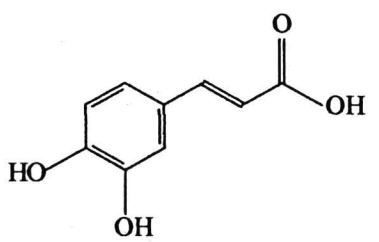
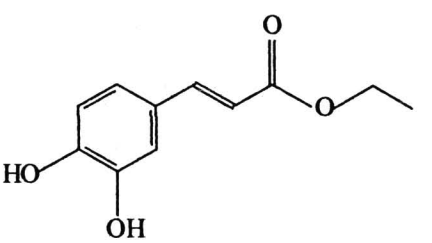
บทที่ 4

ผลการทดลอง

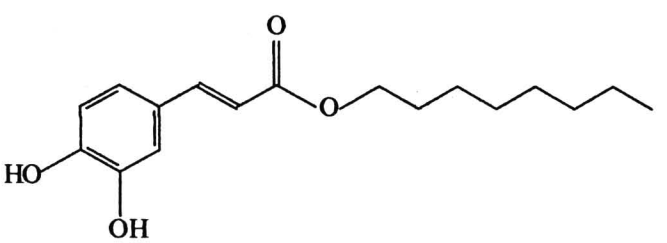
ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกพฤกษเคมีที่นำมาใช้คือ กรดคาเฟอิกและได้รับความอนุเคราะห์สาร อนุพันธ์ของกรดคาเฟอิกจากหน่วยวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อใช้ศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการเหนี่ยวนำการสร้างฮีมออกซีจีเนส-1 อนุพันธ์ที่ได้รับมา สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคืออนุพันธ์เอสเทอร์และอนุพันธ์เอไมด์และแต่ละกลุ่มเมื่อแบ่งตามชนิดของหมู่ที่เกาะแบ่งได้เป็นสารพวกอะโรมาติกและอะลิไซคลิก โครงสร้างสารแสดงดังรูปที่ 4.1



กรดคาเฟอิก

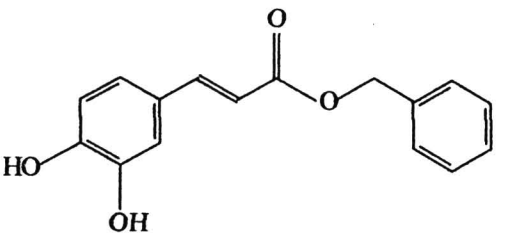


Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate (EAL)

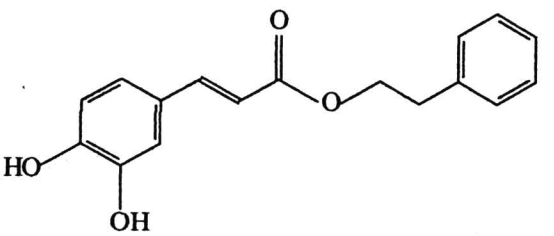


Octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate (OAL)

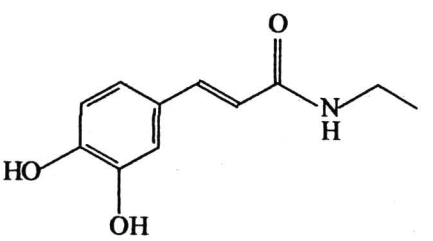
รูปที่ 4.1 โครงสร้างกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์



Phenylmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (BAL)

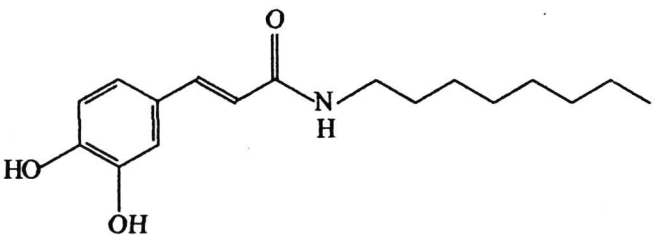


Phenylethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate (PAL)

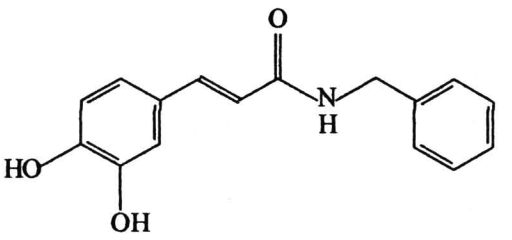


Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenamide (EAM)

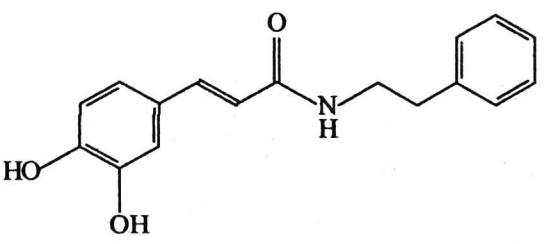
รูปที่ 4.1 โครงสร้างกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ (ต่อ)



Octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide (OAM)



Phenmethyl1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide (BAM)

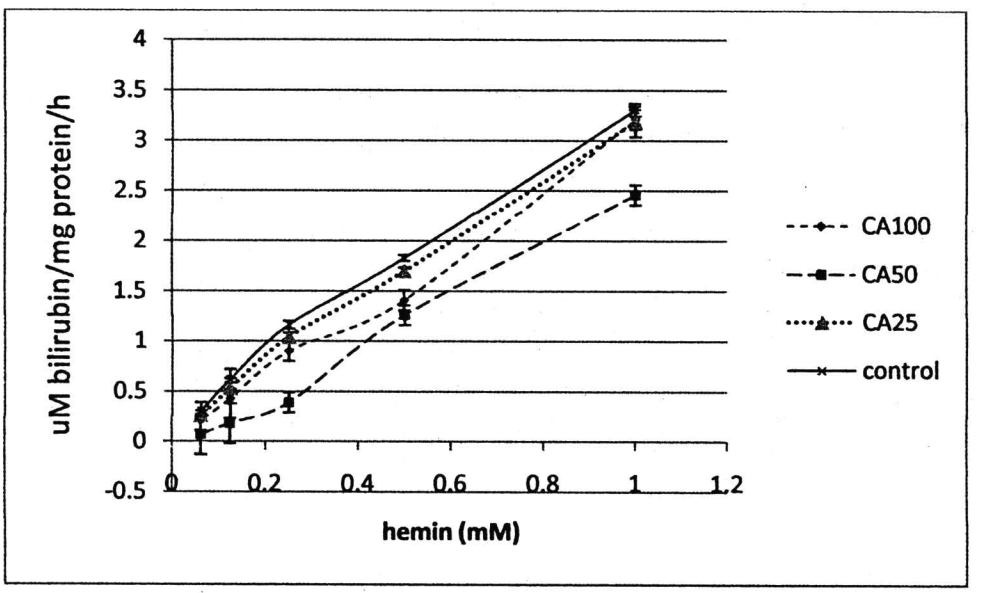


Phenethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide (PAM)

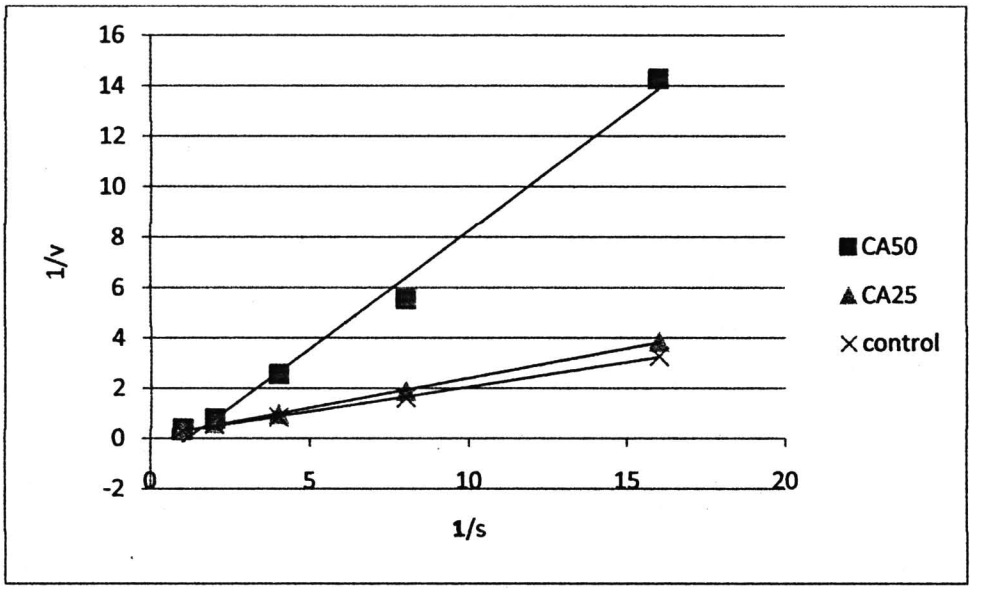
รูปที่ 4.1 โครงสร้างกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ (ต่อ)

4.1 การศึกษาผลของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อแอกติวิตีเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1 ในหลอดทดลอง

การทดลองในหลอดทดลองได้ใช้ตับหนูเป็นแหล่งเอนไซม์ทั้งฮีมออกซีจีเนส 1 และไบริเวอร์ดินรีดักเทส ใช้ความเข้มข้นของฮีมิน(hemin) ในช่วงความเข้มข้น 0.0625-1 mM ผลทดสอบฤทธิ์ของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ต่างๆนั้นยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส1 เนื่องจากแอกติวิตีของเอนไซม์นั้นต่ำกว่าแอกติวิตีของกลุ่มควบคุมเมื่อทดสอบโดยใช้กรดคาเฟอิกเข้มข้น 100 μg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้ 60.80% ฤทธิ์ทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.2 ก ผลพบว่ากรดคาเฟอิกนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์และเมื่อนำความเข้มข้นของสับสเตรตกับแอกติวิตีเอนไซม์มาเขียนความสัมพันธ์แบบ Lineweaver- Burk แล้วพิจารณารูปแบบการยับยั้งดังแสดงดังรูปที่ 4.2 ข พบว่ากลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์ ค่า Vmax มีค่าเท่ากับ 54.05 μM bilirubin/mg protein/ h ส่วนค่า Km มีค่า 15.91

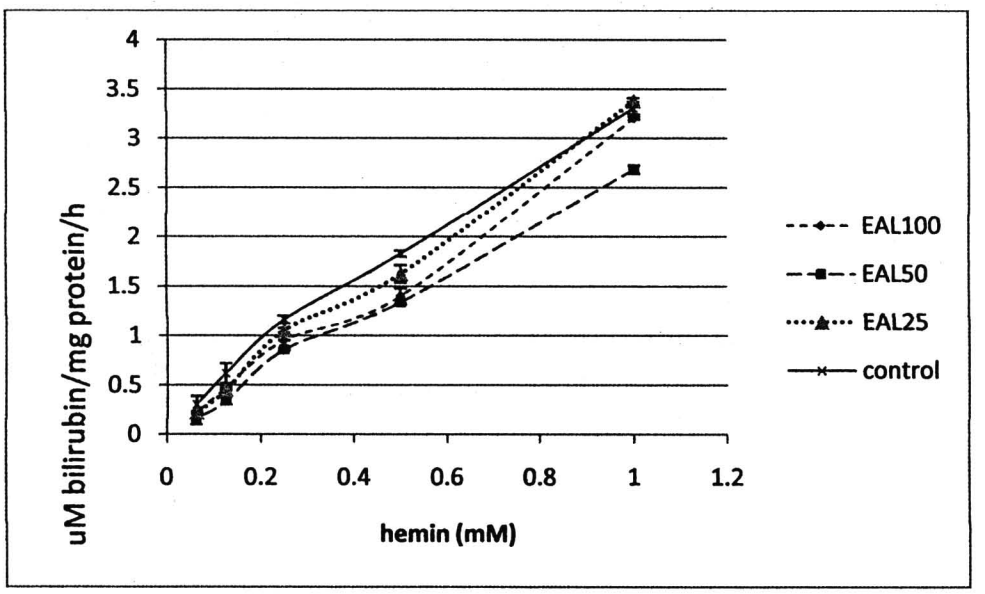


รูป 4.2 ก. แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของกรดคาเฟอิก

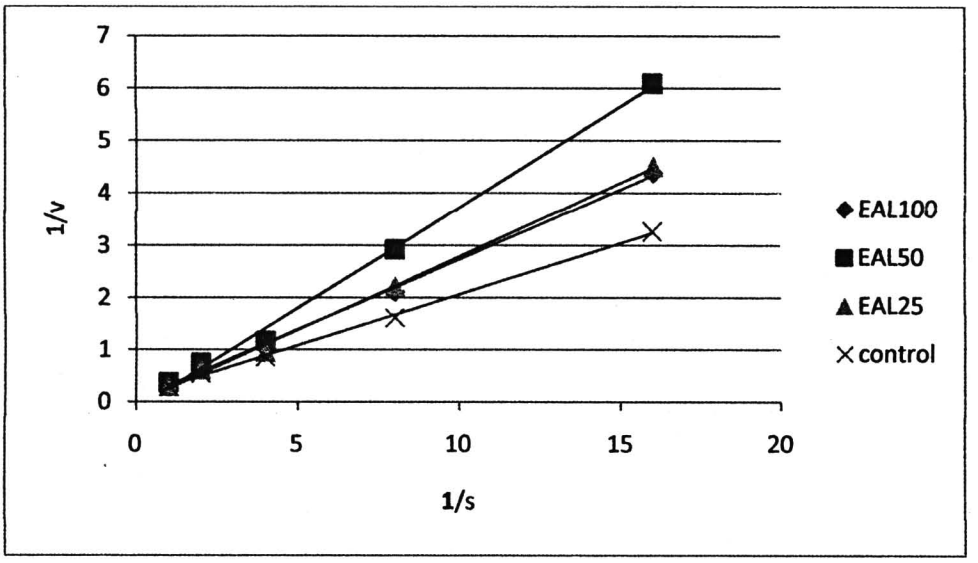


รูป 4.2 ข เส้น Lineweaver- Burk ของกรดคาเฟอิก

Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate หรือ ethyl caffeate (EAL)เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะลิฟาติกสายสั้นๆต่อกับโมเลกุลกรดคาเฟอิก นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1 แต่ยับยั้งได้ดีเท่า กรดคาเฟอิกเมื่อทดสอบโดยใช้ EAL เข้มข้น 100 μg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้ 60.80% แสดงดังรูปที่ 4.3 ก ส่วนกลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์ แสดงดังรูป 4.3 ข. ค่า Vmax มีค่าเท่ากับ 9.74 μM bilirubin/mg protein/ h ส่วนค่า Km มีค่า 1.92

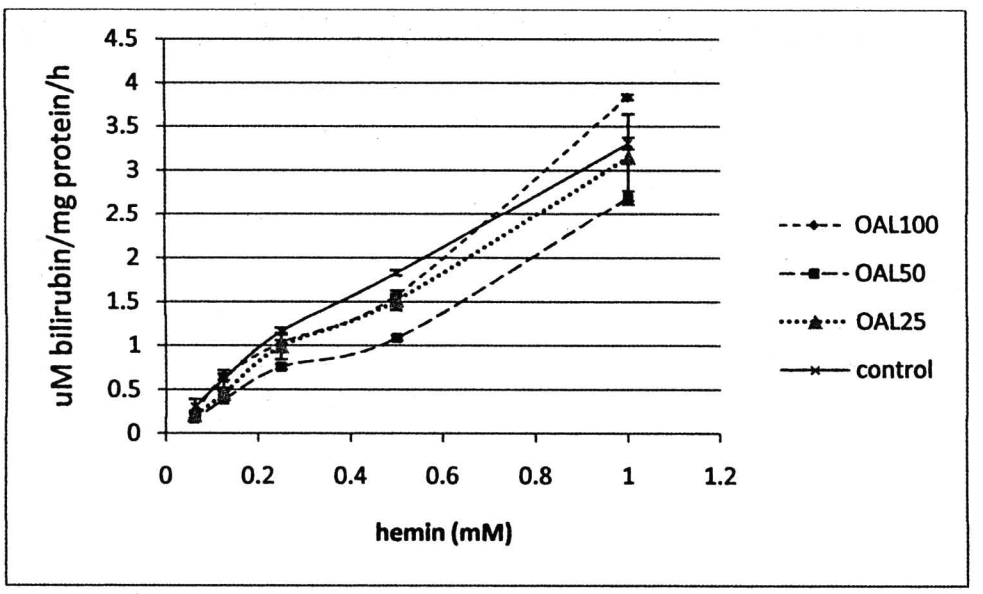


รูป 4.3 ก แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ EAL

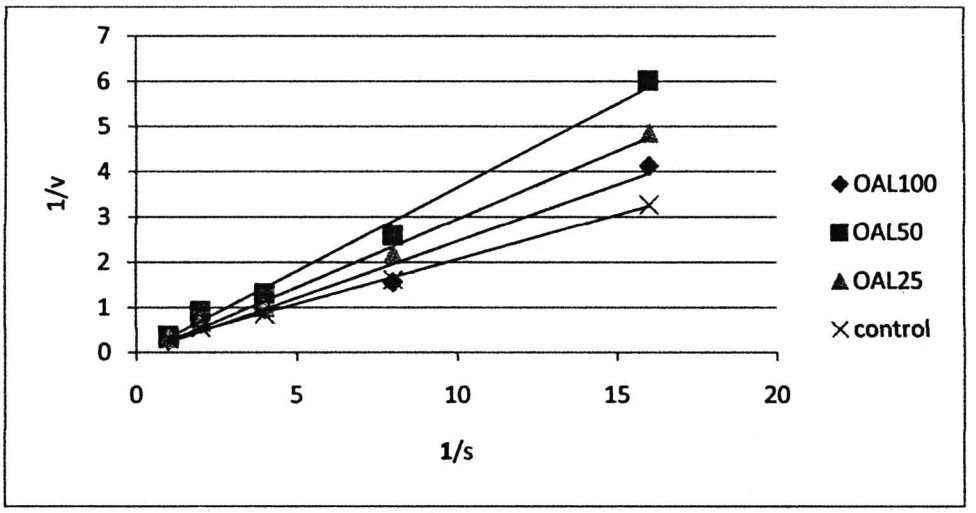


รูป 4.3 ข เส้น *Lineweaver- Burk* ของ EAL

Octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate หรือ octyl caffeate (OAL)เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอส เทอร์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะลิฟาติกสายยาวต่อกับโมเลกุลกรดคาเฟอิก นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซี จีเนส-1เมื่อทดสอบโดยใช้ OAL เข้มข้น 100 μg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้ 53.14% ซึ่งยับยั้งน้อยกว่ากรดคาเฟอิก แสดงดังรูปที่ 4.4 ก กลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์แสดงดังรูป 4.4 ข. ค่า Vmax มีค่าเท่ากับ 0.94 μM bilirubin/mg protein/ h ส่วนค่า Km มีค่า 0.87

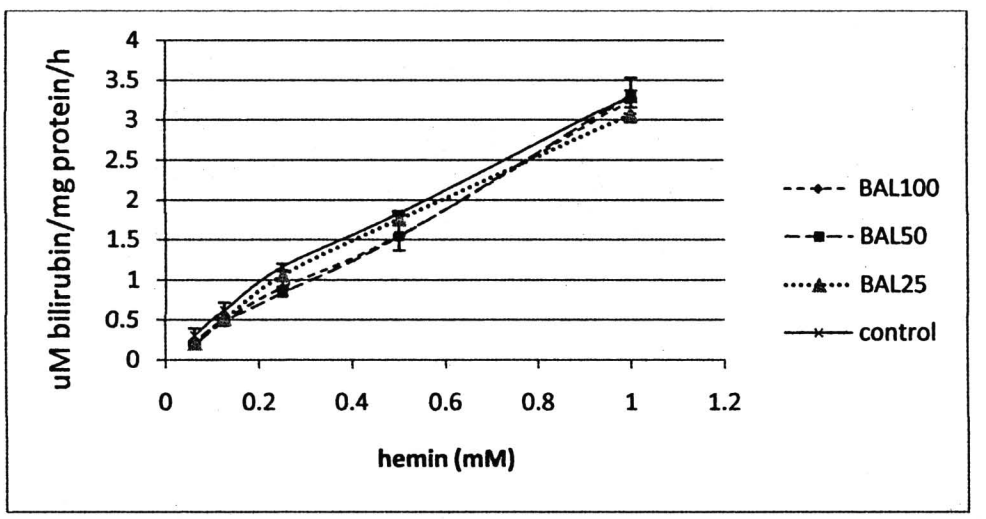


รูป 4.4 ก แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ OAL

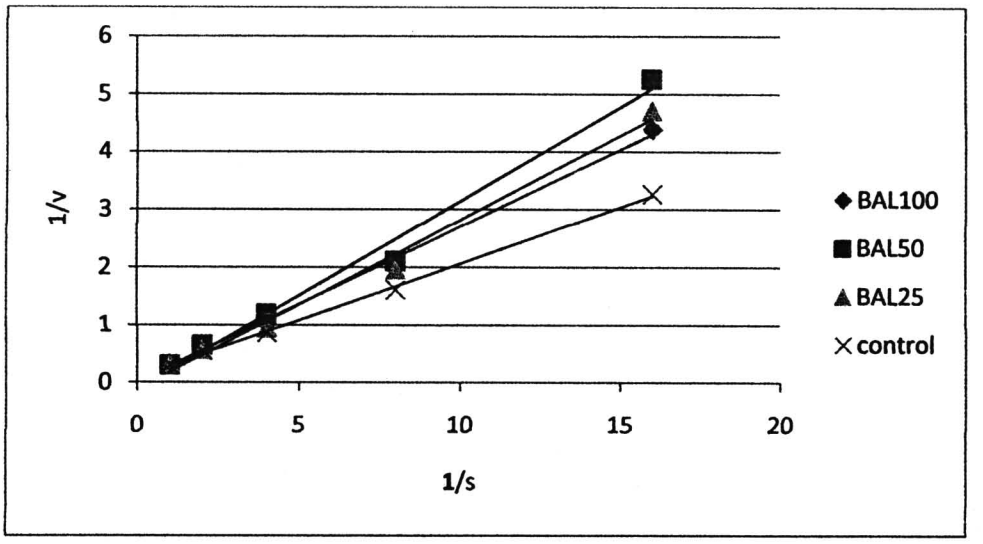


รูป 4.4 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ OAL

Phenylmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate หรือ benzyl caffeate (BAL)เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะโรติกสายอะลิฟาติกสายสั้นต่อกับโมเลกุลกรดคาเฟอิก นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1เมื่อทดสอบโดยใช้ BAL เข้มข้น 100 μg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้ 60.30% ซึ่งใกล้เคียงกับ CA และ EA แสดงดังรูปที่ 4.5 ก กลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์แสดงดังรูป 4.5 ข. ค่า Vmax มีค่าเท่ากับ 8.60 μM bilirubin/mg protein/ h ส่วนค่า Km มีค่า 2.80

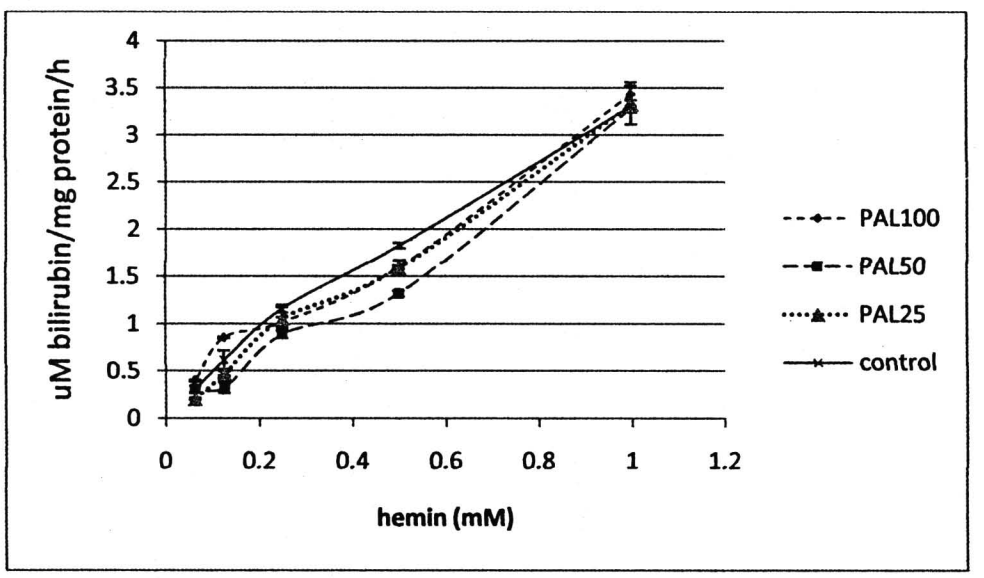


รูป 4.5 ก แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ BAL

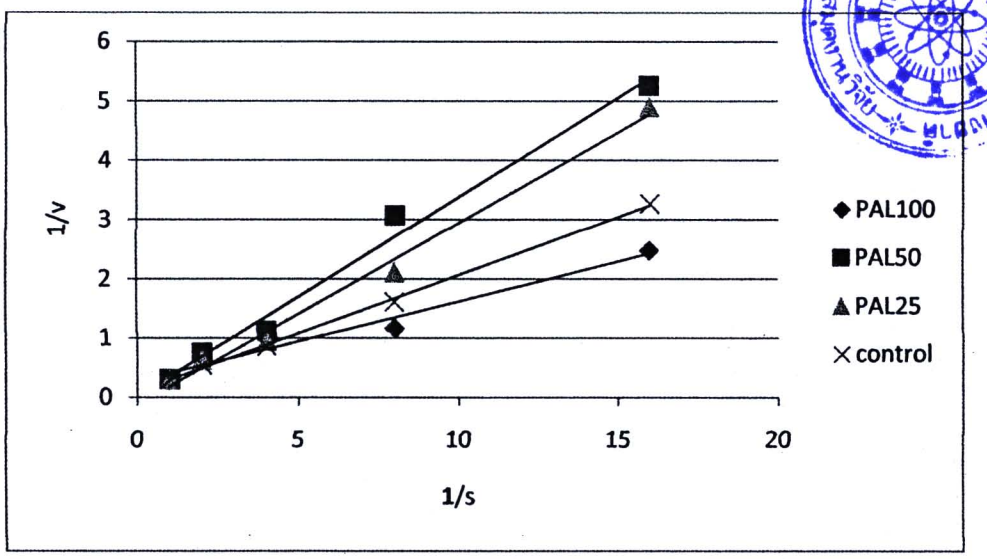


รูป 4.5 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ BAL

Phenylethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate หรือ phenethyl caffeate (PAL) เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะโรติกสายอะลิฟาติกสายยาวต่อกับโมเลกุล CA นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1เมื่อทดสอบโดยใช้ PAL เข้มข้น 100 µg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้ 58.10% กราฟแสดงดังรูปที่ 4.6 ก กลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์แสดงดังรูป 4.6 ข. ค่า Vmax มีค่าเท่ากับ 6.94 µM bilirubin/mg protein/ h ส่วนค่า Km มีค่า 2.69

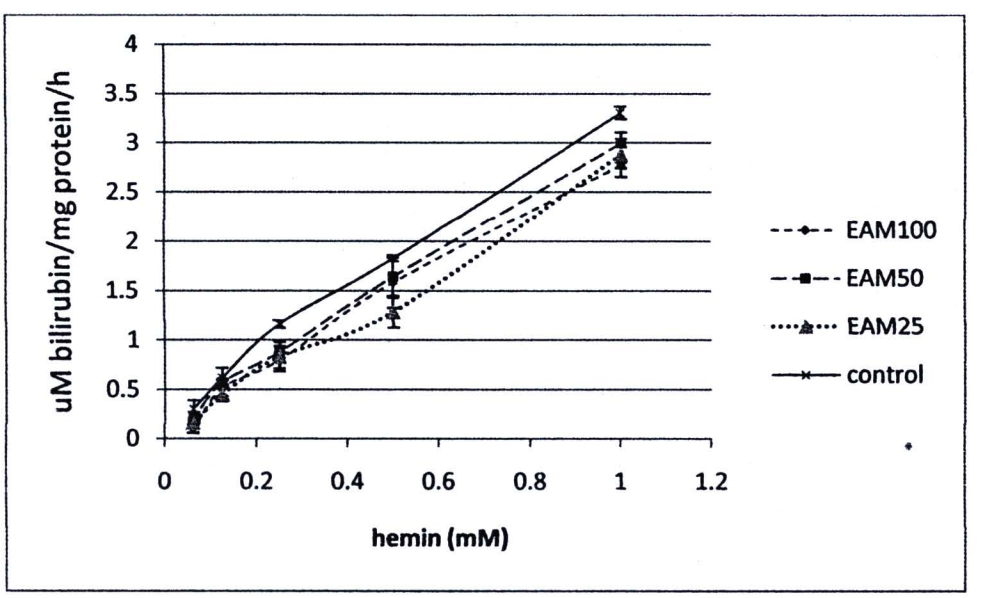


รูป 4.6 ก แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ PAL

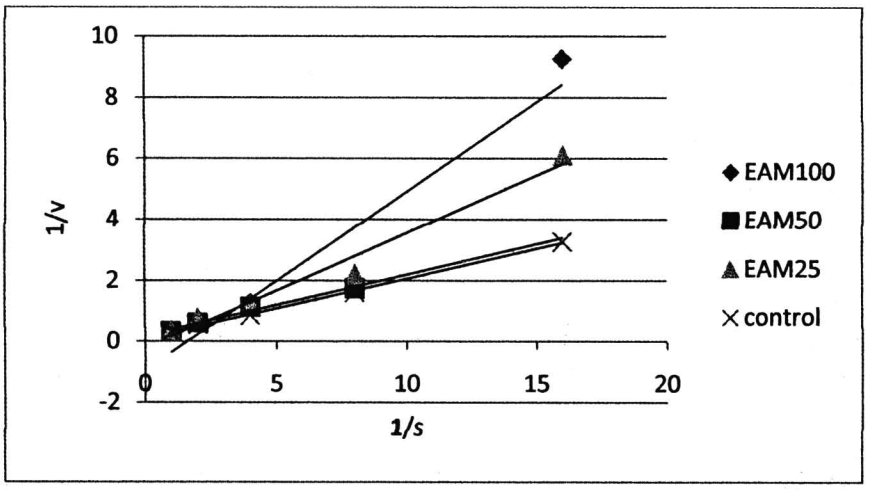


รูป 4.6 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ PAL

Ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenamide หรือ caffeic acid ethylamide (EAM) เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอไมด์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะลิฟาติกสายสั้นต่อกับโมเลกุลกรดคาเฟอิก นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1ได้ดีกว่ากรดกาเฟอิกและอนุพันธ์ในกลุ่มเอสเทอร์เมื่อทดสอบโดยใช้ EAM เข้มข้น 100 µg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้ 66.15% กราฟแสดงดังรูปที่ 4.7 ก กลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์แสดงดังรูป 4.7 ข. ค่า Vmax มีค่าเท่ากับ1.07 µM bilirubin/mg protein/ h ส่วนค่า Km มีค่า 0.62

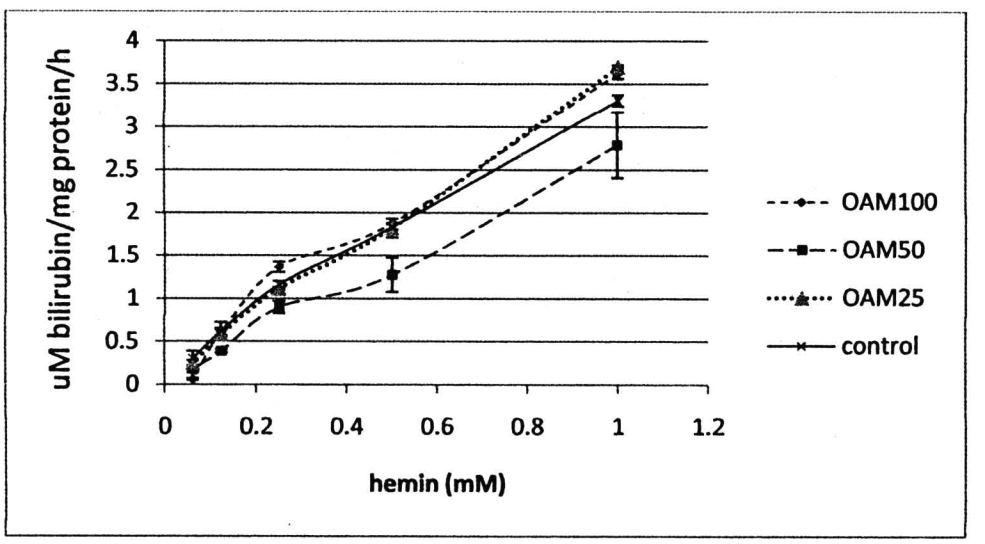


รูป 4.7 ก แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ EAM

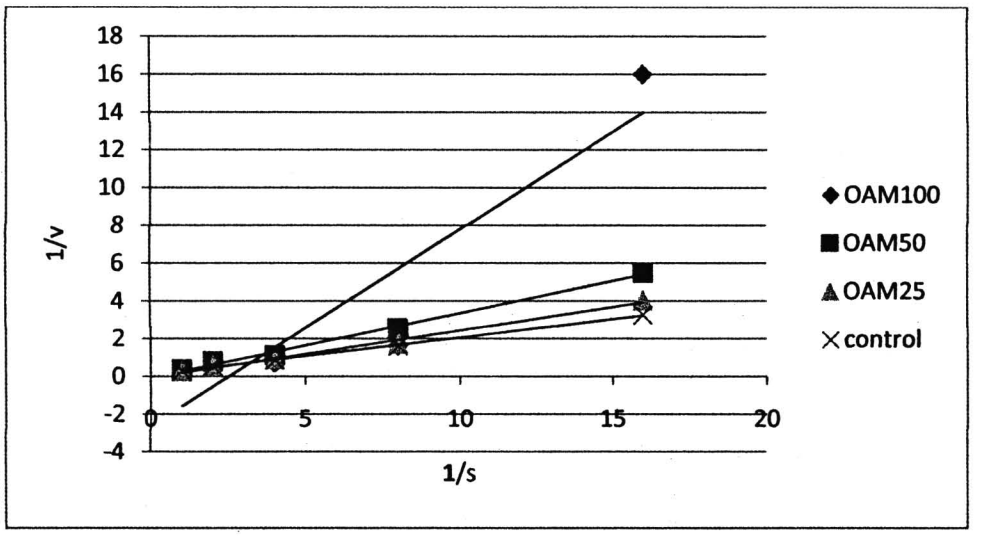


รูป 4.7 **ข** เส้น Lineweaver- Burk **ของ** EAM

Octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide **หรือ** caffeic acid octylamide (OAM) **เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอไมด์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะลิฟาติกสายยาวต่อกับโมเลกุล กรดคาเฟอิกนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1ได้ดีใกล้เคียงกับ** PC **เมื่อทดสอบโดยใช้** OAM **เข้มข้น** 100 μg/ml **และใช้สับสเตรต** 1 mM **พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้** 55.75% *กราฟแสดงดังรูปที่* 4.8 *ก กลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์แสดงดังรูป* 4.8 **ข.** *ค่า* Vmax **มีค่าเท่ากับ** 0.38 μM bilirubin/mg protein/ h **ส่วนค่า** Km **มีค่า** 0.40

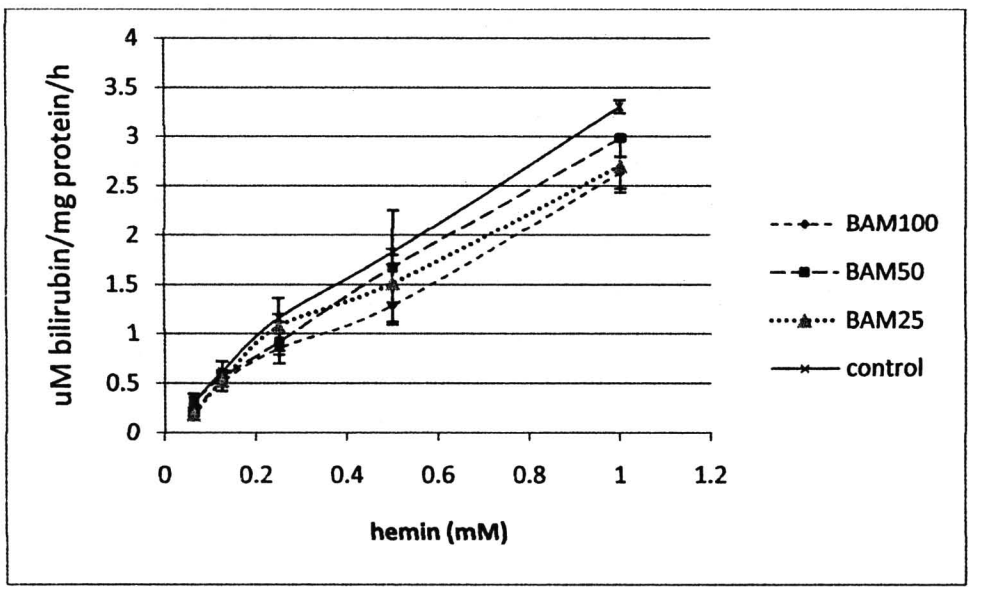


รูป 4.8 **ก** แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ OAM

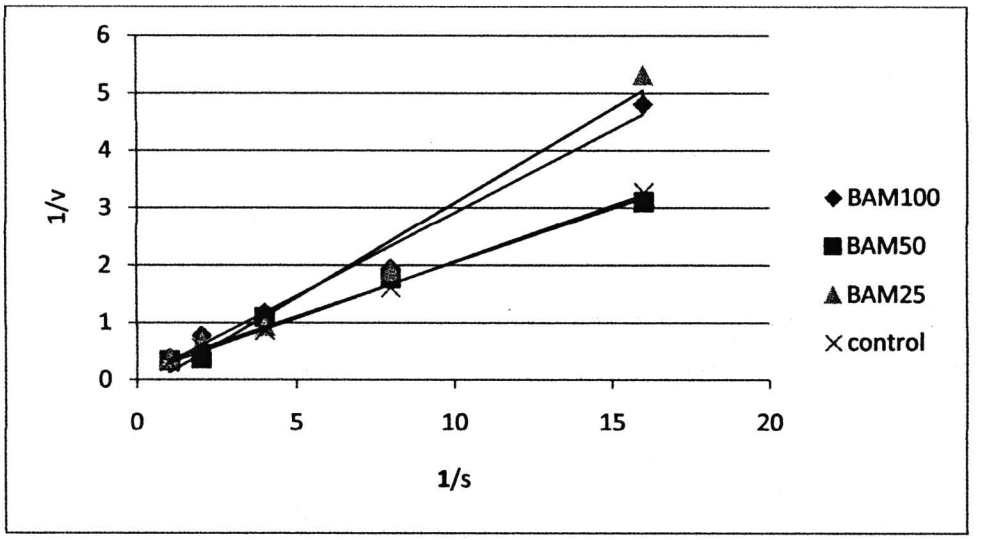


รูป 4.8 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ OAM

Phenmethyl1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamideหรือ caffeic acid benzylamide (BAM)เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอไมด์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะโรติกสายอะลิฟาติกสายสั้นต่อกับโมเลกุลกรดคาเฟอิก นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1 เมื่อทดสอบโดยใช้ BAM เข้มข้น 100 µg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้ 67.83% ซึ่งยับยั้งมากกว่ากรดคาเฟอิกแสดงดังรูปที่ 4.9 ก กลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์แสดงดังรูป 4.9ข. ค่า Vmax มีค่าเท่ากับ 29.33 µM bilirubin/mg protein/ h ส่วนค่า Km มีค่า 8.43

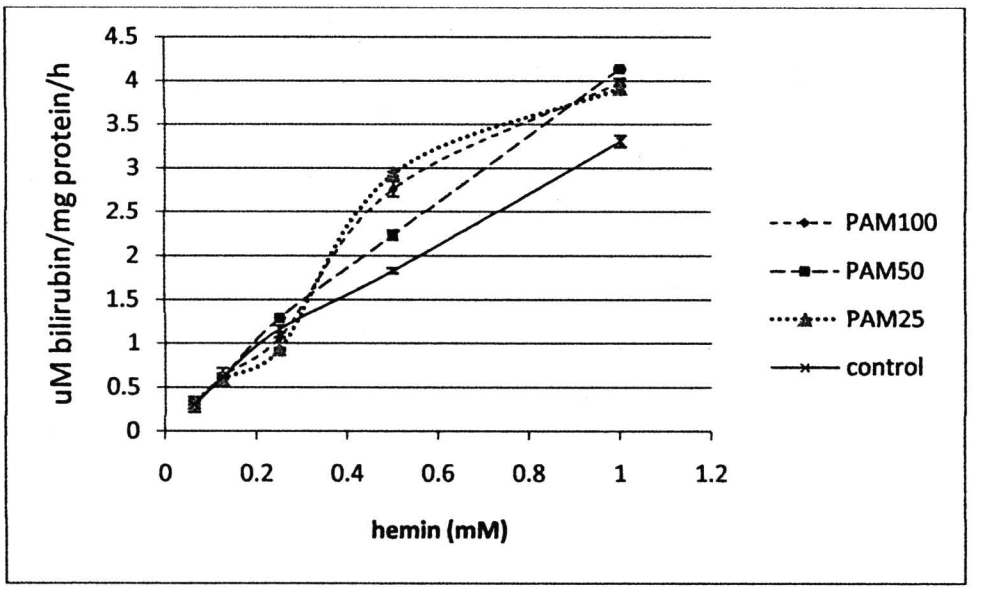


รูป 4.9 ก แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ BAM

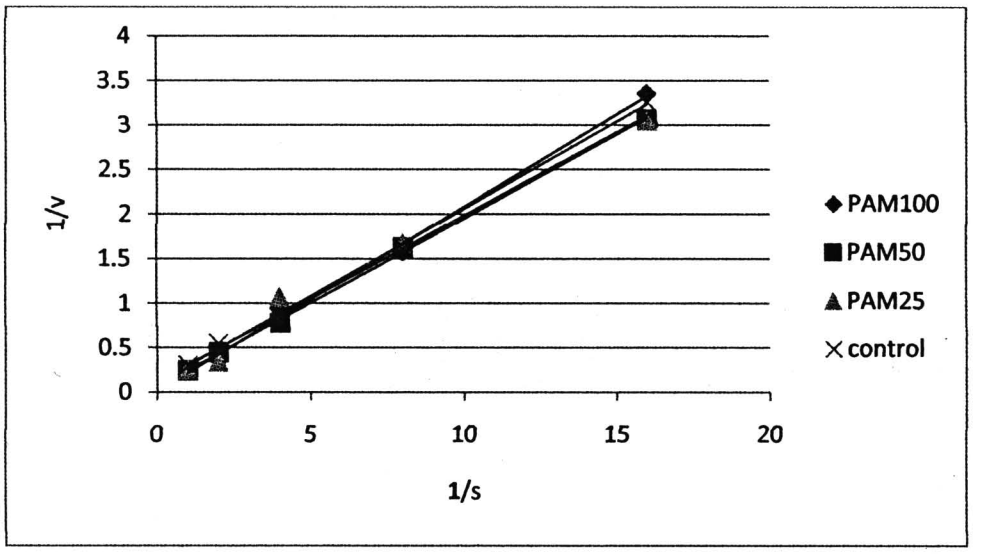


รูป 4.9 **ข** เส้น Lineweaver- Burk **ของ** BAM

Phenethyl1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenamide**หรือ** caffeic acid phenethylamide (PAM)**เป็นตัวแทนของอนุพันธ์เอไมด์ของกรดคาเฟอิกที่มีกลุ่มอะโรติกสายอะลิฟาติกสายยาวต่อกับโมเลกุลกรดคาเฟอิกนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1เมื่อทดสอบโดยใช้ PAMเข้มข้น 100 μg/ml และใช้สับสเตรต 1 mM พบว่ายับยั้งแอกติวิตีได้** 51.53% **ซึ่งยับยั้งมากกว่ากรดคาเฟอิกแสดงดังรูปที่** 4.10 ก **กลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์แสดงดังรูป** 4.10 ข. **ค่า** Vmax **มีค่าเท่ากับ** 79.36 μM bilirubin/mg protein/ h **ส่วนค่า** Km **มีค่า** 16.45



รูป 4.10 ก แอกติวิตีของ ฮีมออกซีจีเนส-1 กับความเข้มข้นของ PAM



รูป 4.10 **ข** เส้น Lineweaver- Burk ของ PAM

4.2 การศึกษาผลของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อแอกติวิตีเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1 ในเซลล์ Hep G2

4.2.1 การศึกษาความเป็นพิษของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อเซลล์ Hep G2

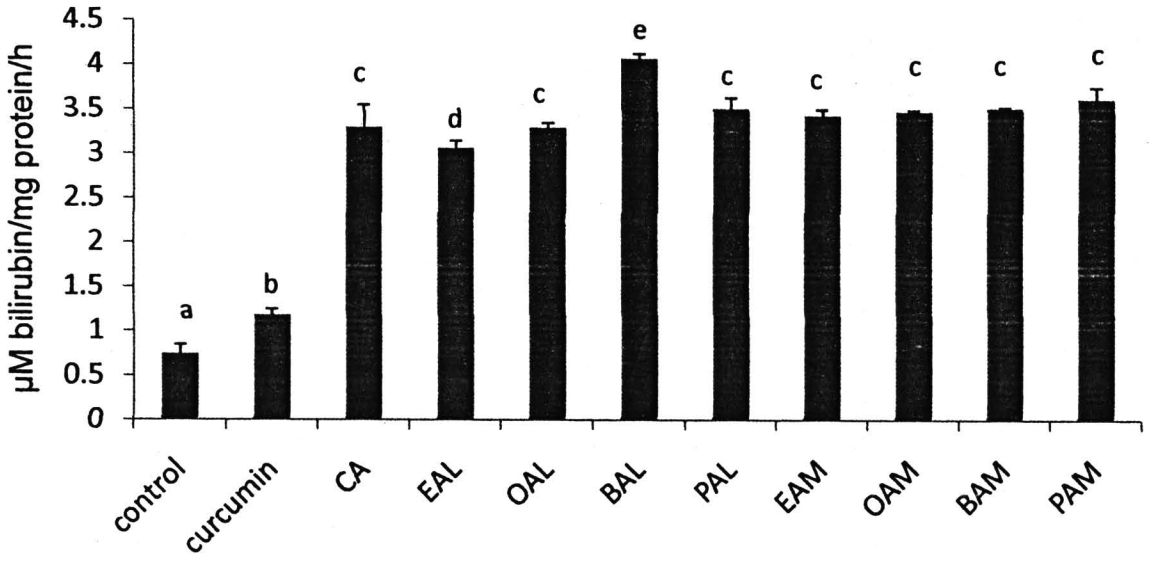
จากการทดสอบพบว่าทั้งกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์นั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด Hep G2 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 µg/ml

4.2.2 การศึกษาผลของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส 1 ในเซลล์ Hep G2

ในการศึกษาได้ทดสอบได้เลือกใช้ความเข้มข้นของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์เป็น 10, 50 และ 100 µg/ml ใช้เวลาบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเลือกเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นกลุ่มควบคุมแบบ positive control ผลการทดลองพบว่าการเหนี่ยวนำเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนสแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ กรดคาเฟอิก อนุพันธ์กรดคาเฟอิก และเคอร์คูมิน

วิธีที่ใช้ในการหาแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส 1ในงานวิจัยนี้สามารถเทียบเท่ากับการหาระดับ mRNA ของเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส 1 (Motterlini., 2000) หลังจากบ่มกรดคาเฟอิก อนุพันธ์กรดคาเฟอิก และเคอร์คูมินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส 1 มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อันดับของ

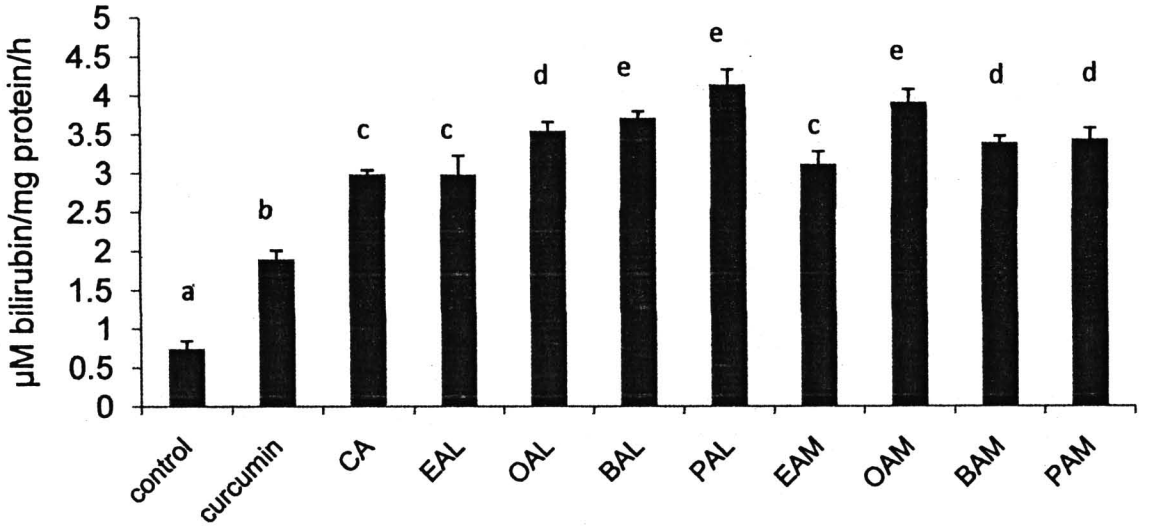
การเหนี่ยวนำแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อใช้สารที่ความเข้มข้นเป็น 10 µg/ml เป็นดังนี้ BAM>PAM>BAM>PAL>OAM> EAM>OAL>CA>EAL ดังแสดงดังรูปที่ 4.11 ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่า EAL เหนี่ยวนำเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส 1 ต่ำที่สุดในขณะที่ BAM นั้นเหนี่ยวนำฮีมออกซีจีเนส 1 ได้ดีที่สุดส่วนสารอื่นๆ นั้นจัดอยู่ในกลุ่มที่เหนี่ยวนำฮีมออกซีจีเนส 1ในระดับปานกลาง BAM กระตุ้นการสร้างและแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส 1โดยมีค่า 4.07 µM bilirubin/ mg protein/ h คิดเป็น 2.1 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและคิดเป็น 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเคอร์คูมิน



รูปที่ 4.11 กราฟแต่ละแท่งแสดงแอกติวิตี ฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารต่างๆที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ อักษรพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มต่างๆที่ *($p<0.05$)*

รูปที่ 4.12 แสดงแอกติวิตีของฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารที่ความเข้มข้น 50 µg/ml อันดับของการเหนี่ยวนำแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส 1เป็นดังนี้ PAL>OAM>BAL> OAL>PAM> BAM>EAM>CA>EAL PAL นั้นกระตุ้นแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส 1ได้สูงที่สุดโดยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม PAL สามารถกระตุ้นแอกติวิตี

ได้4.14 μM bilirubin/ mg protein/ h และคิดเป็น 2.1 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและคิดเป็น 1.2 เท่าเมื่อเทียบกับเคอร์คูมิน

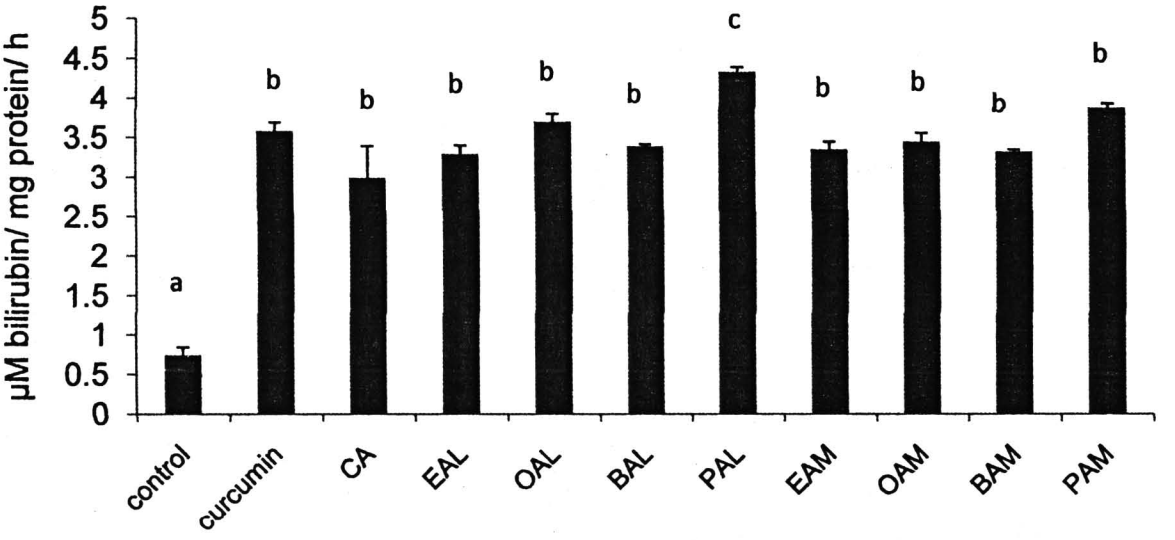


รูปที่ 4.12 กราฟแต่ละแท่งแสดงแอกติวิตี ฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารต่างๆที่ความเข้มข้น 50 μg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ อักษรพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มต่างๆที่ ($p<0.05$)

รูปที่ 4.13 แสดงแอกติวิตีของฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อใช้สารต่างๆที่ความเข้มข้น 100 μg/ml อันดับความแรงของการเหนี่ยวนำเป็นดังนี้ PAL> PAM> OAL> OAM> BAL> EAM> BAM> EAL>CA PAL นั้นมีความสามารถมากที่สุดในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีของฮีมออกซีจีเนส 1 คือมีค่า 4.32 μM bilirubin/ mg protein/ h คิดเป็น 2.3 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและคิดเป็น 1.1 เท่าเมื่อเทียบกับเคอร์คูมิน

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารอนุพันธ์ระหว่างกลุ่มเอสเทอร์และเอไมด์นั้นพบว่าสารกลุ่มเอสเทอร์นั้นสามารถเหนี่ยวนำแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส 1 ได้ดีกว่าอนุพันธ์กลุ่มเอไมด์ ในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้เคอร์คูมินเป็นสาร positive control เคอร์คูมินนั้นมีศักยภาพในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส 1 และขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารด้วย (dose- response relationship) ที่ความเข้มข้นต่ำๆคือ 10 และ 50 μg/ml เคอร์คูมินนั้นมีความสามารถในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีได้น้อยกว่ากรดคาเฟอิกและอนุพันธ์แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

ความสามารถในการเหนี่ยวนำนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยกเว้น PAL ที่มีความสามารถเหนี่ยวนำมากกว่า



รูปที่ 4.13 กราฟแต่ละแท่งแสดงแอกติวิตี ฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารต่างๆที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ อักษรพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มต่างๆที่ *($p<0.05$)*