ฤทธิ์ของพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ต่อเอนไซม์ Cytochrome P450 2A6

Effect of medicinal folk plants from Ban-Ang-Ed official Community Forest Project (The Chaipattana Foundation) on Cytochrome P4502A6 enzyme

จันทร์ทิพย์ อนันตกูล[1], ศรินยา ทองแจ่ม[1], พรพิมล รงค์นพรัตน์[2] และ ทรงกลด สารภูษิต[1*]

Janthip Anantakul[1], Sarinya Thongjam[1], Pornpimol Rongnoparut[2] and Songklod Sarapusit[1*]

[1]*ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2]*ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*

บทคัดย่อ

เอนไซม์ CYP2A6 ที่พบมากที่ตับ มีหน้าที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารนิโคตินในบุหรี่ : ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อพฤติกรรมการสูบบุหรี่ทำให้ต้องการสูบบุหรี่เพิ่มมากขึ้น งานวิจัยนี้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ที่ปราชญ์ชาวบ้านใช้ให้การรักษาชาวบ้านที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลองผลการศึกษาพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ CYP2A6 แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า p-value < 0.05 โดยสารสกัดพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์กระตุ้น CYP2A13 ได้ดีได้แก่ รากต้นระย่อมน้อย รากต้นค้างคาวดำ ใบต้นเข็มไอเดีย เป็นต้น และสารสกัดพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง CYP2A6 ได้ดี ได้แก่ ใบต้นเบญจมาศแมว รากต้นเข็มไอเดีย ใบต้นมะฮึก ใบต้นลายกนก ใบดีงูต้น เป็นต้น

คำสำคัญ : เอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 / นิโคติน / ป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด / การยับยั้ง / การกระตุ้น

Abstract

The liver specific cytochrome P4502A6 (CYP2A6) plays an important role in degrading of tobacco specific nicotine, and excreting nicotine through urine. Interestingly, genetic polymorphism and enzymatic activity of CYP2A6 associated with smoking behavior. In this study, the effect of herb extracts from Ban-Ang-Ed official community forest project on CYP2A6 enzymatic activity (*in vitro*) based on local intellectual suggestion for health treatment for local resident were investigated. The results significantly showed the effect of plant extracts on CYP2A6 activity (p-value < 0.05). In this study, the *Rauvolfia* sp(roots), the *Tacca chantrieri* (roots), the *Aidia wallichiana* (leaves) could activate CYP2A13 enzyme activity. On the other hand, the *Ageratum conyzoides* (leaves), the *Aidia wallichiana*(roots), Mahug (leaves), and Laykanok (leaves) could inhibit CYP2A13 enzyme activity *in vitro*.

Keywords : Cytochrome P450 2A6 / Nicotine / Ban-Ang-Ed official Community Forest Project / inhibition / activation

***Corresponding author.** E-mail: songklod@buu.ac.th

1. บทนำ

ในปัจจุบันโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ถือว่าเป็นปัญหาสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากในบุหรี่ประกอบไปด้วยสารเคมีต่างๆ มากกว่า 4,000 ชนิด ทั้งที่เป็นสารพิษและสารก่อมะเร็งที่จะได้รับเมื่อมีการสูบเข้าไปในปอด ก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เป็นผลมาจากสารนิโคตินที่พบในบุหรี่ เข้าไปกระตุ้นสมองส่วนกลางให้หลั่งสารโดปามีนออกมามากขึ้น โดยสารชนิดนี้จะไปส่งผลทำให้ผู้สูบบุหรี่ เกิดความสบายใจ ปราศจากความเครียดต่างๆ ผู้สูบบุหรี่จึงยังคงสูบบุหรี่ต่อไป เพื่อรักษาระดับนิโคตินในเลือดให้อยู่ในระดับปกติ จึงเป็นผลทำให้ผู้สูบบุหรี่ได้รับสารพิษที่อยู่ในบุหรี่เข้าไปภายในร่างกาย (Hukkanen and Benowitz2005) อย่างไรก็ตามเมื่อสารนิโคตินเข้ามาภายในร่างกาย สารนิโคตินจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่อยู่ในตับซึ่งจะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) เพื่อเปลี่ยนสารนิโคตินให้เป็นสารประกอบโคตินิน (Cotinine) เพื่อที่จะสามารถกำจัดออกนอกร่างกายได้ โดยเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารนิโคตินในตับนั้นคือเอนไซม์ CYP2A6 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 ที่สามารถย่อยสลายสารนิโคตินได้ดีด้วยค่า K_m ต่อนิโคตินที่ต่ำและ V_{max} ที่สูง (Hukkanen *et al*., 2005; Su *et al*., 2000) ซึ่งการย่อยสลายสารนิโคตินด้วยเอนไซม์ CYP2A6 เป็นกระบวนการหลักในการกำจัดนิโคตินออกนอกร่างกายและส่งผลโดยตรงต่อพฤติกรรมการสูบบุหรี่ ทั้งนี้เพราะมีรายงานการศึกษาพบว่า ผู้สูบบุหรี่ที่มียีนที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์เหลือเพียง 50% จะมีการสูบบุหรี่ต่อวันน้อยกว่าผู้ที่มียีนของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ (Wild-type) รวมถึงมีความเสี่ยงในการติดสารนิโคตินน้อยลงและเลิกสูบบุหรี่ได้ง่าย (Di *et al*., 2009; Schoedel *et al*., 2004; Sellers *et al*., 2000) แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทสำคัญต่อพฤติกรรมการสูบบุหรี่นอกเหนือไปจากความสามารถในการย่อยสลายนิโคตินแล้วเอนไซม์ CYP2A6 สามารถย่อยสลายสารประกอบอื่นๆ ได้ เช่นสารก่อมะเร็ง NNK ในบุหรี่หรือสาร coumarin ไปเป็นผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin (ปฏิกิริยา coumarin-7-hydroxylase) ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในหลอดทดลอง (Hukkanen *et al*., 2005)

เนื่องจากการเสพติดนิโคตินเป็นปัญหาสำคัญที่จำเป็นต้องได้รับการแก้ไข ในปัจจุบันจึงมีการคิดค้นวิธีมากมายเพื่อช่วยในการบำบัดและช่วยผู้เสพติดบุหรี่เลิกจากการอาการติดบุหรี่ด้วยนิโคตินทดแทนต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นในรูปของนิโคตินหมากฝรั่ง ชนิดเคี้ยวและนิโคตินชนิดแผ่นแปะผิวหนัง แต่การบำบัดด้วยวิธีนี้ไม่ได้รับความนิยม ทั้งยังส่งผลข้างเคียงแก่ผู้ใช้ เพราะฤทธิ์ของยาไปลดการทำงานของตัวรับนิโคตินในสมองที่ส่งผลให้ลดอาการเสพนิโคตินลง มีผลข้างเคียงกับผู้ใช้ยา (Carrozzi *et al*., 2008; Gonzalez *et al*., 2006) และเนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 มีบทบาทในการย่อยสลายนิโคตินในคน ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จึงน่าจะเป็นอีกหนึ่งวิธีในการช่วยบำบัดอาการเสพติดบุหรี่ได้ (Di *et al*, 2009; Hukkanen *et al*., 2005) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มากนัก โดยมีเพียงสาร methoxsalen (8-methoxypsoralen; 8-MOP) ที่พบว่าสามารถยับยั้งการย่อยสลายนิโคตินของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ (Miyazaki *et al*., 2005; von Weymarn *et al*., 2007) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ผ่านกลไกทั้งแบบแข่งขันที่ผันกลับได้ (competitive inhibition) และกลไกยับยั้งการย่อยสลายแบบ mechanism-based inhibition เมื่อใช้ coumarin เป็นตัวตรวจสอบ โดยสามารถลดการย่อยสลายนิโคตินและลดการกำจัดนิโคตินออกจากร่างกายได้ (Sellers *et al*., 2000; Sellers *et al*., 2003; Siu and Tyndale, 2007; von Weymarn *et al*., 2007) และเมื่อผู้เสพบุหรี่ได้รับ 8-MOP ร่วมกับการได้รับนิโคตินจะเพิ่มระดับของนิโคตินในกระแสเลือดและลดการสูบบุหรี่ลง โดยใช้เวลานานขึ้นก่อนที่จะสูบมวนต่อไป (Sellers *et al*., 2000) อย่างไรก็ดี 8-MOP ส่งผลกระทบข้างเคียงต่อผู้ใช้จึงต้องเลิกใช้ (Siu and Tyndale, 2007)

เนื่องจากความนิยมสารสมุนไพรจากธรรมชาติ ทำให้เกิดการศึกษาหาสารสำคัญจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้เช่น สาระสำคัญจากรากของพืช *Angellica gigas* (Yoo *et al*., 2007) หรือสารสำคัญจากพืชฟ้าทะลายโจร (Pouyfung *et al*., 2013) ที่เป็นพืชที่พบได้ง่ายในประเทศเกาหลีใต้และประเทศไทยตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในพืชสมุนไพรธรรมชาติที่รับประทานได้ทั่วไปโดยไม่มีอันตรายนั้นน่าจะมีสาระสำคัญที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อผู้ใช้ ซึ่งน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่ช่วยในการป้องกันการเสพติดบุหรี่ และลดระดับความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจในผู้สูบบุหรี่ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งค้นหาสารสกัดจากธรรมชาติในประเทศไทยที่มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติสูงและเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ง่าย แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานต่อเอนไซม์ CYP2A6 เพื่อช่วยลดการสูบบุหรี่ของคนในชุมชนทั่วไปที่จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทยรวมถึงเป็นองค์ความรู้ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและน่าจะเป็นหนึ่งในแนวทางเลือกที่สำคัญในลดการเป็นโรคมะเร็งปอดทั้งในผู้สูบบุหรี่และผู้ใกล้ชิด โดยในการทดลองนี้ผู้วิจัยศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของพืชสมุนไพรจากโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) โดยมุ่งเน้นศึกษาพืชสมุนไพรที่ชาวบ้านนำมารับประทานเป็นยารักษาโรค เพื่อใช้ในการลดการสูบบุหรี่ของชาวบ้านในชุมชน ป้องกันอันตรายจากบุหรี่ต่อบุคคลใกล้ชิด รวมทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากพืชต่อไป

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด

นำพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ปราชญ์ชาวบ้านแนะนำให้ชาวบ้านในละแวกใกล้เคียงใช้เพื่อบำรุงสุขภาพและรักษาโรคและจำแนกสายพันธ์โดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพามาทำความสะอาด สับเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำพืชสมุนไพรมาบดให้ละเอียดแบ่งพืชสมุนไพรใส่ถุงผ้าดิบ นำไปแช่ใน 95% เอทานอลในสัดส่วน 1 กรัม : 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการกรองสารสกัด นำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ไประเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำส่วนสกัดที่ได้ละลายด้วย Absolute Ethanol ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mg/ml จากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลอง

2.2 การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CYP2A6 และ CPR

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิด DNA ที่มียีน NADPH-cytochrome P450 reductase หรือ CPR (pINIII-flrat CPR ได้รับจาก Prof. Dr. Jung-Ja Kim จาก Medical College of Wisconsin) และเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน CYP2A6 (pKKK-Δ-23-2A6 ได้รับจาก Assoc. Prof. Dr. Emily Scott จาก University of Kansus) จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CPR (Sarapusit *et al*., 2008) และ CYP2A6 (DeVore *et al*., 2008) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE

2.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ rat CPR

ศึกษาปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ CPR ไปยังตัวรับอิเล็กตรอน (Cytochrome c) โดยบ่มเอนไซม์ CPR บริสุทธิ์ที่ได้จากขั้นตอน 2.1 ข้างต้นร่วมกับ Cytochrome c (40 uM) ในสารละลาย 300 mM Kpi buffer pH 7.7 จากนั้นเติมสารละลาย NADPH (50 uM) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 550 นาโนเมตร (การเพิ่มขึ้นของ cytochrome c ในรูปรีดิวซ์; Sarapusit *et al*., 2008) ทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ โดยบ่มเอนไซม์ CPR และ cytochrome c ร่วมกับน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 µg/ml แล้วเริ่มปฏิกิริยาด้วยสารละลาย NADPH ทำการทดลองทั้งหมด 24 ตัวอย่างโดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกันวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS และ Prism5 เพื่อหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (remaining activity) เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CPR ในสภาวะที่ไม่มีน้ำสมุนไพรหรือน้ำผลไม้

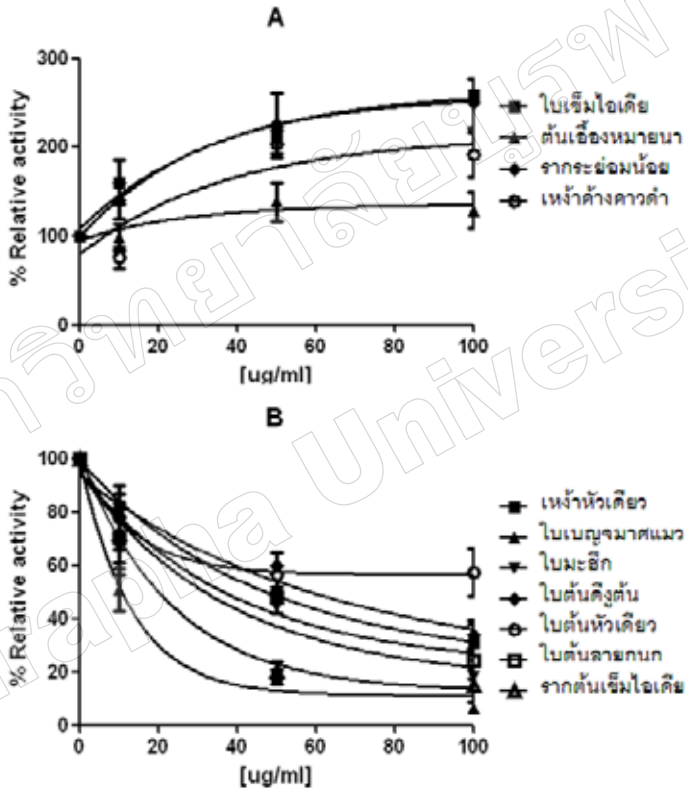
2.4 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CYP2A6

ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของเอนไซม์ CYP2A6 ต่อสารประกอบเรืองแสง Coumarin ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยบ่มเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ (100 µg) ร่วมกับเอนไซม์ CPR (10 unit) ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ที่มี Dilaurolphatidyl-choline (DLPC) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติมสารตั้งต้น 20 µM Coumarin และตัวให้อิเล็กตรอน 50 µM NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin โดยใช้เครื่อง Fluorescence Spectroscopy เป็นเวลา 10 นาทีสำหรับการทดลองควบคุมจะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาการสร้างผลิตภัณฑ์เมื่อปราศจากตัวให้อิเล็กตรอน NADPH หรือ เอนไซม์ CPR โดยทั้งหมดการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 โดยทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 บริสุทธิ์ (100 µg) ร่วมกับเอนไซม์ CPR (10 unit) ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ที่มี DLPC ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติม 20 µM Coumarin และสารสกัดพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/ml จากนั้นจึงเริ่มปฏิกิริยาโดย 50 µM NADPH ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำค่าการตรวจสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 มาเปรียบเทียบค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (ปฏิกิริยาควบคุม) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกันแล้ววิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม prism5 และ SPSS

3. ผลและอภิปราย

ทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2A6 ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue เมื่อทำบริสุทธิ์และทำการตรวจสอบโปรตีน พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 51.34 kDa และเอนไซม์ CPR ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 74.13 kDa เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ โดยวัดปฏิกิริยาการเพิ่มขึ้นของสารผลิตภัณฑ์ 7-hydrxycoumarin พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 มีค่า specific activity เท่ากับ 6.29 ± 0.14 umol/7-hydroxycoumarin /min/µg protein และเอนไซม์ CPR มีค่า specific activity เท่ากับ 53.91 ± 2.79 umol/Cytc reduction/min/mg protein ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (DeVore *et al*., 2008, Sarapusit *et al*., 2008)

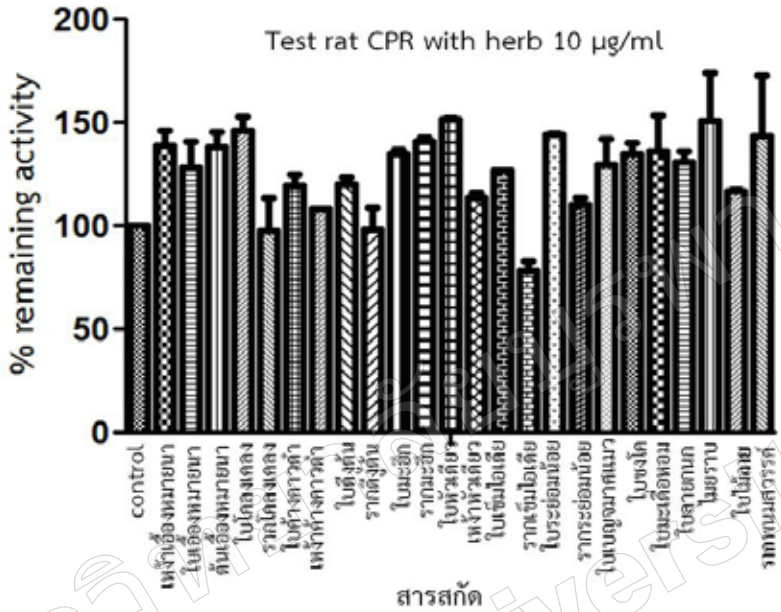
เมื่อทำการวัดการฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร (ภาพที่ 1 A-B) ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ทำการทดลองจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 แตกต่างกัน (Anova, p-value < 0.05) โดยแบ่งออกได้เป็นสี่กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่งพืชที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (ภาพที่ 1 A) ได้แก่ ใบต้นเข็มไอเดีย, รากต้นระย่อมน้อย, เหง้าต้นค้างคาวดำ, ส่วนลำต้นของต้นเอื้องหมายนา (t-test, p-value < 0.05) กลุ่มที่สองพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้มีประสิทธิภาพ (ค่า IC_{50} < 100 µg/ml: ภาพที่ 1 B) ได้แก่ ใบต้นเบญจมาศแมว (IC_{50} = 10.25 µg/ml), รากต้นเข็มไอเดีย (IC_{50} = 18.91 µg/ml), ใบต้นมะฮึก (IC_{50} = 40.39 µg/ml), ใบต้นลายกนก (IC_{50} = 63.95 ug/ml), เหง้าต้นหัวเดียว (IC_{50} = 73.74 µg/ml), ใบต้นดีงูต้น (IC_{50} = 75.83 ug/ml), ใบต้นหัวเดียว (IC_{50} = 86.36 ug/ml) กลุ่มที่สามพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 แต่มีประสิทธิภาพต่ำ (ค่า IC_{50} > 100 µg/ml) ได้แก่ ใบต้นระย่อมน้อย (IC_{50} = 120.9 ug/ml), ไมยราบ (IC_{50} = 141.7 ug/ml), ใบต้นค้างคาวดำ (IC_{50} = 158.7 ug/ml), ใบต้นเอื้องหมายนา (IC_{50} = 173.2 ug/ml), ใบต้นชงโค (IC_{50} = 273.7 ug/ml), ใบต้นมะเดื่อหอม (IC_{50} = 292.6 ug/ml), และเหง้าต้นเอื้องหมายนา (IC_{50} = 849.2 ug/ml), ตามลำดับ (t-test, p-value <0.05) และกลุ่มที่สี่คือ กลุ่มที่ไม่ออกฤทธิ์กระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้แก่ รากต้นดีงูต้น, รากต้นโคลงเคลง, รากต้นมะฮึกและใบต้นไม้ลาย



ภาพที่ 1 (A-B)ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 100 µg/ml ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 เปรียบเทียบกับสารละลาย 1 ไมโครลิตร ของเอทานอล 99.5% (control) เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS และ GraphPad Prism 5

เนื่องด้วยเอนไซม์ CPR ทำหน้าที่สำคัญในการขนส่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ cytpchrome P450 อื่นๆ ในการเร่งปฏิกิริยา ผลกระทบใดของสารสกัดพืชสมุนไพรจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ทำการศึกษาจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ cytochrome P450 อื่นๆ เช่น เอนไซม์ CYP3A4 และเอนไซม์ CYP2C9 เมื่อทำการทดสอบในหลอดทดลองได้ เมื่อทำการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10 µg/ml พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ CPR แตกต่างกัน (Anova, p-value < 0.05) (ภาพที่ 2A) โดยพืชในกลุ่มที่ออกฤทธิ์การกระตุ้นการทำงานของ rat CPR ได้แก่ เหง้าเอื้องหมายนา, ใบเอื้องหมายนา, ต้นเอื้องหมายนา, ใบโคลงเคลง, ใบค้างคาวดำ, เหง้าค้างคาวดำ, ใบดีงูต้น, ใบมะฮึก, รากมะฮึก, ใบหัวเดียว, ใบเข็มไอเดีย, รากระย่อมน้อย,

ใยระย่อมน้อย, ใบเบญจมาศแมว, ใบซงโค, ใบมะเดื่อหอม, ใบลายกนก,ไมยราบ, ใบไม้ลาย และรากพนมสวรรค์ (t-test, p-value < 0.05) และพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CPR ได้แก่ รากโคลงเคลง, รากดีงูต้น และรากเข็มไอเดีย (t-test,p-value < 0.05) ซึ่งฤทธิ์ของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ CPR ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมที่ความเข้มข้นของสารสกัด 50 µg/ml และ 100 µg/ml (ไม่ได้แสดงผล) ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ CPR เกี่ยวข้องกับการรับ-ส่งอิเล็กตรอน สารที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CPR ได้ดี น่าจะต้องมีความสามารถในการแย่งรับอิเล็กตรอนที่ได้รับจาก NADPH ก่อนที่จะส่งอิเล็กตรอนต่อให้โปรตีนตัวรับ ไซโตรโครมซี ในหลอดทดลอง



ภาพที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (remaining activity) ของสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้น 10 µg/ml กับเอนไซม์ CPR เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับสารสะลายเอทานอล 99.5% การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้งและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS และ GraphPad Prism 5

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าพืชสมุนไพรบางชนิดจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด ได้แก่ ใบต้นเข็มไอเดีย, รากต้นระย่อมน้อย, เหง้าต้นค้างคาวดำ, ส่วนลำต้นของต้นเถื่องหมายนา ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 จำเป็นต้องระมัดระวัง เมื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคให้กับชาวบ้านในบริเวณข้างเคียงที่สูบบุหรี่ในระหว่างรับประทานพืชสมุนไพรเหล่านี้ เพราะอาจส่งผลให้เกิดการย่อยสลายสารนิโคตินเร็วขึ้น จึงสูบบุหรี่เพิ่มมากขึ้นได้ ในทางตรงข้าม แม้สารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดจากป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดี เช่น ใบต้นเบญจมาศแมว รากต้นเข็มไอเดียใบต้นมะฮึก ใบต้นลายกนกซึ่งอาจนำประยุกต์ใช้เพื่อการลดการสูบบุหรี่ได้แต่ยังจำเป็นต้องศึกษาถึงความจำเพาะในการยับยั้ง เพื่อป้องกันอันตกริยาอันอาจจะเกิดขึ้นของสารสกัดสมุนไพรที่อาจเกิดขึ้นกับเอนไซม์ Cytochrome P450 อื่นๆ ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายยารักษาโรค (Herb-drug interaction) เพื่อนำมาใช้ในการช่วยลดการเกิดโรคมะเร็งปอดในผู้สูบบุหรี่ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

4. บทสรุป

โดยสรุปผลการศึกษาที่ได้พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรจากโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ที่ปราชญ์ชาวบ้านแนะนำให้ชาวบ้านนำไปรับประทานเพื่อรักษาโรคได้อย่างปลอดภัยหลายชนิด มีศักยภาพที่ดีที่จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยลดการสูบบุหรี่ ทั้งนี้เพราะสารสกัดเหล่านี้ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 (เช่น ใบต้นเบญจมาศแมว (IC_{50} = 10.25 µg/ml) รากต้นเข็มไอเดีย (IC_{50} = 18.91 µg/ml)) ใบต้นมะฮึก (IC_{50} = 40.39 µg/ml), ใบต้นลายกนก (IC_{50} = 63.95 ug/ml) ที่โดยปกติทำหน้าที่ย่อยสลายสารนิโคติน ทำให้ระดับนิโคตินในเลือดลดต่ำลง ส่งผลให้อยากสูบบุหรี่อีก สาระสำคัญในสารสกัดเหล่านี้เมื่อยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 จะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายนิโคตินช้าลง คงระดับนิโคตินในเลือด และยืดระยะเวลาที่จะสูบบุหรี่ออกไป ทำให้ลดโอกาสที่ร่างกายจะได้รับสารก่อมะเร็งรุนแรงได้ อย่างไรก็ตามพืชสมุนไพรบางชนิดออกฤทธิ์

กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ซึ่งต้องระมัดระวังในการนำไปใช้รักษาโรคให้ชาวบ้านที่สูบบุหรี่ในระหว่างที่รับประทานสมุนไพร เพราะอาจทำให้เกิดความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งปอดจากการสูบบุหรี่เพิ่มขึ้นได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวมณีนุช อิ่มเอี่ยม และนางสาวธนสร สมทอง นิสิตภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่มีส่วนช่วยในการทำงานวิจัย และงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนด้านงานวิจัยจากเงินงบประมาณงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล มหาวิทยาลัยบูรพา (#56.2556)

6. เอกสารอ้างอิง

Carrozzi, L., Pistelli, F. and Viegi, G (2008) Pharmacotherapy for smoking cessation *Therapetic Advance Respiratory Diseases,* 2; 301-317.

DeVore, N.M., Smith, B.D., Urban, M.J. and Scott, E.E. (2008) Key residues controlling phenacetin metabolism by human cytochrome P450 2A enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, 36, 2582-2590.

Di, Y.M., Chow, V.D.W., Yang, L.P., Zhou, S.F. (2009). Structure, function, regulation and polymorphism of Human Cytochrome P450 2A6. *Current Drug and Metabolism*, 10, 754-780.

Gonzales, D., Rennard, S.I., Nides, M., Oncken C, Azoulay, S., Billing, C.B. (2006) Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA* 296, 47-55.

Hukkanen, J.P. and Benowitz, N.L. (2005) Metabolism and disposition kinetics of Nicotine. *Pharmacology Review.* 57, 79–115.

Miyazaki, M., Yamazaki, H., Takeuchi, H., Saoo, K., Yokohira, M., Masumura, K.I, et al. (2005) Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrodamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung carcinomas. *Carcinogenesis*. 26, 1947-1955.

Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2013). Mechanism-based- Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by Rhinacanthus nasutus Constituents. *Drug Metabolism and Pharmacokinetic.* (Equb ahead of print)

Sarapusit, S., Xia, C.W., Misra, I., Rongnoparut, P., Kim, J.J.P. (2008). NADPH-Cytochrome P450-Oxidoreductase from the Mosquito *Anopheles minimus*: Kinetic Studies and The influence of leu86 and Leu219 on Cofactor Binding and Protein Stability. *Archive in Biochemistry and. Biophysic*, 477, 53-59.

Schoedel, K.A., Hoffmann, E.B., Rao, Y., Sellers, E.M., Tyndale, R.F. (2004). Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetic.* 14, 615-626.

Sellers, E.M., Kaplan, H.L, and Tyndale, R.F. (2000) Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clinical Pharmacology and Therapy*. 68, 35-43.

Sellers E.M, Ramamoorthy, Y., Zeman, M.V., Djordjevic, M.V, and Tyndale, R.F. (2003) The effect of methoxsalen on nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism in vivo. *Nicotine Tobacco Research.* 5, 891-899.

Siu, E.C.K. and Tyndale, R.F. (2007) Non-nicotinic therapies for smoking cessation. *Annual Review in Pharmacology and Toxicology*. 47, 541-64

Su, T., Bao, Z., Zhang, Q-Y., Smith, T.J, Hong, J-Y., and Ding, X. (2000) Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res*earch. 60, 5074-5079.

von Weymarn, L.B., Chun, J.A., Knudsen, G.A., Hollenberg, P.F. (2007) Effects of eleven isothiocyanates on P450 2A6- and 2A13-catalyzed coumarin 7-hydroxylation.. *Carcinogenesis*. 27, 782-790.

Yoo, H.H., Lee, M.W., Kim, Y.C., Yun, C-H., Kim, D-H. (2007) Mechanism-based inactivation of cytochrome p450 2a6 by decursinol angelate isolated from *Angelica gigas*. *Drug Metabolsim and Disposition.* 35, 1759-1765.