวาว กวาวหัว (กะเหรี่ยง, กาญจนบุรี) กวาวเครือขาว พบมากในป่าเบญจพรรณทางภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาราช, 2547) ส่วนหัวใต้ดินเป็นส่วนที่ใช้ทางยาสรรพคุณของหัวกวาวเครือตามตำรายาของหลวงอนุสรสุนทรใช้เป็นอายุวัฒนะได้ทั้งชายและหญิง ทำให้ผิวหนังที่เหี่ยวกลับมาเต่งตึง เสริมหน้าอก ทำให้เส้นผมดกดำ และบำรุงเลือด จากรายงานการศึกษาพบว่าหัวกวาวเครือขาวมีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) โดยแบ่งเป็นกลุ่ม chromene ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol (Chansakaow *et al.*, 2000a) (รูปที่ 1) กลุ่ม isoflavones glycosides ได้แก่ puerarin, daidzin และ genistin กลุ่ม isoflavones ได้แก่ daidzein และ genistein (Chansakaow *et al.*, 2000b) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจนจากพืช โดยสารในกลุ่ม chromene เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่พบปริมาณน้อยในธรรมชาติ (0.002-0.004%) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสารสกัดกวาวเครือขาวพบว่ามีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง (Chansakaew *et al.*, 2000a, 2000b; Trisomboon *et al.*, 2006; Cherdshewasart *et al.*, 2007a; Cherdshewasart *et al.*, 2008) โดยมีผลในการป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนูที่ตัดรังไข่ (Urasopon *et al.*, 2008) โดยมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง (Chandeying, Lamlertkittikul, 2007; Manonai *et al.*, 2008)

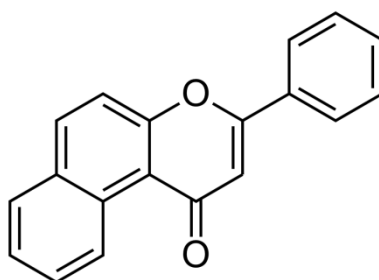


รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของไมโรเอสทรอล (miroestrol)

ดังนั้น จึงทำการศึกษากัดแยกสารกลุ่ม chromenes ได้แก่ ไมโรเอสทรอล (miroestrol) และดีออกซีไมโรเอสทรอล (deoxymiroestrol) เพื่อใช้ในการศึกษาศักยภาพของสารทั้งสองต่อลักษณะทางกายภาพของ reproductive organs และการเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 มีรายงานการศึกษาผลของสารไมโรเอสทรอลต่อลักษณะทางกายภาพของ reproductive organs ครั้งแรกในหนูแรทเพศเมีย พบว่า ไมโร

เอสโตรอลทำให้น้ำหนักของมดลูกเพิ่มขึ้น และเพิ่มการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อช่องคลอดและปริมาณของเหลวในช่องคลอดและแสดงผล mammogenic effect ในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่ (Pope et al., 1958; Benson et al., 1961) ส่วนในหนูเมาส์เพศผู้พบว่าการได้รับสารสกัดจาก *P. mirifica* ในระยะยาวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักอวัยวะ จำนวนอสุจิ และระดับฮอร์โมนเพศ ทั้ง LH, FSH และเทสโทสเตอโรน และไม่พบความผิดปกติจากการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (Jaroenporn et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของสารบริสุทธิ์ไมโรเอสโตรอลในเพศผู้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจให้ผลที่แตกต่างจากสารสกัดหยาบที่ประกอบด้วยสารหลายชนิดในสัดส่วนที่ต่างกันในขณะเดียวกันก็ยังไม่มียางานการศึกษาผลของสารบริสุทธิ์ชนิดนี้ต่อการควบคุมยีนต่างๆ ในวิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับสารก่อมะเร็ง ซึ่งมีปฏิกิริยาอยู่โดยทั่วไปในสภาพแวดล้อมและง่ายต่อการสัมผัสในสภาพการดำรงชีวิตปัจจุบัน จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาลงต่อไป

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ซับแฟมิลี 1A (CYP1A) ได้แก่ CYP1A1 และ CYP1A2 มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นสารก่อมะเร็ง (carcinogen bioactivity) โดยเฉพาะสารก่อมะเร็งจำพวกไดออกซิน (dioxin) (Moorthy et al., 2007) และสามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดยสารก่อมะเร็งหลายชนิด อาทิเช่น benzo[a]pyrene (B[a]P), beta-naphthoflavone (β -NF; รูปที่ 2) และ TCDD เป็นต้น นอกจากนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนเอสโตรเจน และการแสดงออกของเอนไซม์ CYP1A พบว่าเอสตราไดออล (estradiol) และเอสตรีออล (estriol) มีศักยภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Cyp1a* ได้ (Elskus, 2004; Navas and Segner, 2001) ดังนั้น การศึกษาผลของไมโรเอสโตรอลต่อการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเบต้าแนฟโทฟลาโวน จึงเป็นอีกหนทางหนึ่งที่ทำให้สามารถบ่งชี้ฤทธิ์ทางชีวภาพของไมโรเอสโตรอลในการเสริมฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากเคมี (chemopreventive phytoestrogen) นอกเหนือจากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับ phytoestrogenic activity อันจะเป็นประโยชน์ทางอ้อมของสารนี้ในการยับยั้งกลไกการกระตุ้นการเกิดมะเร็งโดยผ่านวิถีของเอนไซม์ CYP1A ซับแฟมิลี (Jarukamjorn et al., 2006; Chen et al, 2006) ตามลำดับ



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของเบต้าแนฟโทฟลาโวน (beta-naphthoflavone)

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ซับแฟมิลี 2B (CYP2B) มีหน้าที่สำคัญในการแปลงรูปทางชีวภาพสารกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมน และมีการแสดงออกที่ต่างกันระหว่างเพศ (sexual dimorphic expression) โดยในหนู

ไม้พืชมะเขี๋ยมีการแสดงออกที่สูงกว่าพืชผู้ (Jarukamjorn et al., 1999; Jarukamjorn et al., 2001; Nemoto and Sakurai, 1995) นอกจากนี้ CYP2B9 ยังสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยฮอร์โมนเพศหญิง เอสตราไดออล (estradiol) (Jarukamjorn et al., 2000) และการแสดงออกของ CYP2B9 ในพืชมะเขี๋ยเต็มวัย จำเป็นต้องอาศัยฮอร์โมนเอสโตรเจนในการกระตุ้น (Yamada et al., 2003) ดังนั้น CYP2B9 จึงเป็นไอโซฟอร์มที่สำคัญในการบ่งชี้ศักยภาพทางชีวภาพหนึ่งยีน phytoestrogenic activity (Jarukamjorn et al., 1999)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของไมโรเอสโตรลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ reproductive organs ในหนูเมาส์เพศเมีย ตลอดจนน้ำหนักตัวและพฤติกรรมตามธรรมชาติทั่วไปที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไมโรเอสโตรลเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวน
2. เพื่อศึกษาศักยภาพของไมโรเอสโตรลในการต้านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้องโดยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวนในหนูเมาส์

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาศักยภาพของไมโรเอสโตรลในการต้านการเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1 เอ 1 โดยสารก่อมะเร็งแบบในกาย โดยการฉีดสารไมโรเอสโตรล และ/หรือสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวน ให้หนูเมาส์เพศเมีย เข้าทางใต้ผิวหนัง วันละครั้ง ทุกวันติดต่อกัน ตามขนาดและระยะเวลาที่กำหนด เมื่อครบกำหนดการบริหารยาทำการสับหนูไม่ซ้ วัดขนาดและชั่งน้ำหนักอวัยวะที่เกี่ยวข้องตลอดจนแยกตับออกมาเพื่อการสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) จากเซลล์ตับ แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทุกตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้อง โดยเทคนิค Real time RT-PCR ต่อแทคแมนโพรบ (TaqMan[®] probe) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ศึกษา ได้แก่ *Cyp1a1*, *Cyp1a2* และ *Gapdh* ผลการแสดงออกของยีนดังกล่าวที่ระดับทรานสคริปชันจะแสดงเป็นค่าการแสดงออกสัมพัทธ์โดยการเปรียบเทียบกับค่าการแสดงออกของ housekeeping gene *Gapdh* ที่ระดับทรานสคริปชันของตัวอย่างเดียวกัน ผลของไมโรเอสโตรลต่อการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* จะถูกประเมินการแสดงออกของยีนดังกล่าวทั้งในภาวะปกติเปรียบเทียบกับภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวน เพื่อประเมินศักยภาพทางชีวภาพของไมโรเอสโตรลในการเป็นเอสโตรเจนจากพืชที่มีฤทธิ์เสริมในการปกป้องเซลล์จากเคมี (chemopreventive phytoestrogen)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบผลของไมโรเอสโตรลต่อลักษณะทางกายภาพของ reproductive organs ตลอดจนน้ำหนักตัวและพฤติกรรมในหนูเมาส์เพศเมียที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารก่อมะเร็งต้นแบบ เปรียบเทียบกับเอสตราไดออล เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ในการแพทย์ทางเลือก การกำหนดข้อควรระวัง คำเตือน หรือข้อบ่งใช้ในผลิตภัณฑ์กาวเครือขาวและผลิตภัณฑ์ที่มีกาวเครือขาวส่วนประกอบ
2. ทำให้ทราบระดับศักยภาพของไมโรเอสโตรลในการเป็นเอสโตรเจนจากพืชที่มีฤทธิ์เสริมในการปกป้องเซลล์จากเคมี (chemopreventive phytoestrogen) นอกเหนือจากศักยภาพในการเป็นเอสโตรเจนจากพืชเพื่อทดแทนฮอร์โมนเพศ (hormone supplement) ของไมโรเอสโตรล
3. ทำให้ทราบว่าไมโรเอสโตรล มีศักยภาพสูงเพียงใดในการพัฒนาเป็นยาต่อไป เพื่อลดการนำเข้ายาหรือวัตถุดิบจากต่างประเทศ

ระเบียบวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยและแหล่งที่มาของสารเคมี

สารเคมี	ที่มา
Authentic standard of miroestrol	รศ.ดร.ชัยโย ชัยชาญทิพย์ยุทธ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Estradiol benzoate	Schering (Kenilworth, NJ, USA)
Beta-naphthoflavone	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
Corn oil	
Trizol [®]	Invitrogen [®] (Carlsbad, CA, USA)
Taq DNA polymerase	
dNTP mixture	
SYBR [®] dye	
100 bp DNA ladder	
RevertraAce [®]	Toyobo [®] (Osaka, Japan)
Random hexamers	Takara [®] (Tokyo, Japan)
RNase inhibitor	
Forward and Reverse primers for <i>Cyp1a1</i> and <i>Gapdh</i>	Bio Basic, Inc. (Markham, Ontario, Canada)
Specific TaqMan gene expression assay (Inventoried) for <i>Cyp1a2</i>	Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA)
Specific TaqMan [®] Gene Expression Detection kit for <i>Cyp1a1</i>	Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA)
Novel juice	GeneDirex [®] (Daejeon, South Korea)

ตารางที่ 2 เครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการวิจัยและสถานที่ตั้งของเครื่องมือ

อุปกรณ์	สถานที่
Refrigerated centrifuge (Sigma [®] , St. Louis, MO)	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu [®] , Osaka, Japan)	
Horizontal electrophoresis apparatus (Mupid [®])	
Freezer (Sharp [®] , Bangkok, Thailand)	
Syngene [®] gel documentation and GeneTool match program (InGenius L, Cambridge, UK)	
ABI Prism [®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with ABI Prism [®] 7500 SDS software	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การศึกษาแบบในกาย (Animal experiment)

หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล อ. ศาลายา จ.นครปฐม เลี้ยงในกรงพลาสติกโปร่งแสงชนิดโพลิสโพร (จำนวน 5 ตัวต่อกรง) ให้ได้รับอาหารและน้ำดื่มอย่างพอเพียง อุณหภูมิของห้องเลี้ยงปรับไว้ที่ 23 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $45 \pm 2\%$ วงจรแสงสว่างมืด 12 ชม./สว่าง 12 ชม. เป็นเวลา 7 วัน ก่อนเริ่มการทดลองเพื่อให้สัตว์ทดลองได้ปรับสภาพร่างกายเข้ากับห้องเลี้ยงจนเข้าสู่สภาวะปกติ ระเบียบวิธีวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองตลอดโครงการฯ ได้รับการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสอนุมัติ AEKKU27/2553 และการดำเนินการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองตลอดโครงการฯ อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของสัตวแพทย์ประจำศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หนูเมาส์เพศเมียแบ่งโดยการสุ่มออกเป็น 8 กลุ่ม ให้ได้รับสารดังต่อไปนี้ เอสตราไดออล (estradiol หรือ ES) ขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน หรือ ไมโรเอสโทรล (miroestrol หรือ Miro) ขนาด 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน หรือได้รับร่วมกับเบต้าแนฟโทฟลาวอน (Beta-naphthoflavone หรือ BNF) ขนาด 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 3 วัน หรือน้ำมันข้าวโพด (corn oil) ปริมาตร 0.1 มล./ตัว/วัน โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

24 ชั่วโมงหลังการให้สารต่างๆ ข้างต้นครั้งสุดท้าย หนูเมาส์ทั้งหมดจะถูกสลบด้วย Nembutol® ในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และทดสอบระดับของการสลบที่เหมาะสมโดยเทคนิค pedal reflex ก่อนการผ่าซาก (perfusion) สารละลายไปแตสเซียมคลอไรด์ (1.15%) ผ่านเส้นเลือด portal vein เพื่อล้างเลือดออกจากร่างกาย จากนั้นแยกตับออกไปเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียสทันที เพื่อสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ต่อไป

การศึกษาพฤติกรรมและลักษณะทางกายภาพของสัตว์ทดลองตลอดจนอวัยวะที่เกี่ยวข้อง

การบันทึกพฤติกรรมของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารชนิดต่างๆ ตลอดจนน้ำหนักตั้งแต่ก่อนเริ่มการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง และทำการบันทึกขนาดของ uterus เมื่อสิ้นสุดการทดลองด้วย

การสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) จากเซลล์ตับหนูเมาส์

การเตรียมอาร์เอ็นเอทั้งหมด โดยการบดตัวอย่างตับ ปริมาณ 1-2 กรัม ในสารละลาย Trizol® ในไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. ด้วย Hand homogenizer เติมสารละลายคลอโรฟอร์มและเขย่าอย่างแรง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูเฉพาะส่วนใสด้านล่างใสไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. อันใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยไอโซโพรพานอล จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งก่อนล้าง

ตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 80% เอทานอล จากนั้นผึ่งตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง ก่อนละลายอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจากอาร์เอ็นเอส (RNase) และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้น ก่อนนำไปตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสคริปชันต่อไป

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอทั้งหมด

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ โดยการเจือจางอาร์เอ็นเอ 2 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่น ปราศจากอาร์เอ็นเอส 98 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อนำมาคำนวณอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตร ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 1.8 ตัวอย่างอาร์เอ็นเอนั้นจึงจะมีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสคริปชัน ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ต่อไป

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดย Abs_{260} เท่ากับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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

การแสดงออกของ mRNA ที่ระดับทรานสคริปชันโดยการเปลี่ยน Total RNA เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ ReverTraAce[®] ก่อนทำการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจศึกษา ได้แก่ *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ specific TaqMan[®] Gene Expression Assays (Inventoried) สำหรับ *Cyp1a2* และ specific TaqMan[®] Gene Expression Detection kit สำหรับ *Cyp1a1* โดยมีลำดับฟอร์เวอร์สและรีเวอร์สไพร์เมอร์ และไพรเมอร์ ตามลำดับ ดังนี้ 5'-GAC ATT TGA GAA GGG CCA CAT C-3', 5'-CCA AAG AGG TCC AAA ACA ATC G-3', และ 5'-FAM-CGA GAA TGC CAA TGT CCA GCT GTC A-TAMRA-3' และใช้ SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) สำหรับ *Gapdh* โดยมีลำดับฟอร์เวอร์สและรีเวอร์สไพร์เมอร์ ตามลำดับ ดังนี้ 5'-TCC ACT CAC GGC AAA TTC AAC G-3' และ 5'-TAG ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3'

การแสดงออกของยีน *Cyp1a1* หรือ *Cyp1a2* ที่ระดับทรานสคริปชัน แสดงเป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกสัมพันธ์ระหว่างยีนที่ศึกษากับ house-keeping gene *Gapdh* จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอเดียวกันจากปฏิกิริยาเดียวกัน

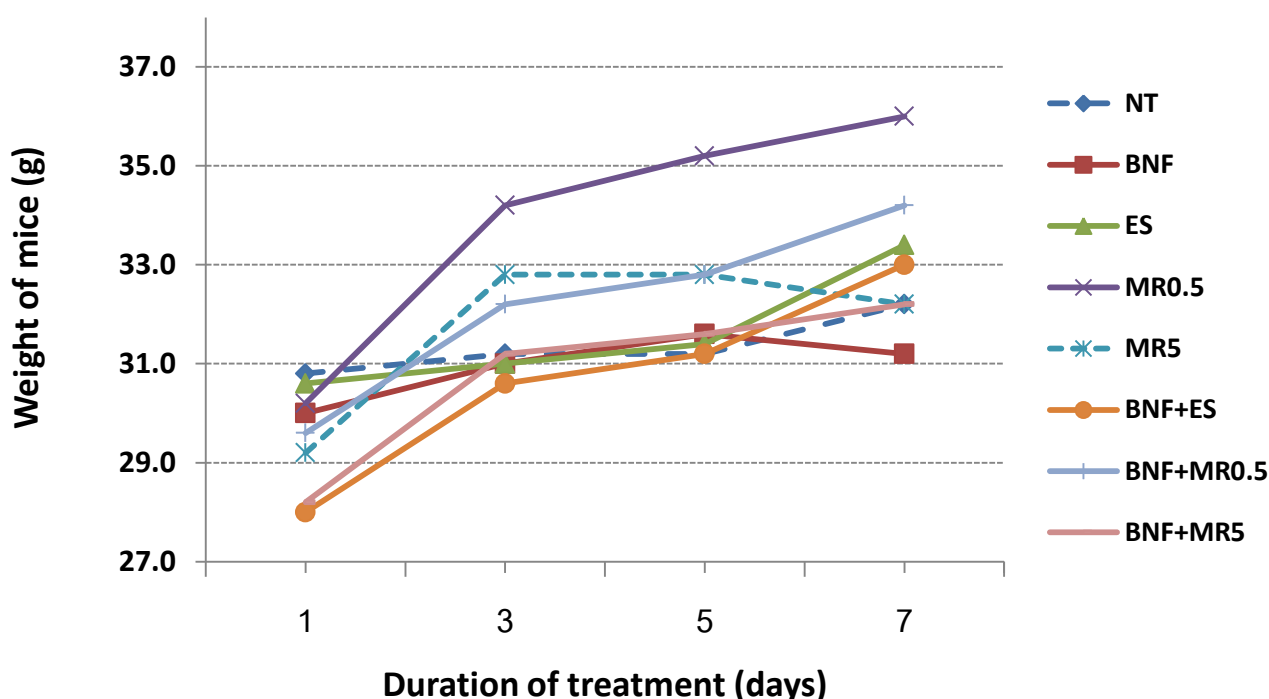
การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองจากแต่ละกลุ่ม (n=3-5) จะถูกวิเคราะห์และแสดงผลในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ก่อนการทดสอบความแตกต่างทางสถิติภายในกลุ่มทดลองด้วย ANOVA และระหว่างกลุ่มทดลองด้วย Tukey post hoc test ค่าความแตกต่างทางสถิติที่มากกว่า 0.5 ($p < 0.05$) จะถูกรายงานผลเป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

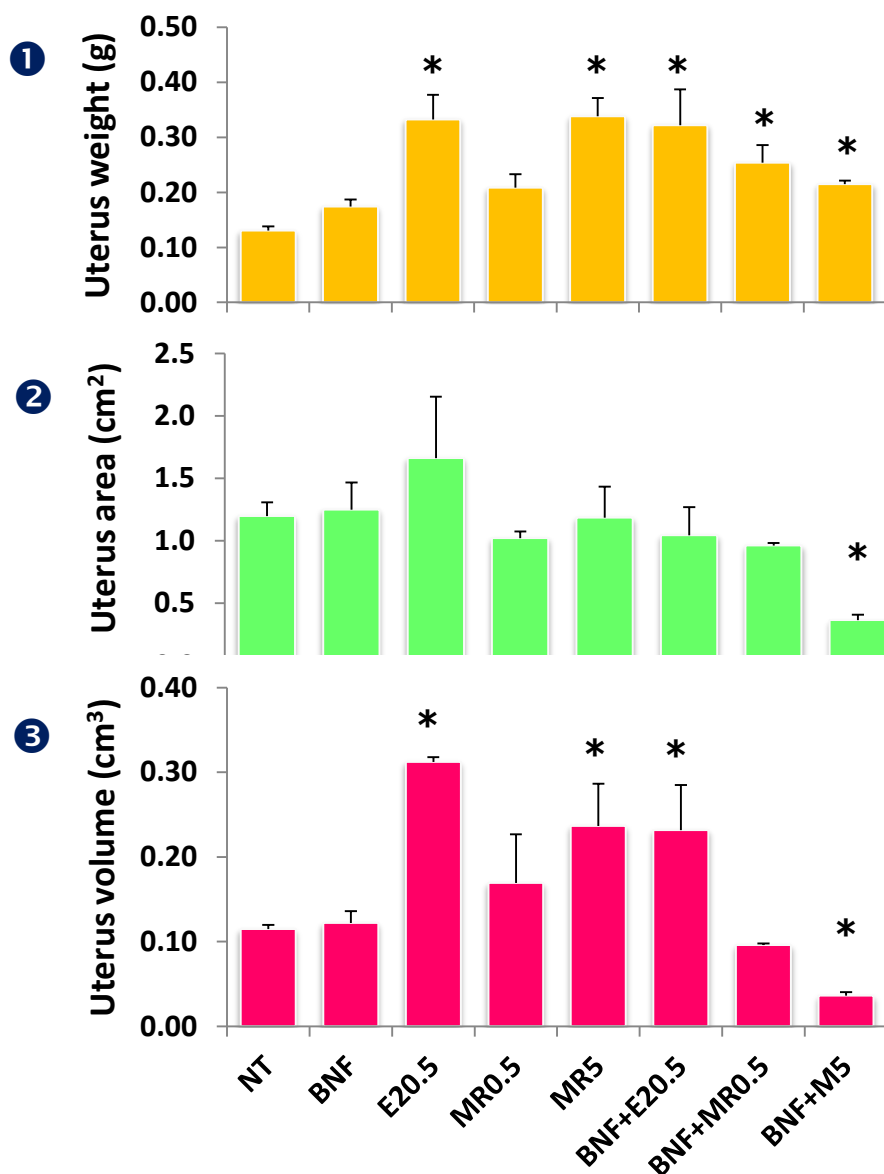
พฤติกรรมและลักษณะทางกายภาพภายนอกของสัตว์ทดลอง

การได้รับเบต้าแนฟโทฟลาโวน (BNF) ขนาด 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน หรือ เอสตราไดออล (ES) ขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน หรือ ไมโรเอสทอรอล (MR) ขนาด 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน หรือการได้รับ BNF ร่วมกับ ES, MR0.5 หรือ MR5 หรือ น้ำมันข้าวโพด (corn oil) วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและลักษณะภายนอกทั่วไประหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์น้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่มระหว่างการได้รับสารทดสอบพบแนวโน้มการมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มมากขึ้นที่สอดคล้องกันระหว่างกลุ่มทดสอบต่างๆ ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับเบต้าแนฟโทฟลาโวนหรือไมโรเอสทอรอลขนาดสูงที่พบแนวโน้มการมีน้ำหนักตัวที่ลดลง อย่างไรก็ตามไม่ปรากฏความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลองทั้งหมด (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงโปรไฟล์ของน้ำหนักหนูเม้าส์ระหว่างการได้รับสารทดสอบต่างๆ
NT, กลุ่มที่ได้รับน้ำมันข้าวโพด; BNF, กลุ่มที่ได้รับเบต้าแนฟโทฟลาโวน; ES, กลุ่มที่ได้รับเอสตราไดออล;
MR, กลุ่มที่ได้รับไมโรเอสทอรอล

การได้รับไมโรเอสโตรเจนขนาดสูงมีผลให้น้ำหนัก (รูปที่ 4.1) และปริมาตร (รูปที่ 4.3) ของ uterus ของหนูเมาส์เพิ่มขึ้นได้เทียบเท่ากับการได้รับเอสตราไดอล โดยแตกต่างจากหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่การได้รับสารทดสอบทุกประเภทไม่มีผลต่อพื้นที่ของ uterus อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4 แสดงน้ำหนักและขนาดของ uterus ของหนูเมาส์หลังได้รับสารทดสอบต่างๆ NT, กลุ่มที่ได้รับน้ำมันข้าวโพด; BNF, กลุ่มที่ได้รับเบต้าแนฟโทฟลาโวน; ES, กลุ่มที่ได้รับเอสตราไดอล; MR, กลุ่มที่ได้รับไมโรเอสโตรเจน; * $p < 0.05$

การสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ตับหนูเมาส์และการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมด

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมด พบว่าตัวอย่างทั้ง 24 ตัวอย่าง มีความบริสุทธิ์สูงมากเพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสคริปชัน ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

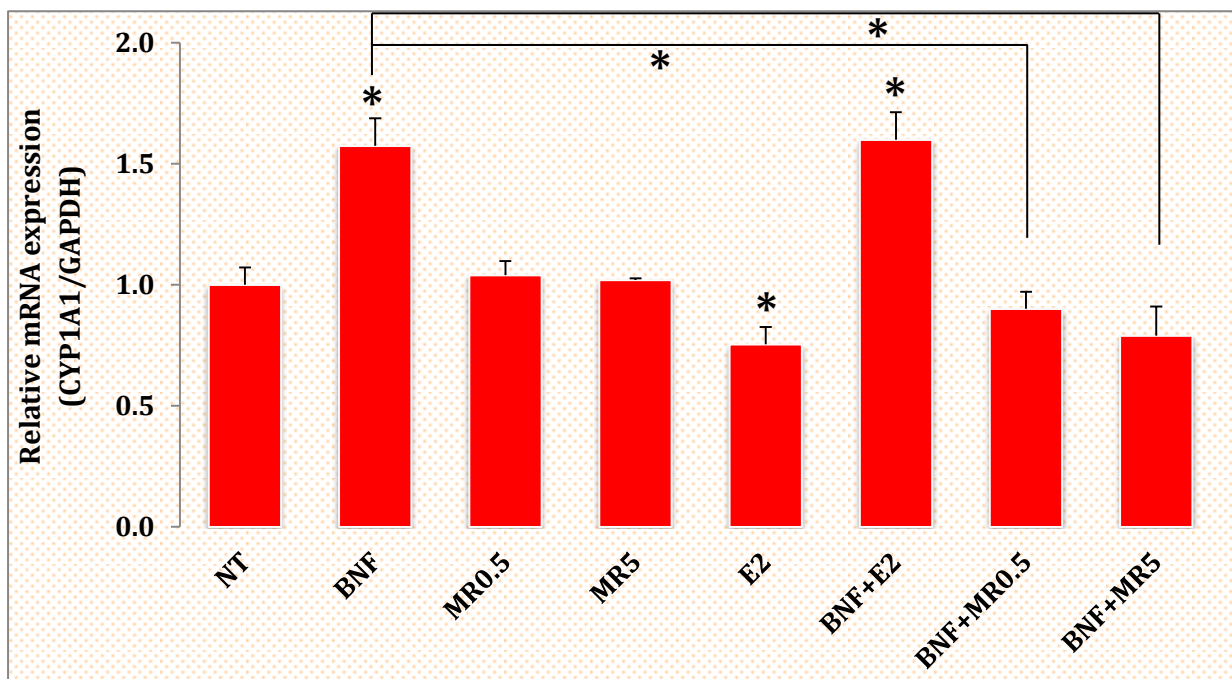
ลำดับที่	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)
		UV260/280	UV260/230	
1	NT-1	1.90	1.94	8417.55
2	NT-2	1.95	2.03	7637.68
3	NT-2	1.95	2.04	7418.95
4	BNF-1	1.95	2.05	7429.23
5	BNF-2	1.87	1.94	8655.50
6	BNF-3	1.96	2.13	6923.08
7	E2-1	1.71	1.77	9584.60
8	E2-2	2.01	2.12	4711.13
9	E2-3	1.98	1.98	6791.13
10	MR0.5-1	1.88	1.96	8521.58
11	MR0.5-2	1.77	1.92	9187.00
12	MR0.5-3	1.89	2.05	8247.08
13	MR5-1	1.91	2.12	7855.33
14	MR5-2	1.94	2.15	7607.40
15	MR5-3	1.95	2.14	7321.78

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)
		UV260/280	UV260/230	
16	BNF+E2-1	1.93	2.07	7837.80
17	BNF+E2-2	1.87	1.94	8637.58
18	BNF+E2-3	1.92	2.03	7809.90
19	BNF+MR0.5-1	1.95	2.17	6298.40
20	BNF+MR0.5-2	1.86	2.01	8639.60
21	BNF+MR0.5-3	1.92	2.11	7652.75
22	BNF+MR5-1	1.90	2.12	8176.88
23	BNF+MR5-2	1.89	2.05	7995.23
24	BNF+MR5-3	1.86	2.02	8715.38

หมายเหตุ. NT, กลุ่มที่ได้รับน้ำมันข้าวโพด; BNF, กลุ่มที่ได้รับเบต้าแนฟโทฟลาโวน; ES, กลุ่มที่ได้รับเอสตราไดออล; MR, กลุ่มที่ได้รับไมโรเอสทรอล

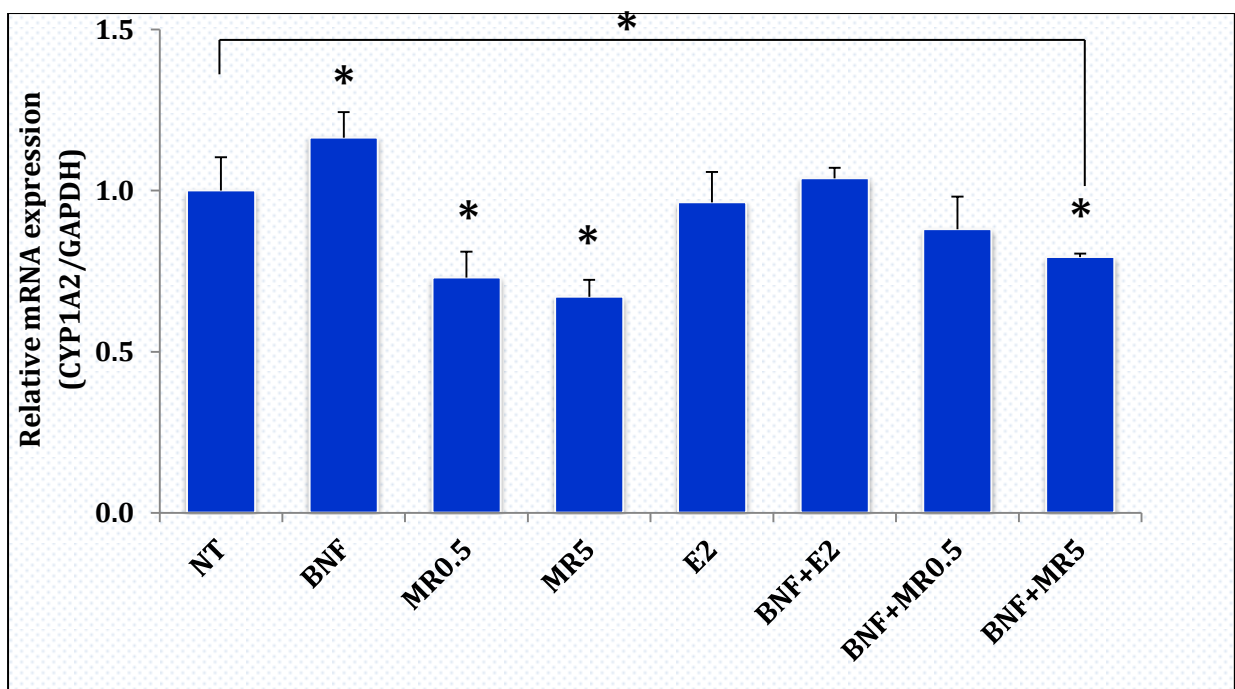
การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ที่ระดับทรานสคริปชันโดยเทคนิค Real time RT-PCR

จากการวิเคราะห์การแสดงออกสัมพันธ์ของยีน *Cyp1a1* ต่อ *Gapdh* ในต้นหนูเม้าส์พบว่า เบต้าแนฟโทฟลาโวน (BNF) มีผลเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *Cyp1a1* ให้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (Chatuphonprasert et al., 2011) ส่วนเอสตราไดออล (E2) มีผลลดการทำงานของยีน *Cyp1a1* แต่ในสภาวะที่ได้รับ BNF ร่วมกับ E2 กลับไม่พบการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* ที่ลดลง ในขณะที่ไมโรเอสโทรล (MR) นอกจากจะไม่แสดงผลรบกวนการแสดงออกของยีนนี้แล้ว การได้รับร่วมกับ BNF ยังให้ผลลดการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย BNF ให้ลดลงจนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการแสดงออกของยีนนี้ในสภาวะปกติได้ แต่ยังไม่พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับขนาดของ MR ที่ได้รับ



รูปที่ 5 การแสดงออกสัมพันธ์ของยีน *Cyp1a1* ต่อ *Gapdh* ที่ระดับทรานสคริปชันในต้นหนูเม้าส์ NT, กลุ่มที่ได้รับน้ำมันข้าวโพด; BNF, กลุ่มที่ได้รับเบต้าแนฟโทฟลาโวน; ES, กลุ่มที่ได้รับเอสตราไดออล; MR, กลุ่มที่ได้รับไมโรเอสโทรล; * $p < 0.05$

ส่วนการวิเคราะห์การแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *Cyp1a2* ต่อ *Gapdh* ในตับหนูเมาส์พบว่า BNF มีผลเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *Cyp1a2* ให้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 6) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Chatuphonprasert et al., 2011) ส่วน E2 ไม่แสดงผลการทำงานของยีน *Cyp1a2* ทั้งในสภาวะที่ได้รับเพียง E2 และการได้รับร่วมกับ BNF ในขณะที่ MR นอกจากจะสามารถลดการแสดงออกของยีน *Cyp1a2* ได้แล้ว การได้รับ MR ร่วมกับ BNF ยังให้ผลลดการแสดงออกของยีน *Cyp1a2* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย BNF ให้ลดลงจนไม่แตกต่างหรือต่ำกว่าระดับการแสดงออกของยีนนี้ในสภาวะปกติได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับขนาดของ MR ที่ได้รับด้วย



รูปที่ 6 การแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *Cyp1a2* ต่อ *Gapdh* ที่ระดับทรานสคริปชันในตับหนูเมาส์ NT, กลุ่มที่ได้รับน้ำมันข้าวโพด; BNF, กลุ่มที่ได้รับเบต้าแนฟโทฟลาโวน; E2, กลุ่มที่ได้รับเอสตราไดออล; MR, กลุ่มที่ได้รับไมโรเอสทรอล; * $p < 0.05$

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ยืนยันศักยภาพในการเป็นไฟโตเอสโตรเจนของไมโรเอสทรอลจากกวาวเครือขาว โดยการเพิ่มขนาดและน้ำหนักของ uterus ของหนูเมาส์เพศเมียได้เทียบเท่ากับเอสตราไดออลในปริมาณและระยะเวลาที่เท่ากันสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโรเอสทรอลสามารถลดการแสดงออกของยีน *Cyp1a2* ในตับหนูเมาส์ได้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าไมโรเอสทรอลมีผลในการลดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A2 ในตับหนูเมาส์ ยิ่งไปกว่านั้น การศึกษานี้พบว่า ไมโรเอสทรอลมีศักยภาพในการลดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* จากเบต้าแนฟโทฟลาโวนได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งยีนทั้งสองนี้มีความเกี่ยวข้อง/สัมพันธ์กับวิถีการเมแทบอลิซึมของสารก่อมะเร็งจำพวกโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) ดังนั้น เพื่อเป็นการสนับสนุนข้อดีของไมโรเอสทรอลที่เหนือกว่าเอสตราไดออลในแง่ผลกระทบต่อกลไกการแปลงรูปของสารทางชีวภาพ กรณีหวังผลการเป็นฮอร์โมนทดแทน (hormone replacement therapy) การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นต่อยอดศึกษาศักยภาพของไมโรเอสทรอลในการต้านการเกิดมะเร็งที่มีความสัมพันธ์กับวิถีเมแทบอลิซึมของฮอร์โมนเอสโตรเจนในตับหนูเมาส์เพศเมีย

จากการศึกษานี้พบว่าไมโรเอสทรอลไม่มีผลต่อพฤติกรรมและลักษณะภายนอกทั่วไป ตลอดจนน้ำหนักตัวของหนูเมาส์ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากเอสตราไดออลในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทฟลาโวน แต่เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่พบว่าไมโรเอสทรอลสามารถลดการแสดงออกของยีน *Cyp1a2* ในตับหนูเมาส์ในสภาวะปกติและการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ในตับหนูเมาส์ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทฟลาโวนได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เอสตราไดออลไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสองในเชิงบวกเช่นนี้ ซึ่งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่หลักในการแปลงรูปสารก่อมะเร็งจำพวกที่พบได้ทั่วไปในชีวิตประจำวัน ได้แก่ ควินจากเครื่องยนต์ บุหรี่ อาหารปิ้งย่าง หรือมลพิษในสภาวะแวดล้อม ไปเป็นสารก่อมะเร็งที่มีฤทธิ์ (active carcinogen) นอกจากนี้แล้ว จากการศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบว่า ไมโรเอสทรอลไม่มีผลรบกวนสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2B9/10 ในตับหนูเมาส์ที่แตกต่างจากเอสตราไดออลทั้งในสภาวะปกติและที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทฟลาโวน จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนข้อดีของการใช้ไมโรเอสทรอลในการแพทย์ทางเลือกที่เหนือกว่าเอสตราไดออล ในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งผ่านกลไกการแปลงรูปทางชีวภาพของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

กล่าวโดยสรุป ไมโรเอสโตรลจากกวาวเครือขาว เป็นไฟโตเอสโตรเจนที่มีผลกระทบต่อระบบการแปลงรูปของสารทางชีวภาพในตับหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวน โดยมีศักยภาพในการลดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* จากเบต้าแนฟโทฟลาโวนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งต้นแบบได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นข้อดีที่แตกต่างจากเอสตราไดออลที่ไม่พบการแสดงผลในเชิงบวกในลักษณะนี้ ในขณะที่ไมโรเอสโตรลมีศักยภาพในการเป็นไฟโตเอสโตรเจนโดยการเพิ่มขนาดและน้ำหนักของ uterus ของหนูเมาส์เพศเมียได้เทียบเท่ากับเอสตราไดออลในปริมาณและระยะเวลาที่เท่ากัน เนื่องจากสถานการณ์ดำรงชีวิตในปัจจุบันที่มีอาจหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ ควั่นจากการประกอบอาหาร อาหารปิ้งย่าง หรือควั่นบุหรี่ยี่ห้อหรือท่อไอเสียเครื่องยนต์ หรือมลภาวะต่างๆ อันเป็นเหตุให้ยีน/เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 ได้รับการกระตุ้นอยู่โดยตลอดนั้น จึงจัดเป็นข้อได้เปรียบของการพิจารณาเลือกใช้กวาวเครือขาวหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีไมโรเอสโตรลเป็นส่วนประกอบในการแพทย์ทางเลือก ในลักษณะฮอร์โมนทดแทนในผู้มีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (menopausal syndromes) แทนการใช้เอสตราไดออลในการแพทย์แผนปัจจุบันได้ นอกจากนี้ยังเป็นการลดการสูญเสียดุลการค้าระหว่างประเทศจากการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และเป็นการส่งเสริมและเพิ่มมูลค่าแก่สินค้าเกษตรของประเทศไทยในทางอ้อม

เอกสารอ้างอิง

- มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช. (2547) เอกสารการสอนชุดวิชา เภสัชพฤกษศาสตร์(Pharmaceutical Botany). นนทบุรี: มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช.
- Benson GK, Cowie AT and Hosking ZD. (1961) Mamogenic activity of miroestrol. J Endocrinol 21: 401-409.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.
- Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR and Mayer RT. (1994) Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. Biochem Pharmacol 48(5): 923-936.
- Chandeying V and Lamlertkittikul S. (2007) Challenges in the conduct of Thai herbal scientific study: efficacy and safety of phytoestrogen, *Pueraria mirifica* (Kwao Keur Kao), phase I, in the alleviation of climacteric symptoms in perimenopausal women. J Med Assoc Thai 90(7): 1274-1280.
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okeda M, Higuchi Y, Kudo M and Chaichantipyuth. (2000a) Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. Planta Med. 66: 572-575.
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okeda M, Higuchi Y and Chaichantipyuth. (2000b) Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of “kwao keur”, *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. J Nat Prod 63(2): 173-175.
- Chatuphonprasert W, Remsungnen T, Nemoto N, Jarukamjorn. (2011) Different AhR binding sites of diterpenoid ligands from *Andrographis paniculata* caused differential CYP1A1 induction in primary culture in mouse hepatocytes. Toxicol In Vitro 25: 1757-1763.
- Chen L, Bondoc FY, Lee MJ, Hussin AH, Thomas PE and Yang CS. (1996) Caffeine induces cytochrome P4501A2: induction of CYP1A2 by tea in rats. Drug Metab Dispos 24: 529-533.
- Cherdshewasart W, Kitsamai Y and Malaivijitnond S. (2007) Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. J Reprod Dev 53(2):385-393.
- Cherdshewasart W and Sutjit W. (2008a) Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. Phytomedicine 15(1-2): 38-43.

- Cherdshewasart W, Traisup V and Picha P. (2008b) Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. *J Reprod Dev* 54(1):63-67.
- Elskus AA. (2004) Estradiol and estriol suppress CYP1A expression in rainbow trout primary hepatocytes. *Marine Environ Res* 58: 463–467.
- Gibson G. and Skett P. (1994) Introduction to drug metabolism. Blackie Academic and Professional, London, p. 217.
- Gonzalez FJ and Gelboin HV. (1994) Role of human cytochrome P-450 in the metabolic activation of chemical carcinogen and toxins. *Drug Metab Rev* 26: 165.
- Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, Cangini M, Pasini P, Minghetti A, Crespi-Perellino N, Mirasoli M, Cantelli-Forti and Paolini M. (2000) Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin Antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life Sci* 67: 2997–3006.
- Helsby NA, Chipman JK, Gescher A and Kerr D. (1998) Inhibition of Mouse and Human CYP 1A- and 2E1-dependent Substrate Metabolism by the Isoflavonoids Genistein and Equol. *Food Chem Toxicol* 36: 375-382.
- Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasirmit K, Trisomboon H, Watanabe G, Taya K and Cherdshewasart W. (2006) Effects of *Pueraria mirifica*, an Herb Containing Phytoestrogens, on Reproductive Organs and Fertility of Adult Male Mice. *Endocrine* 30: 93–101.
- Jarukamjorn K, Don-in K, Makejaruskul C, Laha T, Daodee S, Pearaksa P and Sripanidkulchai B (2006). Impact of *Andrographis paniculata* crude extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *J Ethnopharmacol* 105: 464–467.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J and Nemoto N. (1999) Different Regulation of the Expression of Mouse Hepatic Cytochrome P450 2B Enzymes by Glucocorticoid and Phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* 369: 89–99.
- Jarukamjorn K, Sakuma T and Nemoto N. (2000) Discriminating Activation of CYP2B9 Expression in Male C57BL/6 Mouse Liver by b-Estradiol. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 288–292.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Yamamotoa M, Oharaa A and Nemoto N. (2001) Sex-associated expression of mouse hepatic and renal CYP2B enzymes by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol* 62: 161-169.

- Lawanprasert S, Phivthong-ngam L, Srichairat S, Niwattisaiwong N, Charoenkul K. and Chaichantipyut C. (2006) Effects of *Pueraria mirifica* subchronic exposure on hepatic cytochrome P450 in rats fed with normal and highcholesterol diets. Thai J Pharmacol. **28**: 21-32.
- Manonai J, Chittacharoen A, Udomsubpayakul U, Theppisai H and Theppisai U. (2008) Effects and safety of *Pueraria mirifica* on lipid profiles and biochemical markers of bone turnover rates in healthy postmenopausal women. Menopause **15**(3): 530-535.
- Moorthy B, Muthiah K, Fazili IS, Kondraganti S., Wang L, Couroucli XI and Jiang W. (2007) 3-Methylcholanthrene elicits DNA adduct formation in the CYP1A1 promoter region and attenuates reporter gene expression in rat H4IIE cells. Biochem Biophys Res Commun **354**: 1071–1077.
- Navas JM and Segner H. (2001) Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. Chem Biol Interac **138**: 285-298.
- Nemoto N and Sakurai J. (1995) Glucocorticoid and sex hormone as activating or modulating factors for expression of Cyp2b-9 and Cyp2b-10 in mouse liver and hepatocytes. Arch Biochem Biophys **319**: 286-292.
- Omura T and Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem **239**: 2370-2378.
- Pope GS, Grundy HM, Jones HEH and Tait SAS. (1958) The estrogenic substance (miroestrol) from the tuberous root of *Pueraria mirifica*. J Endocrinol **17**: 15-16.
- Poulos T. (1995) Cytochrome P450. Curr Opin Struc Biol **5**: 767.
- Sakuma T, Ohtake M, Katsurayama Y, Jarukamjorn K. and Nemoto N. (1999) Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. Drug Metab Dispos **27**: 379-384.
- Trisomboon H, Malaivithnond S, Watanabe G, Cherdshewasart W and Taya K. (2006) The estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. Endocrine **29**(1): 129-134.
- Urasopan N, Hamada Y, Cherdshewasart W and Malaivijitnond S. (2008) Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. Maturitas. **59**(2): 137-148.
- Woof, TF. (1999) Handbook of drug metabolism. New York: Marcel Dekker, Inc.

Yamada H, Gohyama N, Honda S, Hara T, Harada N and Oguri K. (2002) Estrogen-dependent regulation of the expression of hepatic Cyp2b and 3a isoforms: Assessment using aromatase-deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 180: 1–10.