

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี450 2เอ6 และไซโตโครม พี450 2เอ13  
ของสารสกัดจากขิงและมะเฟือง

Inhibitory of the Human Cytochrome P450 2A6 and Cytochrome P450 2A13  
by Ginger Extracts and Starfruits Extracts

นันทิภาคย์ รัตนพันธุ์ นันทนาภรณ์ บุพพัฒน์สมัย เศรษฐพันธุ์ แข่งขัน และ ทรงกลด สารภูษิต\*

Nuntipak Rattanapun, Nanthanaporn Bupphanhasamai, Setthaphan Kangkan and Songklod sarapusi\*

ภาควิชาชีวเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศทางนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biochemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

Received : 11 June 2017

Accepted : 8 July 2017

Published online : 19 July 2017

**บทคัดย่อ**

เอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 ที่ดับและ 2A13 ที่ระบบทางเดินหายใจ เป็นเอนไซม์ที่สำคัญ เกี่ยวเนื่องกับพฤติกรรมกรรมกรสูบบุหรี่และอัตราการเป็นโรคมะเร็งปอดชนิด Adenocarcinoma ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง ด้วยเหตุนี้การลดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 จึงเป็นอีกหนึ่งในแนวทางรักษาอาการเสพติดบุหรี่และช่วยลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดได้ ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าขิงและมะเฟืองสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ได้ ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่าส่วนสกัดในขิงและมะเฟืองมีกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ที่ฤทธิ์การยับยั้งขึ้นอยู่กับ NADPH เวลาและความเข้มข้นของสารยับยั้ง โดยส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของมะเฟืองมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $8.82 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$  และ  $20.44 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$  ต่อเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของขิงมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $1.80 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$  และ  $11.81 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$  สำหรับเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ตามลำดับ

**คำสำคัญ :** ไซโตโครม พี450 (CYP2A6 และ CYP2A13) การยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้

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

### Abstract

The liver specific cytochrome P450 2A6 and the lung-specific 2A13 enzyme has been shown to associate with smoking behavior and adenocarcinoma lung cancer rate in smokers. Therefore, inhibition of these two enzymes by specific inhibitor could be an aid in smoking cessation and lung cancer prevention. Our preliminary studied indicated that the ginger and starfruits juices could potentially inhibit the CYP2A6 and CYP2A13 enzyme. In this study, both plant extracts could inhibit both enzymes in an irreversible mode in which the inhibition depends on the NADPH-, time-, and concentration of inhibitor. Ethyl acetate fraction of starfruits extract could inhibit CYP2A6 and CYP2A13 enzymes with an  $IC_{50}$  of  $8.82 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$  and  $20.44 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$ , respectively. Similarly, the ethyl acetate fraction of the ginger extract could inhibit CYP2A6 and CYP2A13 enzymes with an  $IC_{50}$  of  $1.80 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$  and  $11.81 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ , respectively.

**Keywords :** Cytochrome P450 2A6 and 2A13, irreversible inhibition

### บทนำ

เอนไซม์ Cytochrome P450 2A6 และ 2A13 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 (CYP, P450) ที่มีหมู่ heme เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารต่างๆทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่น ฮอร์โมน ยา หรือสารปนเปื้อนในอาหารและสิ่งแวดล้อม ในคนพบว่ามีเอนไซม์ P450 ถึง 18 กลุ่มใหญ่ (Family) และ 43 กลุ่มย่อย (Sub family) โดยมีรายงานว่าเอนไซม์ CYP2A6 พบมากที่สุด (ประมาณ 1-10% ของเอนไซม์ P450 ที่ดับทั้งหมด) และส่วนน้อยที่เชื่อมุทางเดินหายใจ กล้องเสียง ปอดและอวัยวะอื่นๆ ในขณะที่เอนไซม์ CYP2A13 พบมากที่สุดที่เชื่อมุทางเดินหายใจ กล้องเสียงและปอด (Ortiz de Montellano, 2005) จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ในมนุษย์จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายนิโคตินและเป็นตัวกระตุ้นสารก่อมะเร็ง 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ในหนู โดยเอนไซม์ CYP2A6 ที่ได้จากตับสามารถย่อยสลายนิโคตินได้ดีด้วยค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ( $V_{max}$ ) ที่สูงและค่าคงที่ Michaelis-Menten ( $K_m$ ) ต่ำอนิโคตินที่ต่ำ (Patten *et al.*, 1996) ในขณะที่เอนไซม์ CYP2A13 จะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการกระตุ้น NNK ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในหนู (Li & Xiaoli, 2013) ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆในระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคมะเร็งกล้องเสียง โรคมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma โดยผ่านปฏิกิริยา NNK- $\alpha$ -carbon hydroxydation จากการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *cyp2a6* มีบทบาทต่อพฤติกรรมกรรมการสูบบุหรี่ของผู้สูบบุหรี่ โดยผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติจะมีความต้องการสูบบุหรี่สูงกว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 น้อย (Di *et al.*, 2009) และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *cyp2a13* สัมพันธ์กับอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอด โดยผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ปกติจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปอดสูงกว่าผู้สูบบุหรี่ที่มีการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 น้อย (Hecth, 1998; Zhang *et al.*, 2007) ด้วยเหตุนี้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปอดของผู้ที่ยังไม่สามารถงดบุหรี่ได้ อีกทั้งยังช่วยให้ผู้ที่สูบบุหรี่สามารถลดการสูบบุหรี่ลงได้

ผลการศึกษาเบื้องต้นในน้ำสมุนไพรมะเฟืองและน้ำผลไม้ 25 ชนิด พบว่าน้ำขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) และน้ำมะเฟือง (*Averrhoa carambola* Linn) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ได้ถึง 90 % ซึ่งในพืชทั้งสองมีรายงานว่าพบสารในกลุ่ม Furanocoumarin และ Flavonoid (เช่น gallic acid, catechin, (-)-epicatechin, proanthocyanin และอื่นๆ) ที่ในปริมาณสูง (Guo *et al.*, 2000) การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP213 ของสารสกัดจากขิงและมะเฟืองในหลอดทดลอง

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### การเตรียมสารสกัดจากพืชที่ทดสอบ

นำขิงและมะเฟือง มาทำการอบและบดให้ละเอียดแบ่งใส่ถุงผ้าดิบ แช่ใน 95% เอทานอลในสัดส่วน 1 กรัม : 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปกรองและทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) แล้วทำการสกัดแยกส่วนด้วยเอทิลอะซิเตท และบิวทานอล

### การแสดงออกและการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ cytochrome P450 reductase (CPR), cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) และเอนไซม์ cytochrome P450 2A13 (CYP2A13)

โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิด DNA ที่มียีน NADPH-cytochrome P450 reductase (pNIII-flrat CPR) ได้รับจาก Prof. Dr. Jung-Ja Kim จาก Medical College of Wisconsin) และเอนไซม์ CYP2A6 ด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่านพลาสมิด cDNA ที่มียีน CYP2A6 (pKKK- $\Delta$ -23-2A6) หรือเอนไซม์ CYP2A13 ด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่ได้รับการส่งผ่าน cDNA ที่มียีน CYP2A13 (pKKK- $\Delta$ -23-2A13) ได้รับจาก Assoc. Prof. Dr. Emily Scott จาก University of Kansas)

จากนั้นเหนี่ยวนำการแสดงออกและทำปฏิกิริยาเอนไซม์ ratCPR, CYP2A6 และ CYP2A13 (Pouyfung *et al.*, 2014) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

### การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

#### 1. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR)

เอนไซม์ cytochrome P450 reductase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำหรับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ไปยัง cytochrome P450

ทำการบ่มเอนไซม์ rat CPR ร่วมกับสารละลาย 50  $\mu$ M cytochrome c ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติม 50  $\mu$ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา ติดตามผลการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ในการขนส่งอิเล็กตรอนกับ cytochrome c ให้เปลี่ยนเป็นรูปรีดิวซ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร นำค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยามาคำนวณหาค่ากิจกรรมของปริมาณโปรตีนในปฏิกิริยา (specific activity) ของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

#### 2. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13

บ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 (100  $\mu$ g/mL) ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR (10 unit) ในสารละลาย 100 mM K-Pi buffer pH 7.4 ที่มี Dilaurolphatidyl-choline (DLPC) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารตั้งต้น 20  $\mu$ M coumarin จากนั้นเติมตัวให้อิเล็กตรอน 50  $\mu$ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา ตรวจวัดปริมาณการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (7-hydroxycoumarin) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการออกซิเดชันของเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ในการเร่งการเรืองแสงของสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ในหลอดทดลอง (*In vitro* reconstitution assay system) ด้วยเครื่อง fluorescence

spectroscopy ที่ค่า emission wavelength และค่า excitation wavelength คือ 460 nm และ 355 nm ตามลำดับ เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบค่าจลนศาสตร์ ในช่วงเวลา 180 วินาที โดยการทดลองควบคุมจะศึกษาการเกิดปฏิกิริยาการสร้างผลิตภัณฑ์ เมื่อปราศจากตัวให้อิเล็กตรอน NADPH หรือเอนไซม์ rat CPR หรือเอนไซม์ CYP2A6 โดยทั้งหมดทำการทดลองซ้ำสองครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

#### 4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ของสารสกัดขิงและมะเฟือง

ทำการบ่มเอนไซม์ rat CPR ร่วมกับ 50  $\mu$ M cytochrome c แล้วบ่มร่วมกับสารสกัดแต่ละลำดับส่วน (บิวทานอล เอทิลอะซิเตต และชั้นน้ำ) ของขิงหรือมะเฟืองความเข้มข้นสุดท้าย 50  $\mu$ g/ml ในสารละลาย 50 mM Tris- HCl buffer pH 7.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เติม 50  $\mu$ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ rat CPR ปกติ (100% remaining activity) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

#### 5. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) และ (CYP2A13) ของสารสกัดขิงและมะเฟือง

##### 5.1. ปฏิกิริยา co-incubation

ทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบ่มร่วมกับ 100 mM K-Pi buffer pH 7.4, 20  $\mu$ M coumarin และสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของขิงหรือมะเฟือง ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10, 50 และ 100  $\mu$ g/ml และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 50  $\mu$ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้น 7-hydroxycoumarin คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

##### 5.2. ปฏิกิริยา pre-incubation

ทำการบ่มเอนไซม์ CYP2A6 หรือ CYP2A13 ร่วมกับเอนไซม์ rat CPR และ DLPC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบ่มร่วมกับสารสกัดแต่ละลำดับส่วนของขิงหรือมะเฟือง ความเข้มข้นสุดท้าย 10, 50 และ 100  $\mu$ g/ml และ 50  $\mu$ M NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา เป็นเวลา 10, 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม 100 mM K-Pi buffer pH 7.4, 20  $\mu$ M coumarin และเริ่มปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเติม 50  $\mu$ M NADPH วัดค่าการเพิ่มขึ้นของ 7-hydroxycoumarin คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เพื่อดูผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 ปกติ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 โดยการเปรียบเทียบด้วยปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation เพื่อต้องการตรวจสอบว่าเป็นการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้หรือไม่ เนื่องจากการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้แบบ mechanism based เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งจะจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถกลับคืนสู่รูปปกติ สูญเสียคุณสมบัติของเอนไซม์ได้ จึงเป็นการยับยั้งที่ส่งผลยับยั้งเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาการแสดงออกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ cytochrome P450 reductase จากหนู (rat CPR) ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.2 mM IPTG และทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะที่มีนิกเกิลเป็นลิแกนด์ พบว่าเอนไซม์ rat CPR บริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 79 kDa และมีกิจกรรมของเอนไซม์ rat CPR ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับ cytochrome c ในหลอดทดลองเท่ากับ  $39 \pm 1.1 \mu\text{mol cytochrome c reduced/min/mg protein}$  ใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้ (Shen *et al.*, 1989)

สำหรับเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 ที่เหนี่ยวนำการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ด้วย 0.2 mM IPTG และทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะที่มีนิกเกิลเป็นลิแกนด์ พบว่าเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 มีมวลโมเลกุลประมาณ 53 kDa และ 54 kDa ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ในการเร่งปฏิกิริยา coumarin 7-hydroxylase ในหลอดทดลองพบว่า specific activity ของเอนไซม์ CYP2A6 มีค่าเท่ากับ  $1.87 \pm 0.01 \mu\text{mol 7-hydroxycoumarin/min/mg}$  สำหรับการศึกษางานของเอนไซม์ CYP2A13 ในหลอดทดลองนั้น พบว่าไม่สามารถตรวจวัดการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ 7-hydroxycoumarin ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยา coumarin 7-hydroxylation ของ CYP2A13 มีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายของตั้งต้น coumarin ได้มากกว่าหนึ่งผลิตภัณฑ์ โดย coumarin-3,4-epoxide ที่เกิดขึ้นไม่เสถียรและเปลี่ยนรูปได้ง่าย จึงทำให้ตรวจสอบได้ยาก (Schlicht *et al.*, 2009) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ครั้งนี้ โดยศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการลดของสารตั้งต้น coumarin และพบว่า specific activity ของเอนไซม์ CYP2A13 ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ  $2.31 \pm 0.01 \mu\text{mol coumarin-oxidized/min/mg}$

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ของสารสกัดจากขิงและมะเฟือง พบว่าสารสกัดขิงในส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต สามารถยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุดในค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.40  $\mu\text{g/ml}$  และเมื่อทำการทดสอบโดยปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 10 นาที พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตและส่วนสกัดน้ำมีค่า  $IC_{50}$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของทั้งสองส่วนสกัดขึ้นอยู่กับตัวให้อิเล็กตรอน NADPH (NADPH-dependent inhibition)

**ตารางที่ 1** การเปรียบเทียบค่า  $IC_{50}$  ระหว่างปฏิกิริยา co-incubation และ pre-incubation ของเอนไซม์ CYP2A6 ในแต่ละส่วนสกัดของขิงและมะเฟือง

สารตัวอย่าง	CYP2A6			
	ขิง		มะเฟือง	
	Co-incubation $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pre-incubation $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Co-incubation $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pre-incubation $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
ส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต	$3.39 \pm 0.11$	$1.80 \pm 0.07^*$	$17.05 \pm 0.07$	$8.82 \pm 0.23^*$
ส่วนสกัดชั้นบิวทานอล	$4.01 \pm 0.08$	$3.91 \pm 0.19$	$51.70 \pm 0.07$	$15.37 \pm 0.10$
ส่วนสกัดชั้นน้ำ	$36.20 \pm 0.14$	$29.01 \pm 0.28$	$42.81 \pm 0.06$	$18.06 \pm 0.13$

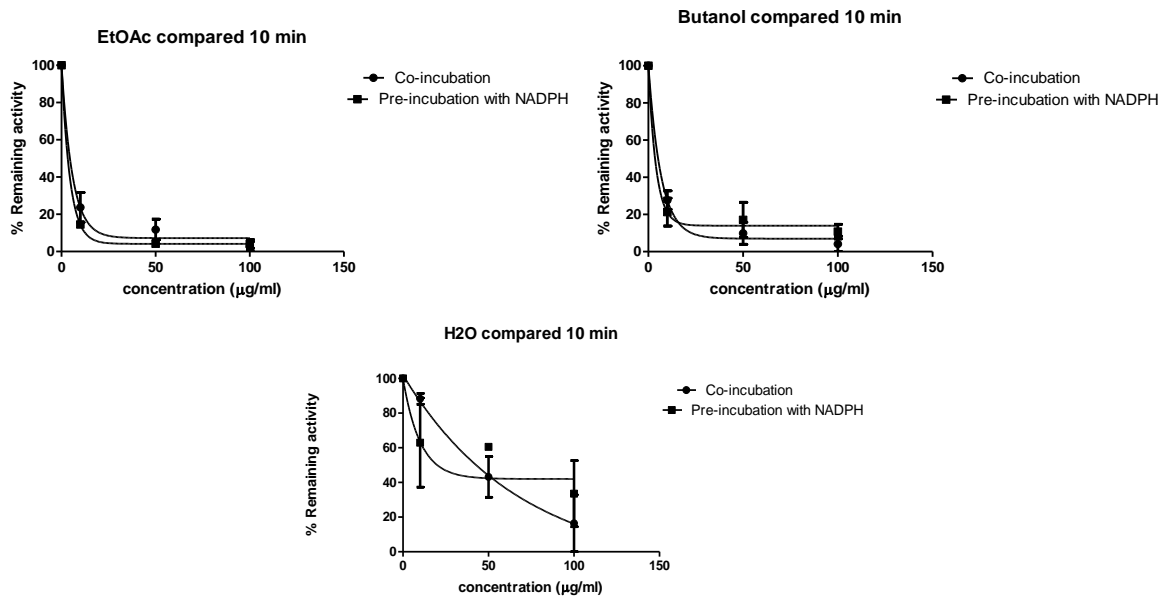
\* ค่า p-value < 0.05 เมื่อทดสอบด้วย student t-test

เมื่อทำการทดสอบเพิ่มเติมพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดน้ำ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่บ่งชี้เบื้องต้นว่าสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ mechanism-based (การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้ โดยสารยับยั้งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ จากนั้นผลิตภัณฑ์จับแน่นกับเอนไซม์ จนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์ที่เสถียร (dead-end complex)) (Hukkanen *et al.*, 2005; Di *et al.*, 2009) (ภาพที่ 1)

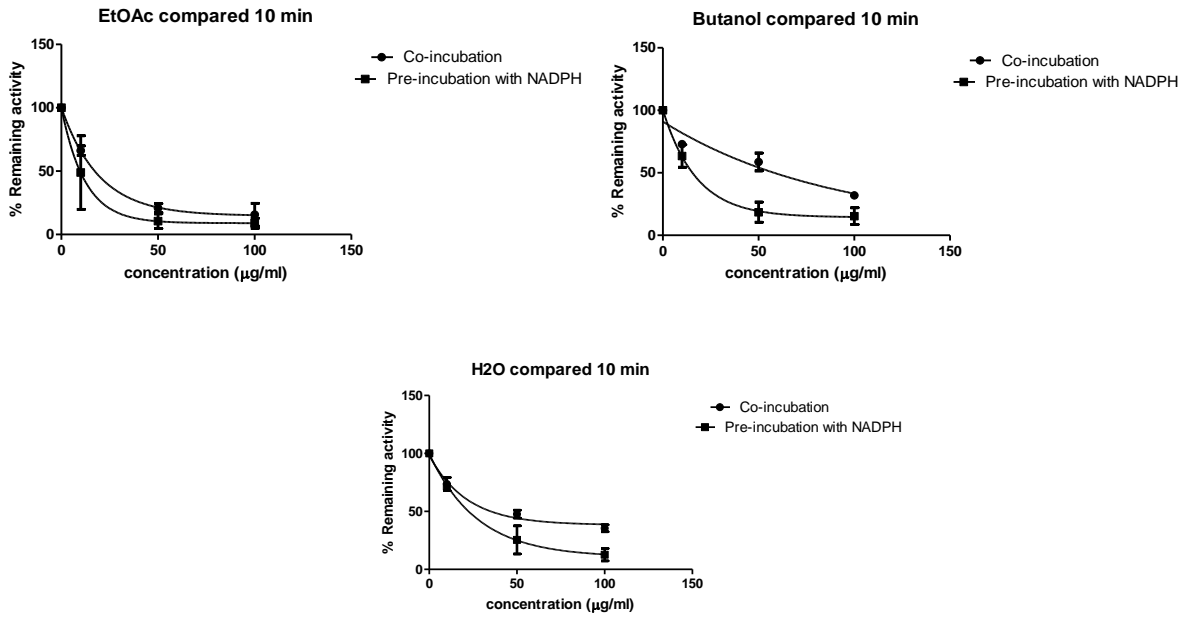
เมื่อทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ในแต่ละส่วนสกัดของมะเฟือง พบว่าส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 17.05  $\mu\text{g/ml}$  (ตารางที่ 1) เมื่อทำการทดสอบโดยปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 10 นาที พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต บิวทานอล และส่วนสกัดน้ำมีค่า  $IC_{50}$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการทดสอบเพิ่มเติมพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต บิวทานอล และส่วนสกัดน้ำ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่บ่งชี้เบื้องต้นว่าสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ mechanism-based (Hukkanen *et al.*, 2005; Di *et al.*, 2009) (ภาพที่ 2)

สำหรับเอนไซม์ CYP2A13 พบว่าการยับยั้งเอนไซม์ในสารสกัดขิงชั้น บิวทานอล สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.27  $\mu\text{g/ml}$  และเมื่อทำการทดสอบโดยปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 10 นาที พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดน้ำมีค่า  $IC_{50}$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดน้ำ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent ซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญที่บ่งชี้เบื้องต้นว่าสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ mechanism-based (ภาพที่ 3)

เมื่อทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ในสารสกัดมะเฟือง พบว่าส่วนสกัดน้ำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 41.83  $\mu\text{g/ml}$  (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบโดยปฏิกิริยา pre-incubation เป็นเวลา 10 นาที พบว่าค่า  $IC_{50}$  มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการทดสอบเพิ่มเติมพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต บิวทานอล และส่วนสกัดน้ำออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ concentration dependent และ time dependent แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากมะเฟืองออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A13 แบบ mechanism-based inhibition (ภาพที่ 4)



**ภาพที่ 1** เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต บิวทานอล และน้ำของขิงระหว่างปฏิกิริยา co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้ง

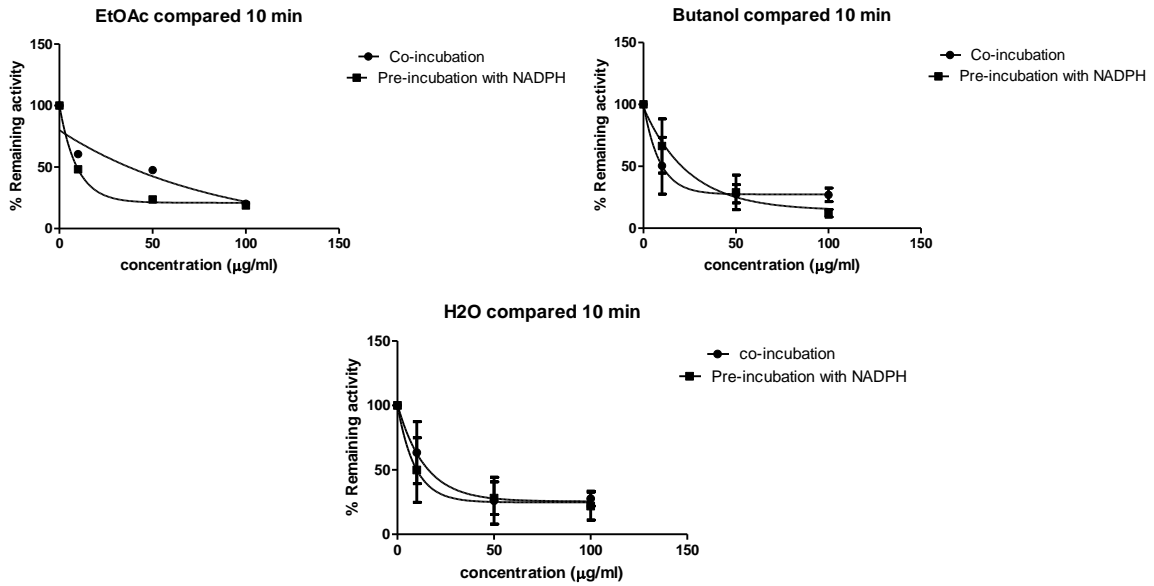


**ภาพที่ 2** เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ของ ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต, บิวทานอล และน้ำของมะเฟือง ระหว่างปฏิบัติการ co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้ง

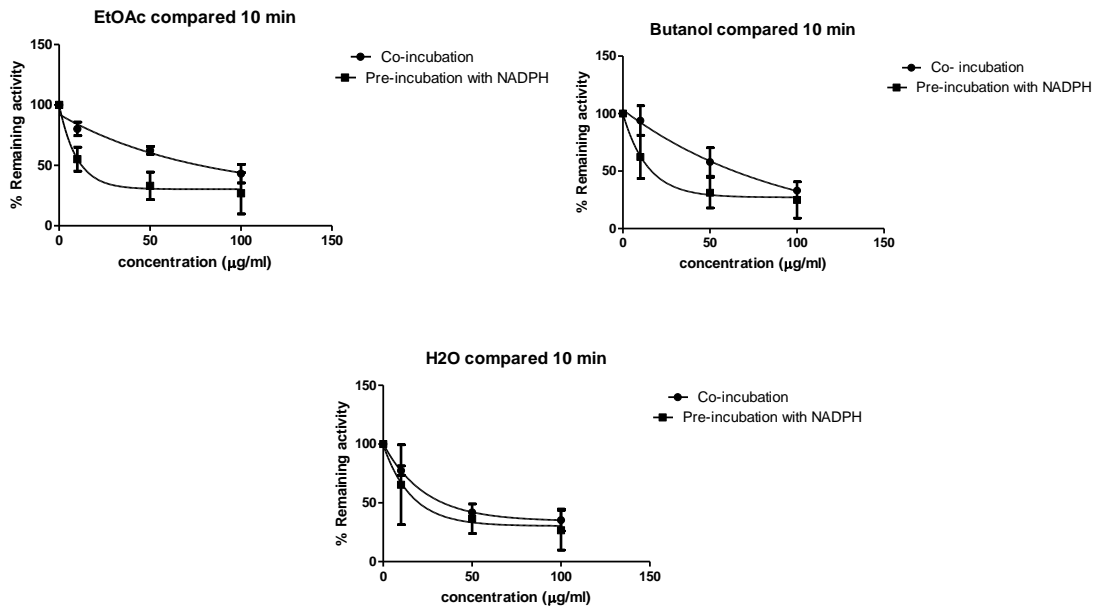
**ตารางที่ 2** การเปรียบเทียบค่า IC<sub>50</sub> ระหว่างปฏิบัติการ co-incubation และ pre-incubation ของเอนไซม์ CYP2A13 ในแต่ละส่วนสกัดของขิงและมะเฟือง

สารตัวอย่าง	CYP2A13			
	ขิง		มะเฟือง	
	Co-incubation IC50 (µg/ml)	Pre-incubation IC50 (µg/ml)	Co-incubation IC50 (µg/ml)	Pre-incubation IC50 (µg/ml)
ส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต	27.57± 0.16	11.81± 0.18*	73.95± 0.07	20.44± 0.16*
ส่วนสกัดชั้นบิวทานอล	14.27± 0.20	19.29± 0.19	66.00± 0.13	21.68± 0.17*
ส่วนสกัดชั้นน้ำ	19.58± 0.22	14.08± 0.22	41.83± 0.07	26.84± 0.21*

\* ค่า p-value < 0.05 เมื่อทดสอบด้วย student t-test



**ภาพที่ 3** เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดขิงระหว่างปฏิกิริยา co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที ในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต บิวทานอล และส่วนสกัดน้ำ การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้ง



**ภาพที่ 4** เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A13 ของสารสกัดมะเฟืองระหว่างปฏิกิริยา co-incubation กับ pre-incubation ที่เวลา 10 นาที ในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต บิวทานอล และส่วนสกัดน้ำ การทดลองทำซ้ำทั้งหมดสองครั้ง



นอกจากนี้ได้มีการตรวจสอบผลของสารสกัดขิงและมะเฟืองต่อการทำงานของเอนไซม์ rat CPR ผลของการศึกษาพบว่าส่วนสกัดจากขิงในชั้นบิวทานอลและน้ำ ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ rat CPR แต่ในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ส่งผลยับยั้งเอนไซม์ CPR ถึง 45.25% เช่นเดียวกับในชั้นบิวทานอล และน้ำของส่วนสกัดมะเฟืองไม่ยับยั้งเอนไซม์ rat CPR แต่ในชั้นเอทิลอะซิเตตส่งผลยับยั้งเอนไซม์ rat CPR ถึง 48.57% ดังนั้นการนำขิงและมะเฟืองในส่วนสกัด EA ไปใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 อาจส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ CYPs อื่นๆ ผ่านทาง CPR ได้ เนื่องด้วย CPR ทำหน้าที่ในการส่งอิเล็กตรอนให้กับ P450 หลายไอโซฟอร์ม

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 บริสุทธิ์ที่ได้จากการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารสกัดจากขิงและมะเฟือง เมื่อแยกสารสกัดแบบลำดับส่วน พบว่าส่วนสารสกัดเอทิลอะซิเตตและส่วนสกัดน้ำของขิงและมะเฟือง สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 ได้โดยกลไกการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ เช่นเดียวกับในส่วนของบิวทานอลของสารสกัดขิง ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 แต่เป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้

สำหรับในสารสกัดมะเฟืองพบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 โดยเมื่อแยกสารสกัดแบบลำดับส่วนพบว่าส่วนสกัดทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต บิวทานอล และส่วนสกัดน้ำ ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2A6 และเอนไซม์ CYP2A13 แบบผันกลับไม่ได้ อย่างไรก็ตามต้องระวังการนำไปใช้ในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต เนื่องจากได้มีการตรวจสอบพบว่า หากใช้ในปริมาณมากจะส่งผลยับยั้งเอนไซม์ CPR ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ซึ่งจะส่งผลกระทบท่อเอนไซม์ cytochrome P450 ในกลุ่มอื่นๆ และอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายได้

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 86/2559

### เอกสารอ้างอิง

- Di, Y.M., Chow, V.D., Yang, L.P., Zhou, S.F. (2009). Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6. *Current Drug Metabolism*, 10(7), 754- 80.
- Guo, L.Q., Fukuda, K., Ohta, T., Yamazoe, Y. (2000) Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice – mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(7), 766-771.
- Hecht, S.S. (1998). Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific Nnitrosamines. *Chemical Research in Toxicology*, 11, 559-603.
- Hukkanen, J., Jacob, P., Benowitz, N.L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacological Reviews*, 57(1), 79-115.

- Li., S, Xiaoli, F. (2013). Expression of cytochrome P450 2A13 in human non-small cell lung cancer and its clinical significance. *The Journal of Biomedical Research*, 27(3), 202-207.
- Ortiz de Montellano, P.R. (Ed.) (2005). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, third edition. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Patten, C.J., Smith, T.J., Murphy, S.E., Wang, M.H., Lee, J., Tynes, R.E., Koch, P., Yang, C.S. (1996). Kinetic analysis of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by heterologous expressed human P450 enzymes and the effect of P450-specific chemical inhibitors on this activation in human liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 333, 127-138.
- Pouyfung, P., Prasopthum, A., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2014). Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* constituents. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(1), 75-82.
- Schlicht, K.E., Berg, J.Z., Murphy, S.E. (2009). Effect of CYP2A13 Active Site Mutation N297A on Metabolism of Coumarin and Tobacco-Specific Nitrosamines. *Drug metabolism and Disposition*, 37, 665-671.
- Shen, A.L., Porter, T.D., Wilson, T.E., Kasper, C.B. (1989). Structural Analysis of the FMN Binding Domain of NADPH Cytochrome P-450 Oxidoreductase by Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 7584-7589.
- Zhang, J.W., Liu, Y., Cheng, J., Li, W., Ma, H., Liu, H.T., Sun, J., Wang, L.M., He, Y.Q., Wang, Y., Wang, Z.T., Yang, L. (2007). Inhibition of human liver cytochrome P450 by star fruit juice. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*, 10 (4), 496-503.