

เป็น substrate ในการสร้าง cellular lipid จากการศึกษาค้นคว้าของ piperine ใน in vitro และ in vivo พบว่ามีผลในเชิงเภสัชวิทยาและสรีรวิทยามากมาย ทั้งในด้านเชิงบวกกับร่างกายเซลล์ และร่างกายของสัตว์ทดลอง และยังพบผลในเชิงลบ คือผล cytotoxicity ต่อเซลล์ และนอกจากนี้ ในเชิงการรักษายังพบว่าสาร piperine มีผล anti-cancer effects โดยพบว่า piperine มีผล anti-proliferative effects ต่อ human colon cancer cells และมีผลเกิด mitochondrial dysfunction ใน rat PC-12 cells (adrenal gland, pheochromocytoma) ส่วนการศึกษาค้นคว้าของ Piperine การสร้าง lipogenesis โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็งนั้น ยังไม่มีรายงานปรากฏเลย งานวิจัยครั้งนี้ จึงมุ่งวิจัยศึกษาค้นคว้าผลของ Piperine ในการลดหรือสามารถยับยั้ง cellular lipogenesis โดยในขั้นต้นนี้ จะมุ่งเน้นการลดลงของการนำ substrate ที่จำเป็นและใช้ในขบวนการ lipogenesis คือ citrate จากแหล่งภายนอกเซลล์ ซึ่งจะถูกรับ uptake เข้ามาในเซลล์โดย sodium-dependent citrate transporter เป็นหลัก การลดลงของ cellular lipogenesis จะส่งผลลด cell proliferation และ cell viability ซึ่งในขณะที่การยับยั้ง lipid biosynthesis นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อทั้ง cell proliferation และ viability ของเซลล์ปกติ ตามที่ได้กล่าวถึงข้างต้น

### ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีอัตราการแบ่งตัวที่สูง รวมทั้งมีอัตราของ cellular metabolism ที่สูงเช่นกัน ทำให้เซลล์ต้องการการ supply ของสารอาหาร เพื่อใช้ในขบวนการเจริญเติบโตในปริมาณที่สูงและต่อเนื่องกว่าเซลล์ปกติทั่วไป (DeBerardinis RJ et al., 2008) จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าเซลล์มะเร็งจะมีอัตราของ aerobic glycolysis ที่ค่อนข้างสูงกว่าเซลล์ปกติ (Elstrom RL et al.) ในเซลล์ Hepatocellular carcinoma HepG2 พบว่ามีอัตราของขบวนการ Krebs cycle ที่เร็วกว่าเซลล์ปกติประมาณ 1.5-4 เท่า (Fukuda H et al., 2002) สารอาหารที่ supply ในขบวนการต่างๆเหล่านี้ที่สำคัญ คือ กลูโคส ซึ่งจะถูกรับ uptake เข้าเซลล์ ซึ่งนอกจากจะใช้เป็นแหล่งของสารตั้งต้นในขบวนการ metabolism ของเซลล์แล้ว ยังเพื่อเป็นแหล่งของ carbon ที่ใช้ในการสร้าง nucleotide, lipid และ protein biosynthesis (DeBerardinis R et al., 2008, Bode B et al., 2002, Fukuda H et al., 2002) จากผลการศึกษาค้นคว้าในเซลล์มะเร็ง ยังพบอีกว่า ขบวนการ lipid synthesis ในเซลล์มะเร็งมีอัตราที่มากกว่า nonproliferating cells หรือเซลล์ปกติมาก ซึ่ง acyl group ส่วนใหญ่ใน lipid นั้นมาจาก de novo synthesis มากกว่าที่จะเกิดจากการ transport ของ fatty acid จากภายนอกเซลล์เข้ามาภายใน (Ookhtens M et al., 1984, Kuhajda FP, 2002) ซึ่งยังพบอีกว่า lipogenic enzymes ได้แก่ ATP-citrate lyase, acetyl CoA carboxylase และ fatty acid synthase มีการ express เพิ่มขึ้นมากในเซลล์มะเร็ง และนอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าขบวนการของ lipid biosynthesis ในเซลล์มะเร็ง ยังพบมีการเพิ่มขึ้นของ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mTOR pathway activity ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของ lipogenic enzymes (Wieman HL et al., 2007, Samuels Y and Ericson K, 2006, Samuels Y and Velculescu VE, 2004, Edinger AL and Thompson CB, 2002)

โดยทั่วไปแล้วขบวนการ lipid biosynthesis นั้นเริ่มต้นจากสารตั้งต้น คือ acetyl-CoA ซึ่งจะอยู่ในรูปของ citrate ซึ่งได้มาจากขบวนการ metabolism ของกลูโคสภายใน mitochondria และถูก transport ออกจาก mitochondria เข้ามาใน cytoplasm โดยใช้ mitochondrial citrate transporter (หรือ tricarboxylate carrier) (Mizuarai S et al., 2005, Hatzivassiliou G et al., 2005, Palmieri F, 2004) โดยที่ carrier นี้จะอยู่ที่บริเวณของ inner mitochondrial membrane มีหน้าที่ในการเป็น exchanger สำหรับสาร tricarboxylate (เช่น citrate, isocitrate) รวมทั้ง dicarboxylate (เช่น malate) หรืออาจเป็น phosphoenolpyruvate เป็นต้น

เมื่อ citrate ถูก transport เข้ามาใน cytosol จะถูกสลายกลายเป็น oxaloacetate และ Acetyl CoA โดย enzyme ATP-citrate lyase Oxaloacetate จะถูก reduce ต่อได้เป็น malate ซึ่งจะถูก convert ต่อเป็น pyruvate โดยใช้ NADP และ  $H^+$  หลังจากนั้น Pyruvate จะกลับเข้าสู่ mitochondria เพื่อนำไปสร้าง citrate ต่อไป Acetyl CoA และ NADPH เป็นสารที่จำเป็นในขบวนการ lipid biosynthesis (Kaplan RS, 2001) จากผลงานวิจัยต่างๆเหล่านี้สนับสนุนข้อมูลที่สรุปได้ว่า lipid biosynthesis ในเซลล์มะเร็งนั้นมีบทบาทที่สำคัญในการเป็นส่วนประกอบของ cell membrane ขบวนการ cell signaling, signal transduction, intracellular trafficking, และการ migration ของเซลล์มะเร็ง รวมทั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วย (Bagnat M and Simons K, 2002, Manes S et al., 1999, Ikonen E and Simons K, 1998) ข้อสรุปนี้ได้รับการยืนยันจากการ suppression lipogenic enzymes พบว่ามีการลดลงของการ proliferation รวมทั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง การศึกษา Knockdown ATP-citrate lyase enzyme โดยใช้เทคนิค siRNA ใน human lung adenocarcinoma cell line A543 พบว่ามีการลดลงของขบวนการ lipid synthesis ซึ่งส่งผลลดจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ใน G1 phase แต่ลดจำนวนของเซลล์ใน S phase (Hatzivassillon G et al., 2005) และในการศึกษาที่ให้ผลการทดลองที่ยืนยันความสำคัญของ lipid ต่อเซลล์มะเร็ง โดยการ silencing การ expression ของ enzyme acetyl CoA carboxylase ในเซลล์ LNCAP prostate cancer cell line พบว่ามีการลดลงของ new lipid biosynthesis โดยเฉพาะ phospholipids, triglyceride และ cholesterol (Brusselmans K et al., 2005) ซึ่งส่งผลเกิดการ stagnation ของจำนวน viable cells และลด cell proliferating รวมทั้งเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ตายด้วย ซึ่งผลงานวิจัยนี้ยังพบอีกว่า การ suppression ของ acetyl CoA carboxylase enzyme ไม่มีผลต่อทั้ง cell proliferation หรือ viability of cell ใน nonmalignant human fibroblasts นอกจากการลด lipid synthesis โดยการยับยั้ง enzyme activity แล้ว ยังมีงานวิจัยที่สนับสนุนความสำคัญของการลด lipid synthesis ต่อการลดการเจริญและ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยการ suppression mitochondrial citrate carrier โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลด citrate ที่จะใช้เป็น precursor ในขบวนการ cytosolic lipid biosynthesis โดยการใช้เทคนิค siRNA ซึ่งทำในเซลล์ HepG2 ผลการวิจัยพบว่ามีการลดลงของ cytoplasmic citrate และ malate ในขณะที่ mitochondria citrate ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลง (Mizuarai S et al., 2005) ซึ่งผลการลดลงของ cytosolic

citrate ส่งผลลด lipid ส่งผลลด cell growth และ proliferation เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม การลด citrate ภายในเซลล์โดยการลดการ transport citrate จาก mitochondria โดยการทำการ selectively silencing mitochondrial citrate transport โดยเทคนิค small interfering RNA (siRNA) รายงานผลว่ามีการลดลงของ lipid biosynthesis ในเซลล์มะเร็งได้แค่ประมาณ 40% เท่านั้น (Mizuara S et al., 2005) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าแหล่งที่มาของ cytosolic citrate จากแหล่งอื่นน่าจะมีความสำคัญในการเป็นแหล่งของ substrate ของขบวนการ lipogenesis มากกว่าแหล่งที่มาจากภายในเซลล์

นอกจากแหล่งของ cytosolic citrate ที่มาจากภายในเซลล์ โดยมาจากการ transport ออกจาก mitochondria แล้ว ยังพบว่าแหล่งที่มาของ citrate ยังมาจากภายนอกเซลล์อีกแหล่งหนึ่ง โดยที่เซลล์สามารถ uptake citrate จากภายนอกเซลล์เข้ามาภายในเซลล์โดยใช้ sodium-dependent dicarboxylate cotransporters ซึ่งสามารถ transport tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates เช่น di- และ tricarboxylates (Burckhardt BC et al., 2005, Inoue K et al., 2003, 2002, Pajor AM, 1995) ซึ่ง transport process แบ่งออกตาม substrate affinity ออกได้เป็น the low-affinity (NaDC-1) และ high-affinity (NaDC-3) transporters transporter ชนิด the low-affinity NaDC-1 สามารถ transport succinate ด้วยค่า  $K_m$  value ประมาณ 0.9 mM ซึ่งสามารถพบได้ที่ brush border membrane ของ renal proximal tubule และ intestine ของกระต่ายและมนุษย์ (Chen XZ et al., 1998; Pajor AM, 2000, Pajor AM and Sun N, 1996) มีบทบาทในการ transport di- และ tricarboxylates เช่น succinate และ citrate ผ่าน apical membrane ของ proximal tubule และ small intestine ส่วน the high-affinity NaDC-3 พบว่ามีการ expression ที่รก, สมอง, ตับ, ไต, และตับอ่อนของทั้งหนูและมนุษย์ ด้วย transport process ที่มีค่า  $K_m$  value สำหรับ succinate ประมาณ 20-102  $\mu$ M (Burckhardt BC et al., 2005; Chen X et al., 1999; Wang H et al., 2000) และนอกจาก NaDC-1 และ NaDC-3 แล้ว ในปี 2002 ยังพบ transporter อีกชนิดหนึ่ง คือ sodium citrate transporter (NaCT) โดยพบครั้งแรกที่สมองของหนู rat (Inoue K et al., 2002) คุณสมบัติที่แตกต่างไปจาก NaDC-1 และ NaDC-3 คือ NaCT สามารถ transport citrate ได้ดีกว่า succinate และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำใน HepG2 พบว่า Citrate transport ใน Hep G2 cells จะถูก transport โดย NaCT เป็นหลัก (Srisawang P and Chatsudthipong V, 2007)

ด้วยข้อมูลที่สนับสนุนว่า citrate มีความสำคัญต่อขบวนการ lipid biosynthesis ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการ proliferation และการเติบโตของเซลล์มะเร็ง และ citrate ที่ถูก transport จากภายนอกเซลล์เข้ามาภายในเซลล์น่าจะมีความเป็นไปได้สูงว่าจะเป็นแหล่งที่มาของ citrate ที่สำคัญต่อ lipid biosynthesis มากกว่าแหล่งที่มาจาก mitochondria ดังนั้นการวิเคราะห์บทบาทของ citrate transporter NaCT ต่อการสร้าง lipid และต่อ proliferation รวมทั้งต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งจึงน่าจะเป็นแนวทางในการพัฒนาปรับปรุงวิธีการที่จะสามารถรักษามะเร็ง



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
 ห้องสมุดงานวิจัย  
 วันที่.....1..3..พ.ย..2555  
 เลขทะเบียน.....249785.....  
 เลขเรียกหนังสือ.....

ได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกวิธีหนึ่งในอนาคตของวงการแพทย์ อีกทั้งน่าจะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งกว่าวิธีการในปัจจุบันนี้

พริกไทย (*Piper nigrum*) และ ดีปลี (*Piper longum*) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ถูกใช้อย่างแพร่หลาย เพื่อเป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหารไทยมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพริกไทย และ ดีปลี หลายด้าน อาทิเช่น พริกไทยมีฤทธิ์ลดไขมันและ ต้านการอักเสบ (Selvendiran et al., 2006; Bang et al., 2009) มีผลยืดอายุของหนูถีบจักร (Unnikrishnan and Kuttan, 1990) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ลดภาวะ Oxidative stress (Gülçin, 2005; Vijayakumar et al., 2004; Kapoor et al., 2009) มีฤทธิ์ต้านการหดตัวของลำไส้เล็กของหนู (Naseri, 2008) และมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงคลายตัว (Inchan and Chootip, 2006) ดีปลีมีฤทธิ์ฤทธิ์ฆ่าพยาธิในตับ (Mishra, 2009) ฤทธิ์ Hepatoprotective activity (Koul and Kapil, 1993; Thomas et al., 2009) ฤทธิ์ยับยั้ง Acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase (Lee et al., 2004) ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด (Park et al., 2007; Iwashita et al., 2007a, b) ฤทธิ์ลดไขมัน (Jin et al., 2009) มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต และทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Inchan et al., 2008)

ไพเพอรีน (piperine) เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่พบในพริกไทย และ ดีปลี โดยมีรายงานว่าสารไพเพอรีนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายด้าน อาทิ เช่น ฤทธิ์เพิ่มการหลั่งกรดผ่านการกระตุ้น  $H_2$  receptor (Ononiwu et al., 2002) มีผลลดการหลั่งฮัยรอยด์คอร์โมน และ ลดระดับกลูโคสในหนูขาว (Panda and Kar, 2003) มีผลป้องกันการเกิดมะเร็ง (Sunila and Kuttan, 2004; Das et al., 2007; Krishnakumar et al., 2009; Manoharan et al., 2009) มีผลลดภาวะซีมีเคร้า (Lee et al., 2005; Li et al., 2007; Wattanathorn et al., 2008; Hu et al., 2009) มีผลลดระดับโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็ง (Selvendiran et al., 2006) piperine มีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติของ cell membrane (membrane dynamics) (Khajuria A. et al., 2002) ส่วนการศึกษาผลในเชิง cytotoxicity ของ piperine พบว่ามีฤทธิ์ ส่งเสริมการเกิด DNA damage ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยสาร benzo[a]pyrene (B[a]P) ในเซลล์ V-79 lung fibroblast cells โดยมีผลลดการทำงานของ glutathione S-transferase (GST) และ uridine diphosphate glucuronyl transferase (UDP-GTase) (Chu CY et al., 1994) และผลในเชิง cytotoxicity ยังพบอีกว่า piperine มีผล concentration-dependent ในการลด survival ของ primary cultured neurons จากส่วนต่างๆ ของ rat brain (Unchern S. et al, 1994)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของ piperine ในเชิง anti-cancer effects พบว่า piperine มีผล anti-proliferative effects ต่อ human colon cancer cells (Duessel S et al., 2008) การศึกษาใน rat PC-12 cells (adrenal gland, pheochromocytoma) พบว่า piperine มีผลทำให้เกิด reactive oxygen species, ลด glutathione (GSH) ซึ่งส่งผลทำให้เกิด mitochondrial dysfunction (Lee CS et al., 2006) ส่วนการศึกษาผลของ Piperine การสร้าง lipogenesis

โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีอัตราของ cellular lipogenesis สูงมาก มากกว่าเซลล์ปกติที่ยังไม่มีรายงานปรากฏเลย งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งวิจัยศึกษาผลของ Piperine ในการลดหรือสามารถยับยั้ง cellular lipogenesis โดยจะมุ่งเน้นการลดลงของการ นำ substrate ที่จำเป็นและใช้ในขบวนการ lipogenesis คือ citrate ซึ่งแหล่งของ citrate นั้นมีแหล่งที่มาทั้งในเซลล์เองและนอกเซลล์ ภายนอกเซลล์นั้น citrate จะถูก uptake เข้ามาในเซลล์โดย sodium-dependent citrate transporter เป็นหลัก การลดลงของ cellular lipogenesis จะส่งผลลด cell proliferation และ cell viability ซึ่งในขณะที่การยับยั้ง lipid biosynthesis นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อทั้ง cell proliferation และ viability ของเซลล์ปกติ ตามที่ได้กล่าวถึงข้างต้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นไปที่ศึกษาบทบาทของ Piperine ซึ่งเป็นสารสำคัญของสมุนไพรไทย ต่อการนำ citrate จากภายนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์ โดยผ่านทาง citrate cotransporter ต่อขบวนการ lipogenesis และต่อการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 การที่เซลล์มะเร็งมีอัตราของ lipogenesis สูงมาก มากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งมีค่อนข้างต่ำ ประกอบกับการที่ citrate เป็นแหล่งของ substrate ที่จำเป็นและใช้ในขบวนการ lipogenesis ดังนั้นการยับยั้งการ uptake citrate เข้าเซลล์ มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นวิธีที่สามารถลดการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งได้ และน่าจะมีเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งสูงเช่นเดียวกัน และเพื่อเป็นข้อมูลยืนยันว่า Piperine สามารถลดอัตราการสร้าง cellular lipogenesis ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ และนำไปสู่การสนับสนุนการบริโภคสมุนไพรไทยเพื่อเป็นอีกแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป รวมทั้งงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปพัฒนาและปรับปรุงวิธีการรักษามะเร็งในมนุษย์ที่มีประสิทธิภาพมาก และมีความจำเพาะต่อเฉพาะเซลล์มะเร็งต่อไปในอนาคตได้

### ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับผลของสาร piperine ต่อการลด cytosolic citrate accumulation โดยการยับยั้งหรือลด cell membrane citrate transporter NaCT ต่อ cellular lipid biosynthesis ซึ่งจะส่งผลต่อการ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็งชนิด HepG2 โดยจะแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น กลุ่มเซลล์ control และกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ piperine ที่ความเข้มข้น 1-1,000  $\mu\text{M}$  เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 24 จนถึง 72 ชั่วโมง

ข้อมูลต่างๆที่ต้องตรวจวัดและวิเคราะห์ได้แก่

1. วิเคราะห์หาปริมาณ whole cell citrate
2. วิเคราะห์หา cellular lipid biosynthesis
3. วิเคราะห์ cell viability
4. วิเคราะห์การเกิด apoptosis