รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ"การเพิ่มระดับการทำงานของพาราออกโซเนส 1 ด้วยสมุนไพรไทย "

โดย นางสาว สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์

ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ตุลาคม 2553

สัญญาเลขที่ DBG4880006

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ"การเพิ่มระดับการทำงานของพาราออกโซเนส 1 ด้วยสมุนไพรไทย "

โดย นางสาว สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์
ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภท ทุนวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ “สมุนไพร ยารักษาโรคและสารเสริมสุขภาพ” ประจำปี2548 ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. คล้ายอัปศร พงศ์รพีพร คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ดร. ปนัดดา เทพอัคศร กรม วิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้อนุเคราะห์เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์

Abstract

Project Code: DBG4880006

Project Title: The Induction of Paraoxonase 1 Activity by Thai Medicinal Plant

Investigator: Miss Sureerut Porntadavity

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Medical Technology

Mahidol University

E-mail Address: mtspy@mahidol.ac.th

Project Period: 1 September 2005 - 30 August 2007

Human serum paraoxonase 1 (PON1) is a high density lipoprotein (HDL)-associated enzyme possessesing inherent antioxidant properties. PON1 has been shown to reduce the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) and HDL by hydrolyzing lipid peroxides, however the mechanism of which is still unknown. Accumulated data have persistently shown that PON1 has both *in vivo* and *in vitro* anti-atherosclerotic property. PON1 activity appears to be primarily under genetic control but may also be modified by chemicals, drugs and some natural substances in the diet. In this study, five common Thai medicinal herbs: *Butia superba* Roxb., *Hibiscus sabdariffa* Linn., *Centella asiatica* Linn., *Murdannia loriformis* Hassk., and *Morinda citrifolia* Linn. were tested for the ability to induce PON1 activity in human hepatocarcinoma, HepG2ม แสส. We found different effects produced by Thai medicinal herbs on PON1 activity. *Centella asiatica* Linn., *Murdannia loriformis* Hassk., and *Morinda citrifolia* Linn. did not increase PON1 activity but their toxicity had been observed. Whereas, *Butia superba* Roxb. at a concentration of 500 µg/ml significantly increased PON1 activity at 24 hr after treatment (p=0.01) and *Hibiscus sabdariffa* Linn. at concentrations of 250 and 500 µg/ml significantly increased PON1 activity at 24 and 48 hr after treatment, respectively (p=0.03 and 0.03). Further studies on isolating and identification of the active ingredient(s) and the mechanism for the induction of PON1 enzymatic activity will be of value to the research in the area of anti-atherosclerosis.

Keywords: Hepatocarcinoma (HepG2) cells, paraoxonase 1, Thai medicinal herbs

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ DBG4880006

ชื่อโครงการ การเพิ่มระดับการทำงานของ พาราออกโซเนส 1 ด้วยสมุนไพรไทย

ชื่อนักวิจัย นางสาว สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์

ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: mtspy@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 1 กันยายน 2548 ถึง 30 สิงหาคม 2550

พาราออกโซเนส1 (PON1) เป็น calcium-dependent esterase เอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากตับและหลั่งเข้าสู่กระแสเลือดโดยจับอยู่กับ high density lipoprotein (HDL) เอนไซม์ PON1 มีความสามารถในการสลายสารพิษจำพวก organophosphate และมีคุณสมบัติเป็น anti-atherosclerosis ระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น พันธุกรรม, สารเคมี, สิ่งแวดล้อม, ยาบางชนิด, รวมถึงสารในธรรมชาติที่พบในสมุนไพร ประเทศไทยมีความหลากหลายของสมุนไพรไทยที่อาจสามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรไทยห้าชนิดคือ กวาวเครือขาว, กระเจี๊ยบแดง, บัวบก, หญ้าปักกิ่ง, และ ลูกยอ ต่อการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ในเซลล์มะเร็งตับ Hepatocarcinoma (HepG2) cells จากผลการทดลองพบว่าสมุนไพรไทยทั้งห้าชนิด มีผลต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 แตกต่างกัน โดยกวาวเครือขาวสามารถเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml (p=0.01) ขณะที่กระเจี๊ยบแดงสามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 500 และ 250 µg/ml ตามลำดับ (p=0.03 และ 0.03) ส่วน บัวบก, หญ้าปักกิ่ง, และลูกยอนั้นไม่สามารถเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 อย่างมีนัยสำคัญและยังมีความเป็นพิษสูง อย่างไรก็ตามกลไกและสารออกฤทธิ์ที่กวาวเครือขาว และ กระเจี๊ยบแดง ใช้ในการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

คำหลัก: พาราออกโซเนส 1, สมุนไพรไทย, เซลล์มะเร็งตับ

บทนำ

Paraoxonase1 (PON1) (E.C.3.1.1.2.) เป็น calcium-dependent esterase ถูกสังเคราะห์ขึ้นในตับ และหลั่งสู่กระแสเลือดโดยจับกับ high density lipoprotein (HDL) เอนไซม์ PON1 เป็น glycoprotein ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 354 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่พบในสัตว์จำพวกปลา นก และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Ng และคณะ, 2003) เอนไซม์ PON1 เป็นที่รู้จักกันดีในงานด้านพิษวิทยา เนื่องด้วยความสามารถในการสลายสารพิษจำพวก organophosphate ได้ (Mackness M และคณะ, 1996) แต่ในปัจจุบันคุณสมบัติของเอนไซม์ PON1 ที่มีการศึกษากันมากคือ ความสามารถในการเป็นสารต้านหลอดเลือดแดงแข็ง (anti-atherosclerosis) เนื่องจากเอนไซม์ PON1มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยพบว่าเอนไซม์ PON1 สามารถ ป้องกันการเกิด oxidation ของ low density lipoprotein (LDL) และ HDL (Mackness M และคณะ, 1991) ทำให้ลดการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งได้ในหนูทดลอง (Shih และคณะ, 1998) ซึ่งคุณสมบัตินี้ของ PON1 น่าจะเกิดจาก free sulhydryl group (-SH) ของ cysteine ที่ตำแหน่ง 284 เนื่องจากเอนไซม์ PON1 ที่มีการกลายพันธุ์ของ cysteine ที่ตำแหน่ง 284 ไม่สามารถป้องกันการเกิด oxidation ของ LDL ได้ (Aviram และคณะ,1998) นอกจากนี้ Harel และคณะ (2004) ยังพบว่า cystein ที่ตำแหน่งนี้ทำให้รูปร่างของเอนไซม์ PON1 คงตัว

ระดับการทำงานของ PON1 จะเริ่มเพิ่มขึ้นหลังจากแรกเกิดได้ 15-25 เดือน และจะคงที่มื่อเข้าวัยผู้ใหญ่ (Mackness B และคณะ, 1998) โดยระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ในแต่ละคนจะไม่เท่ากันและมีความหลากหลายได้มากถึง 10-40 เท่า ทั้งนี้เป็นผลอันเนื่องมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยแวดล้อมต่างๆ (Ng และคณะ, 2003) ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเป็นผลเนื่องมาจากความหลากหลายในชนิดของกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง (polymorphism) โดย *PON1* มี polymorphism 2 ตำแหน่งในส่วนของ coding region คือ M55L ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของเอนไซม์ในซีรัม และ Q192R มีความสัมพันธ์กับระดับการทำงานของเอนไซม์ (Deakin และคณะ, 2004) นอกจากนี้ *PON1* ยังมี polymorphism อยู่ในส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ PON1 (promoter region) คือ C-108T ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณและระดับการทำงานของเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่า polymorphism เหล่านี้มีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ เช่น stroke, coronary artery disease, Parkinson's disease, ปริมาณ LDL ในพลาสมา (Ng และคณะ, 2003, Kao และคณะ,1998)

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 เช่น หนูที่ได้รับอาหารพวก proatherogenic diet จะมีระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ลดลง (Shih และคณะ, 1996) ส่วนในคนพบว่า การสูบบุหรี่, การใช้น้ำมันปรุงอาหารคุณภาพต่ำและการรับประทานอาหารที่มี trans fat ทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ลดลง (Ng และคณะ, 2003) ขณะที่สารบางชนิด เช่น vitamin E, vitamin C (Jarvik และคณะ, 2002), ยาลดระดับไขมันในกลุ่ม statin, การได้รับ alcohol ในปริมาณปานกลางและการรับประทานอาหารที่มีสารกลุ่ม polyphenol สามารถช่วยเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ได้ (Deakin และคณะ, 2003) สารกลุ่ม polyphenol มีหลายชนิด ได้แก่ naringenin, catechin, quercetin และ

flavonoid เป็นต้น (Gouedard และคณะ, 2004) สารเหล่านี้สามารถพบได้ในอาหาร และสมุนไพรทั่วไป ซึ่งมีการเพาะปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เช่น องุ่น, ชา, แอปเปิ้ล, กระเจี๊ยบแดง, กวาวเครือขาว และ ลูกยอ เป็นต้น ดังนั้นสมุนไพรไทยอาจมีความสามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ได้ ในการศึกษานี้ฤทธิ์ของสมุนไพรไทยห้าชนิดคือ กวาวเครือขาว, กระเจี๊ยบแดง, บัวบก, หญ้าปักกิ่ง, และ ลูกยอ ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 จึงถูกทดสอบในเซลล์มะเร็งตับ Hepatocarcinoma (HepG2) cells

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สารเคมี

Phenyl acetate และ calcium chloride จากบริษัท Merck เซลล์ Hepatocarcinoma (HepG2) (ATCC.HB-8065™) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. คล้ายอัปสร พงศ์รพีพร คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ดร. ปนัดดา เทพอัคศร กรม วิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อาหารเลี้ยงเซลล์ HepG2 และส่วนประกอบ (DMEM, RPMI, fetal bovine serum, trypsin, amphotericin B, penicillin-streptomycin, L-glutamine) จากบริษัท Gibco BRL สมุนไพรไทยได้แก่ กาวเครือขาว (Pueraria mirifica), กระเจี๊ยบแดง (Hibiscus sabdariffa)ม บัวบก (Centella asiatica), ลูกยอ (Morinda citrifolia), และ หญ้าปักกิ่ง (Murdannia loriformis) ที่ใช้ในการทดสอบได้รับความอนุเคระห์จาก รศ.ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย dimethyl sulfoxide (DMF), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Brilliant Blue G-250, Tris [hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride และ Bovine serum albumin (BSA) จากบริษัท Sigma

การเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2

เซลล์ HepG2 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่มี 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 0.1% amphotericin B และ 1% L-glutamine ในสภาวะที่มี CO_2 5% อุณหภูมิ 37^{o}C

การทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพรไทย

หนึ่งวันก่อนทำการทดสอบ เซลล์ HepG2 จะถูกเพาะเลี้ยงใน 96-well plate ด้วยปริมาณ 3x10^{4} เซลล์/well การทดสอบความเป็นพิษขของสมุนไพรทำโดยการ incubate เซลล์ HepG2 กับสมุนไพรที่ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ปราศจาก amphotericin B โดย incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำเซลล์มาล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 3 ครั้ง เติม MTT และ สารละลายที่มีส่วนผสมของ 50% DMF และ 20% SDS วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm.

การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรไทย

หนึ่งวันก่อนทำการทดสอบ เซลล์ HepG2 จะถูกเพาะเลี้ยงใน 6-well plate ด้วยปริมาณ $7x10^5$ เซลล์/well การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรทำโดยการ incubate เซลล์ HepG2 กับสมุนไพรที่ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ปราศจาก amphotericin B โดย incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำเซลล์มาล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2 ครั้ง ขูดเซลล์ให้หลุดออกจาก plate ด้วย cell scraper ปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วย PBS จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณเซลล์โปรตีน และ ระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1

การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โปรตีน

ปริมาณเซลล์โปรตีนถูกวิเคราะห์โดยวิธี Bradford (Bradford และคณะ, 1976) ด้วยการผสม Bradford reagent 1 ml กับ ตัวอย่าง 20 µl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm โดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน

ระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1

ระดับการทำงานของ PON1 จะถูกวัดในรูปของ cell-associated PON1 arylesterase โดยวิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Deakin และคณะ (2001) โดยผสมเซลล์กับ 1.0 mM phenyl acetate (substrate) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นและ ติดตามการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงเป็นเวลา 3 นาที ที่ 270 nm ค่าที่ได้จะถูก normalize ด้วยปริมาณโปรตีนและแสดงในรูปของ Fold Induction

สถิติ

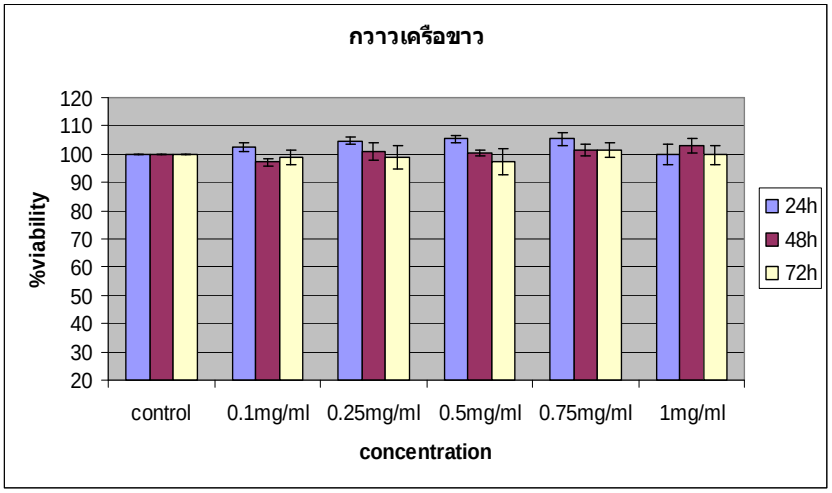
ข้อมูลจากการวิจัยนี้จะถูกวิเคราะห์เชิงสถิติโดย Student't test และให้ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p-value มีค่าน้อยกว่า 0.05

ผลการทดลอง

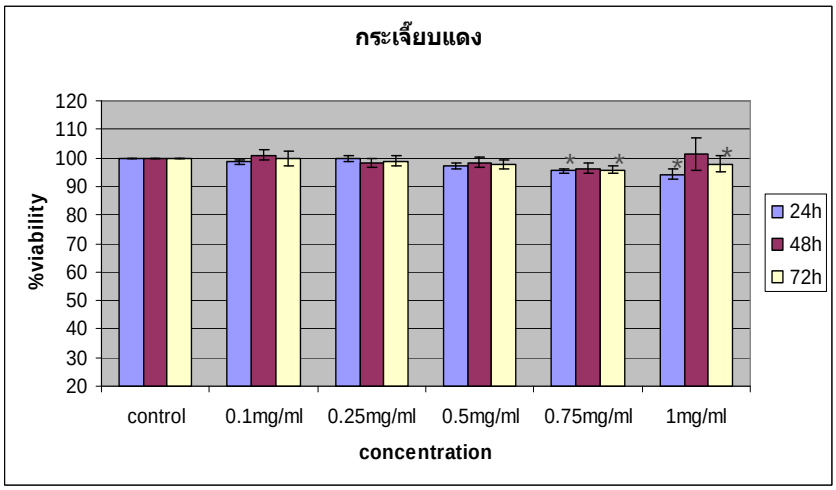
การทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพรไทย

ความเป็นพิษของสมุนไพรถูกทดสอบโดยดูการอยู่รอดของเซลล์หลังจากได้รับสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าสมุนไพรที่มีความเป็นพิษสูงคือ ลูกยอ ซึ่งเพาะที่ความเข้นสูงและได้รับเป็นเวลานานจึงจะมีความเป็นพิษต่อการอยู่รอดของเซลล์นัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สมุนไพรชนิดอื่นๆ ในการทดสอบนี้มีความเป็นพิษต่อการอยู่รอดของเซลล์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1A-E)

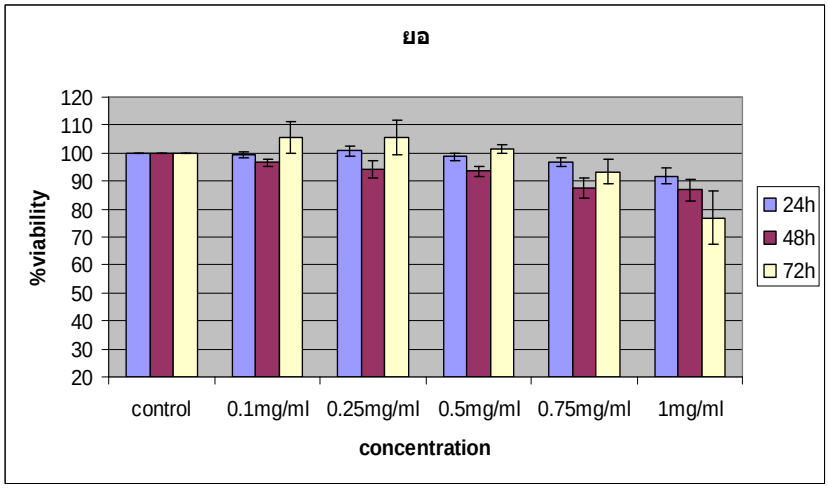
1A


กวางเครือขาว
%viability
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
control
0.1mg/ml
0.25mg/ml
0.5mg/ml
0.75mg/ml
1mg/ml
concentration
24h
48h
72h

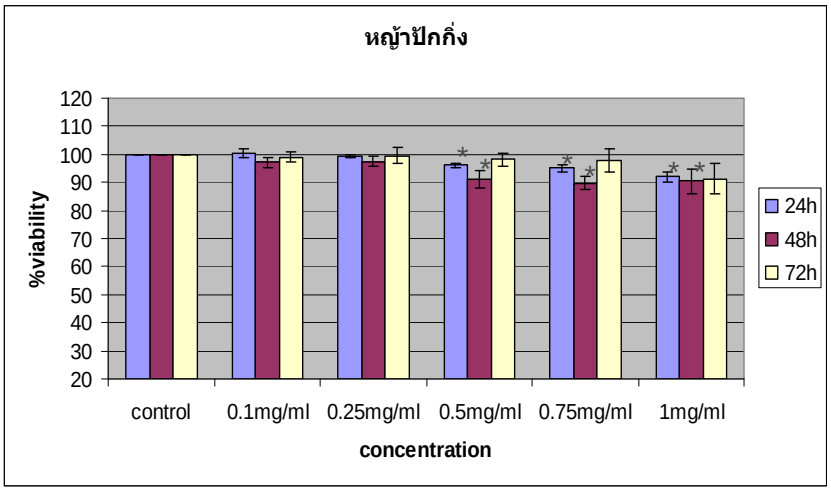
1B


กระเจี๊ยบแดง
%viability
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
control
0.1mg/ml
0.25mg/ml
0.5mg/ml
0.75mg/ml
1mg/ml
concentration
24h
48h
72h

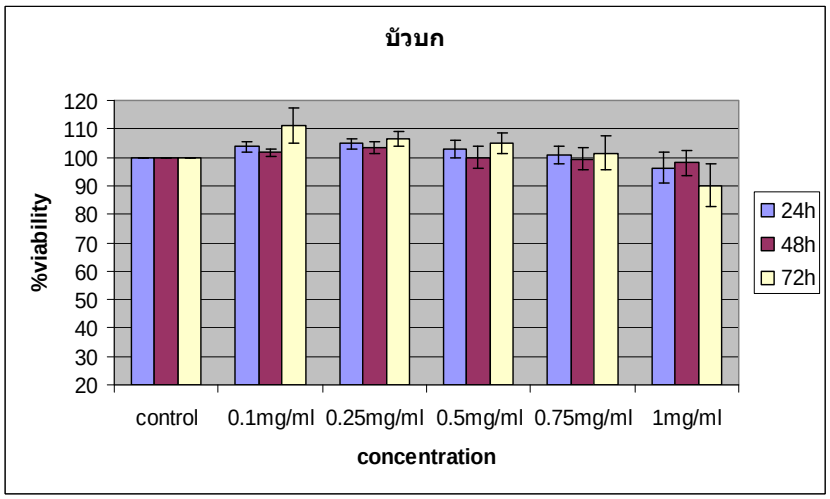
1C


ยอ
%viability
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
control
0.1mg/ml
0.25mg/ml
0.5mg/ml
0.75mg/ml
1mg/ml
concentration
24h
48h
72h

1D



1E



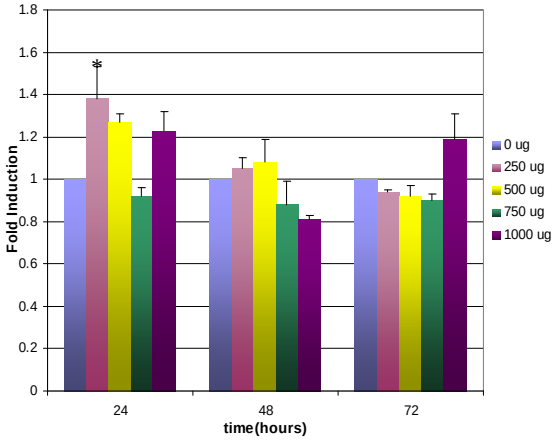
รูปที่ 1. ความเป็นพิษของสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์ HepG2 ถูกเพาะเลี้ยงและ incubate ด้วยสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ความเป็นพิษของสมุนไพรถูกทดสอบโดยดูการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ ระดับการอยู่รอดของเซลล์แสดงในรูปของ %viability Fold ± S.E.M (n=3)

*แสดงถึงการอยู่รอดของเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (p-value<0.05)

ฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อระดับการทำงานของ PON1

กวาวเครือขาวต่อระดับการทำงานของ PON1

ฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อการทำงานของเอนไซม์ PON1 ที่ระดับความเข้มข้นของกวาวเครือขาวที่แตกต่างกัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง กวาวเครือขาวความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 โดยมีเพียงความเข้มข้น 500 µg/ml เท่านั้น ที่เพิ่มระดับการทำงานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.01) ขณะที่ ที่เวลา 48 ชั่วโมงกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 250 และ 500 µg/ml และที่ 72 ชั่วโมง กวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2)

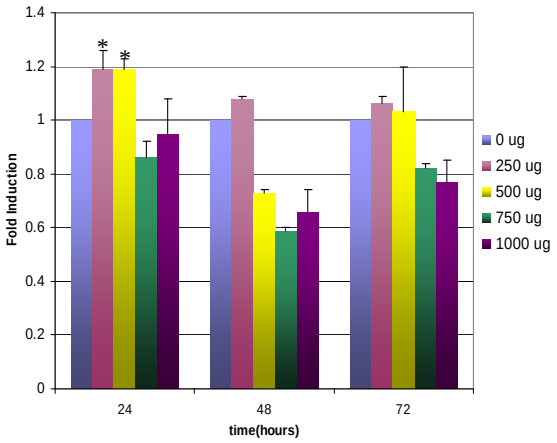


รูปที่ 2. ฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อระดับการทำงานของ PON1 เซลล์ HepG2 ถูกเพาะเลี้ยงและ incubate ด้วยกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการตรวจวัดโปรตีนและระดับการทำงานของ PON1 โดยแสดงในรูปของ Fold Induction ± S.E.M (n=4)
*แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของระดับการทำงานของ PON1 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (p-value<0.05)

กระเจี๊ยบแดงต่อระดับการทำงานของ PON1

ฤทธิ์ของกระเจี๊ยบแดงต่อการทำงานของเอนไซม์ PON1 ที่ระดับความเข้มข้นของกระเจี๊ยบแดงที่แตกต่างกัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ รูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง กระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 250 และ 500 µg/ml เพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ได้ โดยมีเพียงความเข้มข้น 500 µg/ml เท่านั้นที่

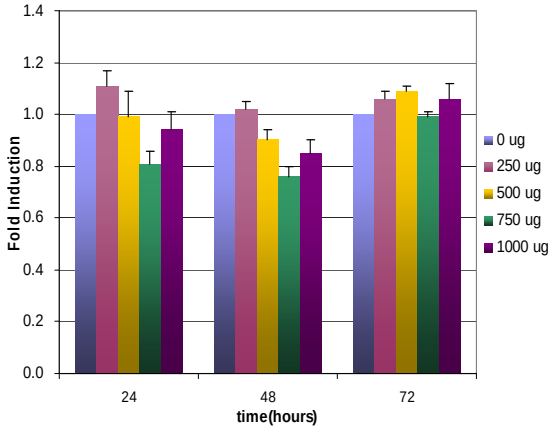
เพิ่มระดับการทำงาน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.03) ขณะที่ ที่เวลา 48 ชั่วโมง กระเจี๊ยบแดงเฉพาะที่ความเข้มข้น 250 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.03) และที่ 72 ชั่วโมง กระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 250 และ 500 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 ได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3. ฤทธิ์ของกระเจี๊ยบแดงต่อระดับการทำงานของ PON1 เซลล์ HepG2 ถูกเพาะเลี้ยงและ incubate ด้วยกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาทำการตรวจวัดโปรตีน และระดับการทำงานของ PON1 โดยแสดงในรูปของ Fold Induction ± S.E.M (n=4)
*แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของระดับการทำงานของ PON1 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ control (p-value<0.05)

ลูกยอต่อระดับการทำงานของ PON1

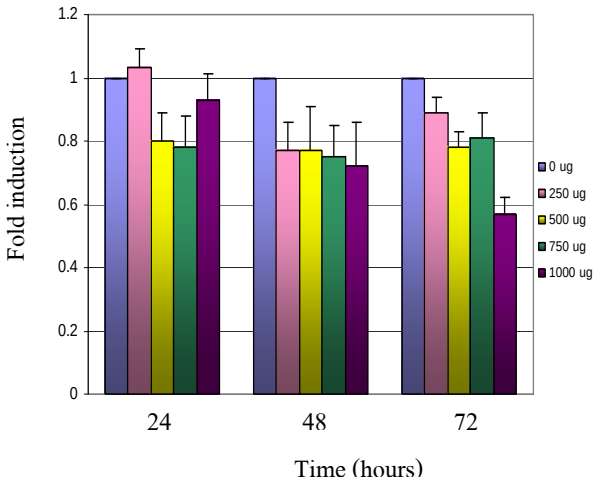
ฤทธิ์ของลูกยอต่อการทำงานของ PON1 ที่ระดับความเข้มข้นของลูกยอแตกต่างกัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ลูกยอที่ความเข้มข้น 250 µg/ml และที่เวลา 48 ชั่วโมง ลูกยอที่ความเข้มข้น 250 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่เวลา 72 ชั่วโมง ลูกยอที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4) และมีความเป็นพิษสูง



รูปที่ 4. ฤทธิ์ของลูกยอต่อระดับการทำงานของ PON1 เซลล์ HepG2 ถูกเพาะเลี้ยงและ incubate ด้วยลูกยอที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาทำการตรวจวัดโปรตีน และระดับการทำงานของ PON1 โดยแสดงในรูปของ Fold Induction ± S.E.M (n=4)

หญ้าปักกิ่งต่อระดับการทำงานของ PON1

ฤทธิ์ของหญ้าปักกิ่งต่อการทำงานของเอนไซม์ PON1 ที่ระดับความเข้มข้นของหญ้าปักกิ่งที่แตกต่างกัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ รูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่า หญ้าปักกิ่งที่ทุกความเข้มข้นและเวลาลดระดับการทำงานของ

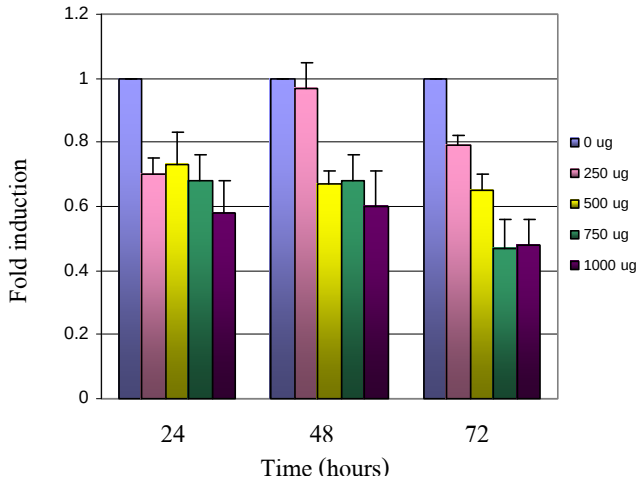


รูปที่ 5. ฤทธิ์ของหญ้าปักกิ่งต่อระดับการทำงานของ PON1 เซลล์ HepG2 ถูกเพาะเลี้ยงและ incubate ด้วยหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาทำการตรวจวัดโปรตีน และระดับการทำงานของ PON1 โดยแสดงในรูปของ Fold Induction ± S.E.M (n=4)

เอนไซม์ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.03) ยกเว้นที่ความเข้มข้น 250 µg/ml ที่ 24 ชั่วโมง ที่หญ้าปักกิ่งไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ PON1

บัวบกต่อระดับการทำงานของ PON1

ฤทธิ์ของบัวบกต่อการทำงานของเอนไซม์ PON1 ที่ระดับความเข้มข้นของบัวบกที่แตกต่างกัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml ณ เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ รูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่า บัวบกที่ทุกความเข้มข้นและเวลาลดระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.03)



รูปที่ 6. ฤทธิ์ของบัวบกต่อระดับการทำงานของ PON1 เซลล์ HepG2 ถูกเพาะเลี้ยงและ incubate ด้วยบัวบกที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 250, 500, 750 และ 1000 µg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาทำการตรวจวัดโปรตีน และระดับการทำงานของ PON1 โดยแสดงในรูปของ Fold Induction ± S.E.M (n=4)

วิจารณ์ผลการทดลอง

Paraoxonase1 เป็นเอนไซม์ที่ถูกเชื่อว่ามีคุณสมบัติในการลดและป้องกันหลอดเลือดแดงแข็ง เนื่องจากสามารถป้องกันการเกิด oxidation ของ LDL และ HDL ได้ในหนูทดลอง (Mackness M และคณะ, 1991, Shih และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลมากมายแสดงให้เห็นว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ที่ลดลงสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆโดยเฉพาะ atherosclerosis, coronary heart disease, cerebrovascular disease, familial, stroke, diabetes mellitus type II, hypercholesterolemia และ Parkinson's disease เป็นต้น ดังนั้นการเพิ่ม ระดับการทำงานของ PON1 อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและรักษาโรคดังกล่าวได้ การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุกรรม, สารเคมี, สิ่งแวดล้อม, การได้รับยาบางชนิด, การสูบบุหรี่

รวมถึงอาหารที่รับประทาน จากการศึกษาของ Jarvik และคณะ (2002) พบว่า ในอาสาสมัครที่ได้รับอาหารที่มี vitamin C และ vitamin E มีระดับการทำงานของ PON1 เพิ่มขึ้น แต่ยังไม่ทราบถึงกลไกการเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 ที่แน่ชัด นอกจากนี้ การออกกำลังกาย (Sklan และคณะ, 2004), การรับประทานแอลกอฮอล์ในปริมาณต่ำ (Rao และคณะ, 2003), การได้รับยาในกลุ่ม statin (Deakin และคณะ, 2003) และสาร polyphenol (Gouedard และคณะ, 2004) สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ได้เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลอง พบว่าสมุนไพรทั้งห้าชนิดคือ กวาวเครือขาว, กระเจี๊ยบแดง, บัวบก, หญ้าปักกิ่ง, และ ลูกยอ มีฤทธิ์ต่อระดับการทำงานของ PON1 แตกต่างกันไป โดยกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สามารถเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมง (p=0.01) ขณะที่ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง กวาวเครือขาวไม่สามารถเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ กระเจี๊ยบแดงสามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 500 และ 250 µg/ml ตามลำดับ (p=0.03 และ 0.03) ส่วนบัวบก, หญ้าปักกิ่ง, ลูกยอ ไม่มีฤทธิ์ในการเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและบางชนิดมีความเป็นพิษสูง

กลไกการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 ถูกศึกษากันมากโดยเฉพาะในกลุ่มของยาลดไขมัน, statin, ที่ได้แสดงให้เห็นว่า atorvastatin เพิ่มระดับการทำงานของ PON1 โดยการเพิ่มการสร้างสาย RNA (transcription) ผ่านทางการเพิ่มระดับการทำงานของ nuclear transcription factor ที่ชื่อว่า sterol regulator element binding protein-2 (SREBP-2) (Deakin และคณะ, 2003) หรือการเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 โดย pitavastatin ผ่านทาง farnesyl pyrophosphate pathway (Ota และคณะ, 2005) ขณะที่กลุ่มการวิจัยของ Gouedard และคณะ (2004) พบว่าสารในกลุ่ม polyphenol สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ PON1 โดยผ่านกลไกของ aryl hydrocarbon receptor (AhR)

การที่กวาวเครือขาว และกระเจี๊ยบแดงสามารถเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 ได้อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของการสร้างสาย RNA (transcription) หรือ ในระดับการถอดรหัสเป็นโปรตีน (translation) นอกจากนี้ประสิทธิภาพการทำงานของ PON1 ขึ้นอยู่กับ free sulhydryl group ที่ cystetine ที่ตำแหน่ง 284 ซึ่งกาวเครือขาว และกระเจี๊ยบแดงอาจสนับสนุนทำให้สภาวะแวดล้อมอยู่ในสภาวะรีดิวซ์ หรืออาจเกิดจากการที่สารออกฤทธิ์บางชนิดที่มีอยู่ในกาวเครือขาว และกระเจี๊ยบแดง สามารถไปกระตุ้นการทำงานของสัญญานบางอย่างภายในเซลล์ที่สามารถเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 ได้ ดังนั้นการศึกษาในเชิงลึกถึงกลไกที่แท้จริงในการเพิ่มระดับการทำงานของ PON1 ด้วยกาวเครือขาว และกระเจี๊ยบแดง และสารออกฤทธิ์จึงจำเป็นอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, and La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human

paraoxonase alloenzymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc*. *Biol.* 1998, (18), 1617-1624.

2. Aviram M, and Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2002, (957), 146–161.
3. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003, 133(10), 3248S-3254S.
4. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976, (72), 248-254.
5. Corbett J. R. The Biochemical Mode of Action of Pesticides. *Academic Press, New York*. 1974.
6. Deakin S P and James R W. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clinical Science*. 2004, (107), 435-447.
7. Deakin, S., I. Leviev, M. Gomaraschi, L. Calabresi, G. Franceschini, and R. W. James. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high-affinity, saturable, desorption mechanism. *J. Biol. Chem*. 2001, (277), 4301–4308.
8. Deakin S, Leviev I, Guemier S, and James R. W. Simvastatin modulates expression of PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003, (23), 2083-2089.
9. Gouedard C, Barouki R, and Morel Y. Dietary Polyphenols Increase Paraoxonase 1 Gene Expression by an Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Mechanism. *Molecular and cellular biology.* June 2004, 5209-5222.
10. Jarvik G P, Tsai N. T, McKinstry L A, Wani R, Brophy V H, Richter R J, Schellenberg G D, Heagerty P J, Hatsukami T S, and Furlong C E. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, (22),1329-1333.
11. Harel M, Aharoni A, Gaidulov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli R B, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman J L, and Tawfik D S. Structure and evolution of serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2004, (11), 412-419.
12. Kameoka S, Leavitt P, Chang C & Kuo S. M. Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids. *Cancer Lett*. 1999, (146), 161-167.

13. Mackness B, Durrington P, and Connelly P. Human serum paraoxonase. *Gene pharmacol*. 1998, (31), 329-336.
14. Mackness M, Arrol S, and Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipid peroxides in low-density lipoprotein. *FFBS Lett*. 1991, (286), 152-154.
15. Mackness M, Mackness B, Durrington P, Connelly P, and Hegele R. Paraoxonase : biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1996, (7), 69-76.
16. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003, (38), 153-163.
17. Ota K, Suihiro T, Arii K, Ikeda Y, Kumon Y, Osaki F, and Hashimoto K. Effect of pitavastatin on transactivation of human serum paraoxonase 1 gene. *Metabolism clinical and experiment*. 2005, (54), 142-150.
18. Rao M N, Marmillot P, Gong M, Palmer D A, Seeff L B, Strader D B, and Lakshman M R. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and human. *Metabolism*. 2003, (52), 1287-1294.
19. Shih D. M., Gu L., Hama S., Xia Y. R., Navab M., Fogelman A. M., Lusis A. J. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest*. 1996, (97),1630-1639.
20. Shih D, Gu l, Xia R, Navab M, Li W, Hama S, Castellani L, Furlong C, Costa L, and Fogelman A. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998, (394), 284-287.
21. Sorenson R, Bisgaier C, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids apolipoprotein A-1 stabilize activity. *Aterioscler Thromb Vas Biol.* 1999, (19), 2214-2225.

Output จากโครงการ การเพิ่มระดับการทำงานของ พาราออกโซเนส 1 ด้วยสมุนไพรไทย

1. ผลงานตีพิมพ์

เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ร่วมกับโครงการวิจัยอื่นอีก 2 โครงการ ซึ่งทำให้มีการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ 2 คน จากนักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ สาขาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำให้มีส่วนในการสนับสนุนในความสำเร็จ และงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติและระดับชาติ

- Yomchot J, Lawanprasert S, Phivthong-ngam L, Sanvarinda Y, Porntadavity S. Effect of Curcuma comosa powder on serum paraoxonase activities in Cholesterol-diet fed rabbits. Thai J pharmacolo 2008;1:83-7.

- Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S, Porapakkham P, Chinwattana K, Deakin S, Porntadavity S. Effect of atorvastatin on the paraoxonase 1 (PON1) and oxidative status. Pharmacological Reports 2009;61:892-8.

2. มีการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่จากนักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ 2 คน

3. การนำเสนอวิชาการ

3.1. ที่งานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ ๔ (2550) ได้รับรางวัลชมเชย ประเภท Professional Vote ในงานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ ๔ (2550) และมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารที่ประชุมวิชาการ 1 เรื่อง

- กมลชนก งามขำ และ สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์ เรื่อง การเพิ่มระดับการทำงานของ พาราออกโซเนส 1 ด้วยสมุนไพรไทยที่มีฟลาโวนอยด์ IRPUS 49.

3.2. การนำเสนอผลงานในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 แบบโปสเตอร์ เรื่อง Hibicud Sabdariffa extract ncreases paraoxonase 1 activity, Porntadavity S, Ngamkham K.