ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
242368

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ของพฤกษเคมีและอนุพันธ์ในการเหนี่ยวนำฮีมออกซีจีเนสเพื่อการป้องกันมะเร็ง

Structure activities relationship of phytochemicals and derivatives on heme oxygenase induction for chemoprevention

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุต

นายเชิดศักดิ์ ใจแข็ง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2551

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
242368

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ของพฤกษเคมีและอนุพันธ์ในการเหนี่ยวนำฮีมออกซีจีเนสเพื่อการป้องกันมะเร็ง

Structure activities relationship of phytochemicals and derivatives on heme oxygenase induction for chemoprevention

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุต

นายเชิดศักดิ์ ใจแข็ง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2551

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทสรุปผู้บริหาร

โรคมะเร็งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพ สูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมากเนื่องจากโรคนี้เป็นโรคเรื้อรัง ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และจากข้อมูลทางสถิติพบว่าคนไทย ป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคนี้เป็นอันดับหนึ่งของประเทศและมีแนวโน้มว่าจะทวีความรุนแรงมากขึ้น จากนโยบายของรัฐบาลที่ต้องการส่งเสริมสุขภาพ ป้องกันโรค และเพิ่มมูลค่าผลผลิตบนพื้นฐานความรู้และความเป็นไทยโดยผนวกฐานทรัพยากรธรรมชาติ วัฒนธรรมและภูมิปัญญาท้องถิ่น จากสถิติพบว่ามะเร็งตับนับเป็นปัญหาที่น่าสนใจ และระบาดมากในประเทศ ซึ่งสาเหตุหลักนั้นส่วนหนึ่งมาจากสภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดจากปฏิกิริยาการเผาผลาญออกซิเจนหรือได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อมก่อให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของการก่อโรคและเป็นปัจจัยที่ทำให้โรคมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วจากการศึกษาภูมิปัญญาทางด้านแพทย์แผนไทยพบว่าพฤกษเคมีเป็นสารสำคัญในพืชทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาพบว่าถ้าปรับเปลี่ยนโครงสร้างของพฤกษเคมีนั้นสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้แต่ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาเกี่ยวกับพฤกษเคมีและอนุพันธ์ในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ที่ป้องกันอันตรายและรักษาสมดุลอนุมูลอิสระดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาพฤกษเคมีและอนุพันธ์ในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ ฮีม ออกซีจีเนส เพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆและสร้างเสริมสุขภาพคนไทยให้แข็งแรง

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะนำพฤกษเคมีโดยคัดเลือกกรดคาเฟอิก ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกมีสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ มาเปลี่ยนโครงสร้างให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์เอสเทอร์และเอไมด์และทดสอบฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส 1โดยใช้เซลล์ Hep G2 และศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้ไมโครโซมที่ปั่นแยกจากตับหนูเป็นแหล่งเอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส 1และไบริเวอร์ดิน รีดักเทส อีกทั้งศึกษาถึงผลของหมู่ฟังก์ชันต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์เอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส 1

กรดคาเฟอิกและอนุพันธ์นั้นมีความสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์เอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส 1ได้มากกว่าเคอร์คูมินซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส –1โดย phenylethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate (PAL) มีฤทธิ์เหนี่ยวนำฮีมออกซีจีเนส-1 มากที่สุด เมื่อทดสอบฤทธิ์กรดคาเฟอิกและอนุพันธ์โดยใช้ไมโครโซมจากตับหนูทดสอบในหลอดทดลองพบว่าสารทั้งหมดยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส 1โดยกลไกการยับยั้งนั้นเป็นแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์ซึ่งการทดลองนั้นตรงกันข้ามกันโดยการทดลองในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส- 1 ของหมู่ฟังก์ชันระหว่างเอสเทอร์กับเอไมด์พบว่าอนุพันธ์เอสเทอร์มีความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส 1ได้ดีกว่า

อนุพันธ์เอไมด์เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอะลิฟาติกและอะโรมาติกพบว่าโครงสร้างของอนุพันธ์กรดคาเฟอิกที่มีสายคาร์บอนยาวนั้นมีสมบัติเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ ฮีมออกซีจีเนส 1ได้ดีกว่า

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยชุดนี้ คณะผู้วิจัยหวังว่าจะเป็นประโยชน์ สร้างองค์ความรู้พื้นฐานอันเป็นประโยชน์ในการพัฒนาหาสารใหม่ในพืชผัก สมุนไพรไทยเพื่อเสริมสร้างสุขภาพให้ห่างไกลจากโรคเพื่อลดการนำเข้าเวชภัณฑ์จากต่างชาติ

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้อนุมัติงบประมาณสนับสนุนโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2551 แก่ผู้คณะวิจัย และขอขอบคุณคณะกรรมการผู้ตรวจสอบทางวิชาการของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะต่างๆอันเป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัย เพื่อให้งานวิจัยนี้นำไปต่อยอดเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนาประเทศต่อไป

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้ให้คณาจารย์ผู้วิจัยต้นสังกัดใช้สถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

242368

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้กรดคาเฟอิกและอนุพันธ์เอสเทอร์ได้แก่ ethyl 1- (3',4' dihydroxyphenyl) propenate (EAL), octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (OAL), phenylmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate (BAL), phenylethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (PAL), และอนุพันธ์เอไมด์ได้แก่ ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (EAM), octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (OAM), phenmethyl1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide(BAM), phenethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (PAM) เมื่อใช้สารที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/mlทดสอบฤทธิ์การเหนี่ยวนำแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส-1ในเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2 พบว่ากรดคาเฟอิกและอนุพันธ์มีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส-1ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml BAL มีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์มากที่สุดคือ 2.1 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml พบว่า PAL นั้นมีศักยภาพในการเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์มากที่สุดคือ 2.1และ 2.3 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กรดคาเฟอิกและอนุพันธ์นั้นมีฤทธิ์เหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนส-1 ได้ดีกว่าเคอร์คูมินซึ่งใช้เป็นสารที่ใช้มาตรฐานในการกระตุ้นเอนไซม์ การทดสอบผลของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ในหลอดทดลองนั้นพบว่าสารหมดนั้นยับยั้งแอกติวิตีเอนไซม์โดยกลไกการยับยั้งแบบแข่งขันไม่สมบูรณ์ BAM มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุดคือ ร้อยละ67.83 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ความสัมพันธ์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันกับฤทธิ์นั้นพบว่าสารประกอบเอสเทอร์มีศักยภาพที่จะเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ได้ดีกว่าอนุพันธ์เอไมด์และอนุพันธ์ที่มีสายคาร์บอนยาวและมีวงเบนซินมากจะเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ได้ดีกว่าอนุพันธ์ที่มีสายคาร์บอนสั้นจากการศึกษาสรุปได้ว่ากรดคาเฟอิกและอนุพันธ์นั้นมีศักยภาพเหนี่ยวนำแอกติวิตีเอนไซม์ฮีมออกซีจีเนสและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ป้องกันโรคอันมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้

242368

Abstract

Caffeic acid and its esters such as ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (EAL), octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (OAL), phenylmethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl)propenate (BAL), phenylethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propenate (PAL),and amide derivatives such as ethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (EAM), octyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (OAM), phenmethyl1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide(BAM), phenethyl 1-(3',4'-dihydroxyphenyl) propen amide (PAM) were used to study heme oxygenase 1 induction in Hep G2 cell line and *in vitro* study. Concentration at 10, 50 and 100 µg/ml of caffeic acid ester and amides derivatives were selected to inducing heme oxygenase 1 (HO-1) activity in Hep G2 cell line and in vitro study. It was found that caffeic acid and its derivatives could induce HO-1 activity. . At 10 µg/ml concentration, phenylmethyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenate (BAL) was the highest induce activity, 2.1 folds when compared with the control. At 50 and 100 µg/ml concentrations, phenylethyl 1-(3', 4'-dihydroxyphenyl) propenate (PAL) was the highest HO-1 inducer which activities was 2.1 and 2.3 folds, respectively, when compared with control group. In *In vitro* study, caffeic acid and its derivatives could inhibit HO-1 activity by uncompetitive inhibition mechanism. BAM was the highest inhibitor compound with inhibiting 67.83% when compared with the control group. Caffeic acid ester derivatives was higher potential to induce heme oxygenase 1 activity than caffeic acid amide derivatives and the longer side chain or aromatic side chain affected to HO-1 activity. This study implied that caffeic acid and its derivatives could be used for induce HO-1 as the protection of tissues against free radicals.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	*i*
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินงานวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	22
บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผล	38
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	43
ประวัติผู้วิจัย	46

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 โรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับฮีมออกซีจีเนส	8

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างฮีมและฮีมิน	5
2.2 กลไกการสังเคราะห์ฮีม	6
2.3 กลไกการทำลายฮีมโดยฮีมออกซีจีเนส	7
2.4 บทบาทและการป้องกันของฮีมออกซีจีเนสต่อเนื้อเยื่อที่ได้รับอันตราย	9
2.5 โครงสร้างเคอร์คูมิน	11
4.1 โครงสร้างกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์	22-24
4.2 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับกรดคาเฟอิก	25
4.2 ข เส้น Lineweaver- Burk ของกรดคาเฟอิก	26
4.3 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ EAL	26
4.3 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ EAL	27
4.4 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ OAL	27
4.4 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ OAL	28
4.5 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ BAL	28
4.5 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ BAL	29
4.6 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ PAL	29
4.6 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ PAL	30

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

4.7 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ EAM 30

4.7 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ EAM 31

4.8 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ OAM 31

4.8 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ OAM 32

4.9 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ BAM 32

4.9 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ BAM 33

4.10 ก แอกติวิตีฮีมออกซีจีเนส -1 กับ PAM 33

4.10 ข เส้น Lineweaver- Burk ของ PAL M 34

4.11กราฟแต่ละแท่งแสดงแอกติวิตี ฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อเหนี่ยวนำ 35
ด้วยสารต่างๆที่ความเข้มข้น 10 μg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ
อักษรพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ
กลุ่มต่างๆที่ ($p<0.05$)

4.12กราฟแต่ละแท่งแสดงแอกติวิตี ฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อเหนี่ยวนำ 36
ด้วยสารต่างๆที่ความเข้มข้น 10 μg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ
อักษรพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ
กลุ่มต่างๆที่ ($p<0.05$)

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

4.13 กราฟแต่ละแท่งแสดงแอกติวิตี ฮีมออกซีจีเนส 1เมื่อเหนี่ยวนำด้วย สารต่างๆที่ความเข้มข้น 10 μg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ อักษรพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ เทียบกับกลุ่มต่างๆที่ ($p<0.05$) 37