รหัสโครงการ SUT1-104-50-24-37

# รายงานการวิจัย

# ฤทธิ์ของลูกใต้ใบต่อหน้าที่ของไมโตคอนเดรียในตับหนูขาว

(Effects of *Phyllanthus urinaria* on the functions of rat liver mitochondria)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

**รหัสโครงการ SUT1-104-50-24-37**

# รายงานการวิจัย

# ฤทธิ์ของลูกใต้ใบต่อหน้าที่ของไมโตคอนเดรียในตับหนูขาว

(Effects of *Phyllanthus urinaria* on the functions of rat liver mitochondria)

**คณะผู้วิจัย**

**หัวหน้าโครงการ**

**รศ. ภกญ. ดร. นวลน้อย จูฑะพงษ์**

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550**

**ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว**

ธันวาคม 2556

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส. กาญจนา พุ่มภาชี นักศึกษาปริญญาโท และ น.ส. มัจฉา กามขุนทด ผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณอาจารย์ ดร. พอล เจ โกรดิ ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องในการระบุชนิดของพืช สุดท้าย ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีสำหรับการให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## บทคัดย่อภาษาไทย

สารสกัดลูกใต้ใบชนิดที่มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus urinaria* Linn. ถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรโดยแพทย์แผนโบราณเพื่อรักษาโรคต่างๆ หลายโรคมาเป็นเวลานานแล้ว มีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ ตลอดจนฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ มีความเชื่อมาตั้งแต่ครั้งโบราณว่าลูกใต้ใบสามารถปกป้องตับจากพิษของสารเคมี และถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรเพื่อช่วยรักษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับให้มีอายุยาวขึ้น มีหลักฐานงานวิจัยอย่างต่อเนื่องที่ชี้แนะว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง นอกจากนั้น ผู้วิจัยเองยังพบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* สามารถ ฆ่าเซลล์มะเร็ง human hepatocellular carcinoma HepG2 ได้ เป็นที่ทราบดีว่าเส้นทางหนึ่งของกระบวนการตายของเซลล์ที่เรียกว่า apoptosis นั้นสามารถเกิดผ่านกลไกที่เกี่ยวกับไมโตคอนเดรีย งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยต่อเนื่องซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากลูกใต้ใบต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย

สารสกัดลูกใต้ใบที่ใช้ในการทดลองได้จากการสกัดด้วย 50% เมทานอล นำมาทดสอบผลต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียซึ่งแยกจากตับของหนูขาว โดยใช้ Clark oxygen electrode พบว่าสารสกัดออกฤทธิ์กระตุ้นการหายใจใน state 4 แบบอ่อนๆ แต่ไปกดการหายใจใน state 3 และทำให้ค่าดัชนีการควบคุมการหายใจลดลงอย่างมาก สารสกัดไม่มีผลต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกสารและการหลั่ง cytochrome c ของไมโตคอนเดรีย จากการทดสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรและการใช้ Western blot ตามลำดับ ในการศึกษานี้ยังไม่ทราบผลของสารสกัดต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าของไมโตคอนเดรีย เนื่องจากการดูดกลืนแสงของสารสกัดรบกวนวิธีวัดด้วย rhodamine 123 ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป

สรุป ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดของลูกใต้ใบด้วยน้ำและเมทานอลซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งนั้นไปขัดขวางการทำงานของไมโตคอนเดรีย โดยไม่มีผลต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารและไม่มีผลต่อการหลั่ง cytochrome c แต่ไปมีผลต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ตับโดยออกฤทธิ์เป็น uncoupler และยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation ของไมโตคอนเดรีย การศึกษาทดลองนี้ชี้แนะว่า ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการรบกวนการสร้างพลังงานนี้น่าจะเป็นกลไกที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนสารออกฤทธิ์ที่รับผิดชอบต่อผลดังกล่าวของไมโตคอนเดรียนั้นยังต้องมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: ลูกใต้ใบ, ไมโตคอนเดรีย, การใช้ออกซิเจน, การหายใจ

## Abstract

The extract of *Phyllanthus urinaria* Linn. has long been prescribed in traditional medicine for treating various diseases. Its antioxidant, anti–inflammatory and antispasmodic activities have been reported. It is believed that *P. urinaria* has hepatoprotective property against toxic chemicals and is used as an adjunctive treatment in patients with liver cancer. There is evidence suggesting that *P. urinaria* possess anticancer activity. Moreover, the principal investigator has found that *P. urinaria* extract decreases human hepatocellular carcinoma HepG2 cell viability. It is widely known that apoptosis signaling transduction can also be induced through mitochondrial pathway. The purpose of this study was to investigate the effect of *P. urinaria* extract on mitochondrial functions.

The whole plant of *P. urinaria* was extracted by 50% methanol. Rate of oxygen consumption of isolated mitochondria was determined with a Clark oxygen electrode. It was found that the hydromethanolic extract slightly stimulated mitochondrial state 4 respiration but profoundly depressed state 3 respiration and respiratory control ratio. The extract had no effect on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release which were measured by spectrophotometry at 520 nm and Western blot method, respectively. However, in the present study, the measurement of the effect on transmembrane potential was failed because the absorbance of the extract interfered with fluorescence of the probe rhodamine 123.

In conclusion, the data showed that hydromethanolic extract of *P. urinaria* which has been shown to possess anticancer activity impeded mitochondrial function. The extract showed little effect on permeability transition and cytochrome c release whereas impaired hepatic energy metabolism by acting as uncoupler and inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. It is suggested that the latter effects may contribute to the cytotoxic action of *P. urinaria* extract. The active ingredients which are responsible for these effects on mitochondria need further investigation.

**Keywords:** *Phyllanthus urinaria*, Mitochondria, Oxygen consumption, Respiration

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย | |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | |
| สารบัญ | |
| สารบัญภาพ | |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 2 |
| ขอบเขตของการวิจัย | 3 |
| ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย | 3 |
| บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย | |
| บทที่ 3 ผลการวิจัย | 9 |
| บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง | 14 |
| เอกสารอ้างอิง | 17 |
| ภาคผนวก | |
| งานวิจัยจากโครงการนี้ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ | 21 |


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญภาพ

รูปที่ 1.1 ลักษณะการออกผลของลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ..... 1
รูปที่ 2.1 ลักษณะของดอกและผลของลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ..... 4
รูปที่ 2.2 Oxygraph tracing..... 6
รูปที่ 3.1 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย..... 9
รูปที่ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของลูกใต้ใบต่ออัตราการใช้ออกซิเจน
ใน state 3 และ state 4 และต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจของไมโตคอนเดรีย..... 10
รูปที่ 3.3 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อ Fluorescence intensity ของ rhodamine 123..... 11
รูปที่ 3.4 การดูดกลืนแสงของสารสกัดลูกใต้ใบ *P. urinaria* ความยาวคลื่นต่าง ๆ..... 12
รูปที่ 3.5 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อเมมเบรนของไมโตคอนเดรียในการควบคุม
การผ่านเข้าออกของสาร..... 13
รูปที่ 3.6 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการหลั่ง cytochrome c จากไมโตคอนเดรีย ..... 13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 1

# บทนำ

## ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria* Linn.) เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae จีนัส *Phyllanthus* เหตุที่มีชื่อเรียกว่า ลูกใต้ใบ, หญ้าลูกใต้ใบ หรือ หญ้าใต้ใบ เนื่องจากมีผลขนาดเล็กออกตามซอกก้านใบย่อยและห้อยลงให้เห็นว่าลูกอยู่ใต้ใบ (รูปที่ 1.1) ในประเทศไทยมีพืชล้มลุกที่มีลักษณะดังกล่าวคล้ายคลึงกันและถูกเรียกว่าลูกใต้ใบอยู่อย่างน้อย 5 ชนิดหรือสปีชีส์ (species) ได้แก่ *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn., *P. debilis, P. niruri, P. urinary* Linn *และ P. virgatus* G. Forst. (Van Welzen and Chayamarit, 2007) พืชเหล่านี้มีการกระจายทั่วไปในประเทศแถบอเมริกาใต้และเอเชีย ในประเทศไทยลูกใต้ใบถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคหลายชนิด

**รูปที่ 1.1 ลักษณะการออกผลของลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria***

สำหรับลูกใต้ใบชนิดที่มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *P. urinaria* มีรายงานว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ ตลอดจนฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ (Chularojmontri et al., 2005; Hau et al., 2009; Kumaran and Karunakaran, 2007) มีความเชื่อมาตั้งแต่ครั้งโบราณว่าลูกใต้ใบสามารถปกป้องตับจากพิษของสารเคมี และถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรเพื่อช่วยรักษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับให้มีอายุยาวขึ้น นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยทางคลินิกที่ช่วยสนับสนุนว่าลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ช่วยปกป้องตับได้จากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Wang et al., 1995) โดยตรวจพบว่าผู้ป่วยจะมี hepatitis B antigen เปลี่ยนจากบวกเป็นลบ ขณะที่ antibody เปลี่ยนจากลบเป็นบวกหลังจากได้รับ

ที่ได้รับสารสกัด นอกจากนั้นยังมีรายงานโดย Shin และคณะ (2005 ) ว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ไปยับยั้งการติดเชื้อของเชื้อไวรัสในเซลล์ตับได้ เป็นที่ทราบดีอยู่แล้วว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็งตับ (Szabó et al., 2004) โดยมีการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างฤทธิ์ต้านไวรัสของพืชกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Thyagarajan et al., 2002) จึงไม่เป็นที่ประหลาดใจที่จะมีหลักฐานงานวิจัยอย่างต่อเนื่องชี้แนะว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ โดยพบว่ามีกลไกการออกฤทธิ์ไปกระตุ้นให้เกิดการหยุดการเจริญในวัฏจักรเซลล์และช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ตัวอย่างเช่น การทดลองที่พบว่าสารสกัดน้ำของลูกใต้ใบยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Lewis lung carcinoma ที่ปลูกถ่ายให้กับหนูถีบจักรพันธุ์ C57BL/6J จากการที่สารสกัดไปลดการแสดงออกของยีน *Bcl–2* (Huang et al., 2006; Huang et al., 2003) และการทดลองแบบ in vitro ซึ่งศึกษาในเซลล์ Human promyelocytic leukemia HL–60 พบว่าไปชัก นำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับ Fas ligand (Huang et al., 2004) นอกจากนั้นยังมีผู้วิจัยแยกสารประกอบกลุ่ม lignan ได้จากสารสกัด ethyl acetate จากลูกใต้ใบซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยพบว่าไปยับยั้งการแสดงออกของ ยีน *Bcl–2* และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ telomerase ร่วมกับการกระตุ้นการทำงานแสดงออกของ ยีน *c–myc* และการทำงานของเอนไซม์ caspases ส่งผลให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Giridharan et al., 2002)

เป็นที่ทราบดีว่าเส้นทางหนึ่งของกระบวนการตายของเซลล์ที่เรียกว่า apoptosis นั้นสามารถเกิดผ่านกลไกที่เกี่ยวกับไมโตคอนเดรีย หากการทำงานของไมโตคอนเดรียเสียไปจะทำให้เกิดการ ตายแบบ necrosis เนื่องจากเซลล์จะขาดแคลน ATP ร่วมกับการเสียการควบคุมสมดุลของแคลเซียมภายในเซลล์ (Bernardi et al., 2001) จากการทำงานในโครงการที่ผ่านมาหัวหน้าโครงการวิจัยพบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ human hepatocellular carcinoma HepG2 งานวิจัยนี้ซึ่งเป็นงานวิจัยต่อเนื่องจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากลูกใต้ใบต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย เพื่อใช้อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ในแง่ของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับของสารสกัดลูกใต้ใบซึ่งสกัดโดย 50% เมทานอล

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียในแง่ต่าง ๆ ต่อไปนี้ คือ

1. ศึกษาผลต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย (oxygen consumption)

2. ศึกษาผลต่อศักย์ไฟฟ้าระหว่างด้านนอกและในของไมโตคอนเดรีย (transmembrane potential)
3. ศึกษาผลต่อเมมเบรนของไมโตคอนเดรียในการควบคุมการเข้าออกสาร (permeability transition)
4. ศึกษาผลต่อการหลั่ง cytochrome c จากไมโตคอนเดรีย (cytochrome c release)

**ขอบเขตของการวิจัย**

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยใช้สารสกัดหยาบ ทำให้มีข้อจำกัดในการระบุสารออกฤทธิ์ อีกทั้งเป็นการศึกษาทดลองในระดับ *in vitro* เท่านั้น

**ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย**

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์และระดับโมเลกุลของสมุนไพรไทย อันจะก่อให้เกิดการใช้ยาอย่างมีเหตุผล และอาจนำไปสู่การต่อยอดในการค้นพบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 2

# วิธีดำเนินการวิจัย

**การทดลองและสารเคมี**

**1. การเก็บตัวอย่างพืชและการสกัดสาร**

**1.1 การเก็บพืชตัวอย่าง**

ลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* เก็บได้จากอำเภอปักธงชัยและอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา การพิสูจน์เพื่อยืนยันชนิดของพืชทำโดย ดร. พอล เจ โกรดิ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยอ้างอิงจากลักษณะใบ (รูปที่ 1.1) ดอกและผล (รูปที่ 2.1) หลังจากล้างเศษดินและสิ่งที่ปนเปื้อนออกจนสะอาดด้วยน้ำและน้ำกลั่นในครั้งสุดท้ายแล้ว นำทุกส่วนไปอบที่อุณหภูมิ 40° C หลังจากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ผงสมุนไพรที่ได้ถูกเก็บที่ –20° C ในถุงที่ปิดสนิท เพื่อนำไปสกัดในขั้นต่อไป

A B C D

**รูปที่ 2.1 ลักษณะของดอกและผลของลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria*** (A) ดอกตัวเมีย (B) ดอกตัวผู้ (C) ผล และ (D) ผลที่ถูกตัดตามขวาง

**1.2 การเตรียมสารสกัดจากพืช**

นำผงสมุนไพรของลูกใต้ใบจากการเตรียมในข้อ 1.1 ไปสกัดด้วย 50% methanol ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวม 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ( arotary evaporator under low pressure) เมื่อของเหลวลดลงประมาณ 4/5 จึงนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ที่ –20° C

## 2. การเตรียมไมโตคอนเดรีย

### 2.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 200–250 กรัม ได้มาจากหน่วยงานสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี การดูแลและปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองเป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองแห่งชาติ ภายใต้การกำกับดูแลของ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยให้หนูทดลองอยู่ในกรงแขวน 2 ตัว/กรง ปูด้วยวัสดุรองนอน ให้กินน้ำและอาหารแบบอิสระ ควบคุมอุณหภูมิห้องให้ได้ 25 ± 2 ° C ความชื้นสัมพัทธ์ 40–70% ให้แสงสว่างโดยปิดเปิดไฟสลับกันช่วงละ 12 ชั่วโมง

### 2.2 การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

การแยกสกัดไมโตคอนเดรียจากตับหนูทำโดยเทคนิค differential centrifugation ตามที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Hogeboom, 1955) ดังต่อไปนี้ หนูถูกทำให้ตายโดยการเคลื่อนกระดูกคอ ตับถูกตัดออกจากตัวหนู ล้างและแช่ไว้ในบัฟเฟอร์ A ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose, 5 mM HEPES buffer (pH 7.4) และ 1 mM EGTA โดยตลอดการทดลองจะต้องทำในสารละลายที่ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 4°C ตับถูกตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรแล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง teflon pestle tissue homogenizer อย่างเบา ๆ โดยใช้ความเร็วรอบที่เหมาะสม เพื่อทำให้เซลล์ตับแตก ตับที่บดจนละเอียดแล้วถูกนำไปปั่นที่ 700 × g เป็นเวลา 7 นาที ทิ้งส่วนที่ตกตะกอน แล้วนำส่วนบนไปปั่นต่อที่ 4,760 x g เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง นำส่วนที่ตกตะกอนไป resuspend ในสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose แล้วนำไปปั่นที่ 13,000 × g เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนของไมโตคอนเดรียที่ได้โดยล้างชั้นของ microsome ซึ่งมีสีชมพูอ่อนด้านบนออกให้หมดก่อนเก็บโดย resuspend ในสารละลาย 0.25 M sucrose 1 มล. ด้วย teflon pestle tissue homogenizer เบา ๆ ด้วยมือ เพื่อป้องกันไม่ให้ไมโตคอนเดรียที่ได้เกิดความเสียหาย เก็บไมโตคอนเดรียไว้ที่ 4 ° C วัดปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียโดย Bio–Rad protein assay

## 3. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียทำได้โดยเครื่องมือที่เรียกว่า oxygraph ในรูปที่ 3 แสดง Typical oxygen tracing ที่ไมโตคอนเดรียตอบสนองต่อ ADP และ สารที่มีฤทธิ์เป็น uncoupler ที่ชื่อว่า carbonyl cyanide–3–chloro–phenylhydrazone (CCCP) การเติม ADP ลงในสารละลายจะไปกระตุ้นการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียอย่างเด่นชัด หลังจากไมโตคอนเดรียใช้ ADP ในสารละลายหมดลง อัตราการหายใจจะช้าลงอย่างรวดเร็วเท่ากับระดับในสภาวะพัก (resting

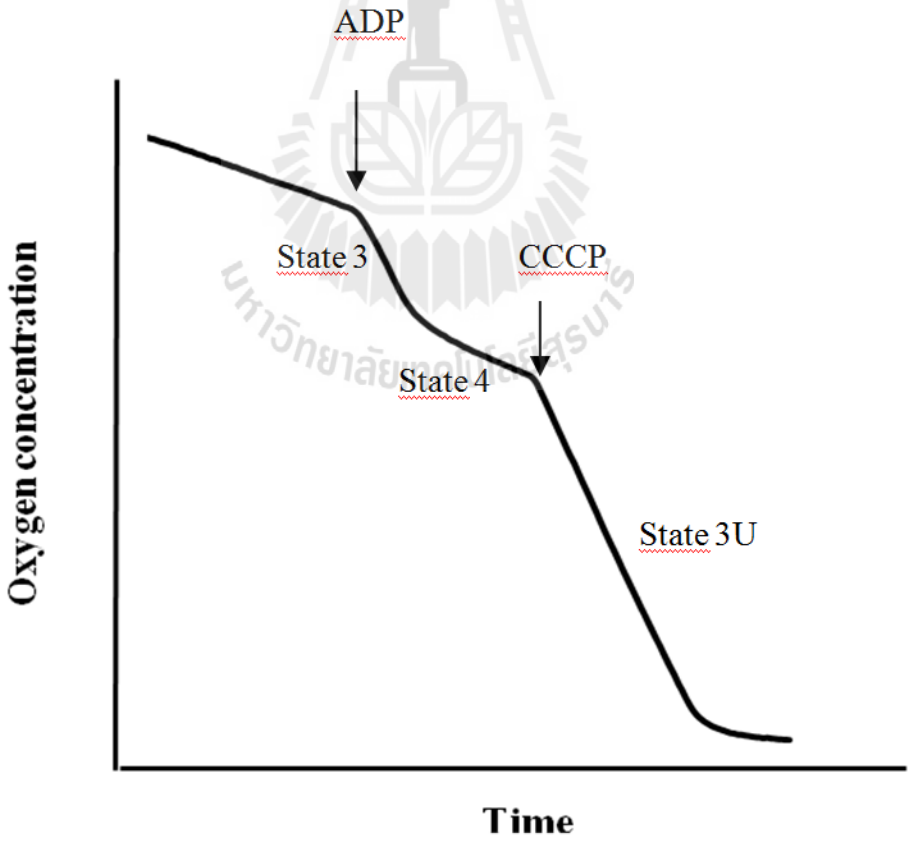
level) การหายใจของไมโตคอนเดรียขณะเติม ADP ลงไปนี้ถือเป็น respiratory control หรือ acceptor control และเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปแล้วถึงคำจำกัดความที่ใช้เรียกสภาวะการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่ถูกกระตุ้นด้วยสารทดลองที่แตกต่างกันโดยนักวิจัยชื่อ Chance และ Williams (1955) ดังนี้ (รูปที่ 2.2)

State 1 หมายถึงในสภาวะที่มี ADP และ substrate ในระดับต่ำ ๆ

State 2 หมายถึงในสภาวะการขาด ADP และ substrate ภายในไมโตคอนเดรีย (ไม่มีสภาวะนี้แสดงในรูป 2.2)

State 3 หมายถึงในสภาวะที่กระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียมีการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วร่วมกับการเกิดกระบวนการ phosphorylation โดยการเติม substrate และ ADP อย่างมากเกินพอ

State 4 หมายถึง ภาวะพัก (resting state) ซึ่งเกิดหลังจากการใช้ ADP ที่เติมลงไปหมด อัตราการหายใจกลับมาช้าอีกเช่นเดียวกับ State 1




**รูปที่ 2.2 Oxygraph tracing**

อัตราส่วนระหว่างการหายใจใน state 3 และ state 4 ถูกเรียกว่า respiratory control ratio (RCR) ใช้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของไมโตคอนเดรียว่ามีการ couple กันดีมากน้อยแค่ไหนระหว่างกระบวนการ electron transport chain และ phosphorylation ค่า RCR สูงแสดงให้เห็นว่าไมโตคอนเดรียสามารถนำพลังงานที่ได้จาก electron transport chain ไปสร้าง ATP ได้มากเท่านั้น ปกติแล้วจะมีค่าอยู่ระหว่าง 3 ถึง 10 นอกจากนั้น ไมโตคอนเดรียอาจอยู่ใน state 3U ซึ่งเกิดจากการเติมสารที่เป็น uncoupler เช่น dinitrophenol หรือ CCCP อันจะทำให้เกิดการกระตุ้นการใช้ออกซิเจนแต่เนื่องจากไม่มี ADP ซึ่งจำเป็นในการสร้าง ATP ในสารละลาย สภาวะนี้จึงเป็นการใช้ออกซิเจนโดยปราศจากการสร้าง ATP

ในการศึกษานี้ การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียทำโดยใช้ Clark oxygen electrode (Hansatech, England) นำไมโตคอนเดรียที่แยกได้จากหัวข้อ 2.2 ในจำนวนที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2 มก. ใส่ในบัฟเฟอร์ C ปริมาตร 1 มล. ซึ่งประกอบด้วย 10 mM HEPES buffer (pH 7.4), 225 mM sucrose, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl และ 10 mM $KH_2PO_4$ at 25° C ซับสเตรทที่ใช้คือ Glutamate (5mM) และ malate (5mM) หน่วยของอัตราการใช้ออกซิเจนคือ nmol Oxygen/ml/min ค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ ( respiratory control ratio; RCR) คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างอัตราการหายใจใน state 3 ต่ออัตราการหายใจใน state 4

**4. การศึกษาผลของสารสกัดต่อความต่างศักย์ไฟฟ้าของไมโตคอนเดรีย**

การวัดผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการยอมให้สารเข้าออกจากไมโตคอนเดรียทำโดยการใช้ rhodamine 123 เป็น probe (Baracca et al., 2003) เพื่อวัดศักย์ไฟฟ้าไมโตคอนเดรียหรืออีกนัยหนึ่งเป็นการวัดความแตกต่างของโปรตอน ($H^+$) ระหว่างด้านนอกและด้านในของเมมเบรนชั้นในของไมโตคอนเดรีย วิธีทดลองโดยสังเขปเป็นดังนี้ นำไมโตคอนเดรียที่สกัดได้ (จำนวน 3 มก. โปรตีน) ใส่ในบัฟเฟอร์ C ซึ่งมี rhodamine 123 ความเข้มข้น 50 nM จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างค่า excitation ที่ความยาวคลื่น 503 และค่า emission ที่ความยาวคลื่น 527 ด้วยเครื่อง Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer LS–50B) หลังการเติมสารสกัดเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับและไม่ได้รับ 5 μM $CdCl_2$

**5. การศึกษาศึกษาผลต่อการควบคุมให้สารเข้าออกของไมโตคอนเดรีย**

เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า หากการควบคุมสารผ่านเข้าออกของ ไมโตคอนเดรียเสียไปจะทำให้เกิดการบวมขึ้น (swelling) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ผ่านไมโตคอน–เดรีย เมื่อไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารอย่างเหมาะสมจะส่งผลให้เกิดการบวมขึ้นและไมโต

คอนเดรียจะยอมให้แสงผ่านมากขึ้น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง (Velena et al., 1999) การศึกษาผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกของไมโตคอนเดรียในการวิจัยนี้ทำโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเปรียบเทียบกับไมโตคอนเดรียที่ได้รับ 1 mM $CaCl_2$ และไม่ได้รับสารใด ๆ

**6. ศึกษาผลต่อการหลั่ง cytochrome c ของไมโตคอนเดรีย**

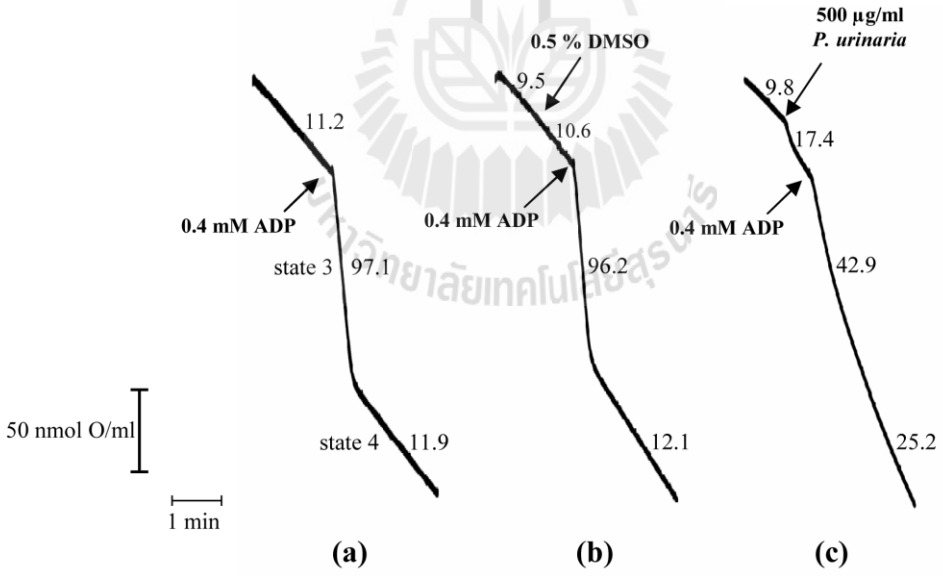
การศึกษาผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการหลั่ง cytochrome c ทำโดยนำไมโตคอนเดรียที่สกัดได้มาบ่มในสารสกัดซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ C ที่ 25° C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 16,700 × g เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนบนที่ใสไปแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE gel electrophoresis การตรวจวัดปริมาณ cytochrome c ที่หลั่งออกมาจากไมโตคอนเดรียทำโดยใช้ monoclonal cytochrome c antibody (Invitrogen, U.S.A.) ตามวิธีของ Liu และคณะ (1996) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 5 μM $CdCl_2$ และกลุ่มควบคุม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 3
## ผลการวิจัย

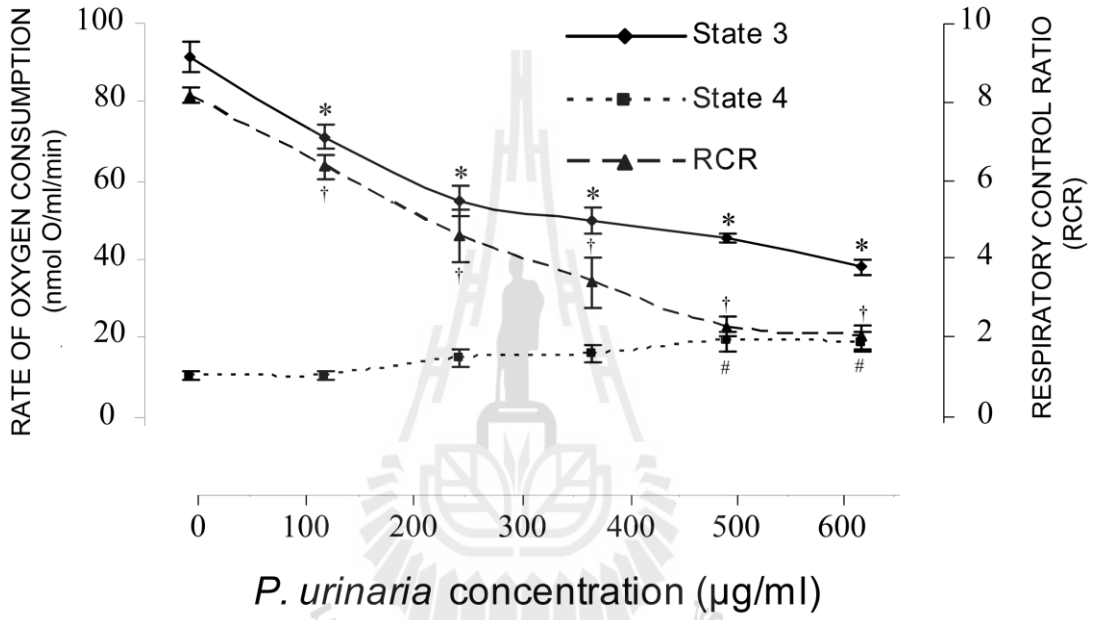
### 3.1. ผลของสารสกัดลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย

ผลของสารสกัดต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state ต่างๆ เมื่อใช้ glutamate ร่วมกับ malate เป็นซับสเตรท แสดงไว้ในรูปที่ 3.1 พบว่าสารสกัดไปรบกวนอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย ในรูปที่ 3.1 a เป็นการเปลี่ยนแปลงการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียหลังกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งเรียกว่า state 3 respiration ซึ่งจะพบว่าหลังการใช้ ADP หมดแล้วความชันของกราฟจะลดลงอย่างมากซึ่งเรียกว่า state 4 respiration จะเห็นว่าหากไมโตคอนเดรียได้รับสารสกัดขนาด 500 μg/ml จะทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ช้าลง และไม่เห็นการเข้าสู่ state 4 ได้อย่างชัดเจน (cut off หายไป) เนื่องจากพบว่าสารสกัดเองมีฤทธิ์ทำให้เกิด uncoupling ด้วย ดังจะเห็นได้จากหลังการใส่สารสกัดลูกใต้ใบ อัตราการหายใจของ ไมโตคอนเดรียจะเพิ่มขึ้นก่อนการกระตุ้นด้วย ADP ทั้งนี้ไม่พบว่า 0.5% DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายมีผลใด ๆ ต่อไมโตคอนเดรีย




**รูปที่ 3.1 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย** ( a) กลุ่มควบคุม ( b) กลุ่ม 0.5% DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย และ (c) กลุ่มสารสกัด (500 μg/ml) กราฟเป็นตัวแทนของการทดลองซ้ำ 4 ครั้งจากการเตรียมไมโตคอนเดรียแยกกัน ณ เวลาที่ทำการใส่สารสกัด ตัวทำลายและ ADP ระบุโดยลูกศรชี้ ตัวเลขที่ระบุไว้ในเส้นกราฟ เป็นอัตราการใช้ออกซิเจนหน่วยเป็น nmol Oxygen/ml/min

รูปที่ 3.2 เป็นการแสดงผลของสารสกัดต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของ ไมโตคอนเดรียในช่วงการหายใจ state 3 และ state 4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0–600 μg/ml พบว่าสารสกัดไปยับยั้งอัตราการหายใจใน state 3 อย่างแรง แต่กระตุ้นการหายใจใน state 4 เล็กน้อย ผลของสารสกัดต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเป็นไปแบบ dose–related manner เมื่อคำนวณค่าดัชนีการควบคุมการหายใจซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนใน ช่วง state 3 ต่อ state 4 แล้วพบว่า สารสกัดทำให้ดัชนีการควบคุมการหายใจของไมโตคอนเดรียลดลงอย่างเด่นชัด เช่นเดียวกับผลการยับยั้งการหายใจใน state 3



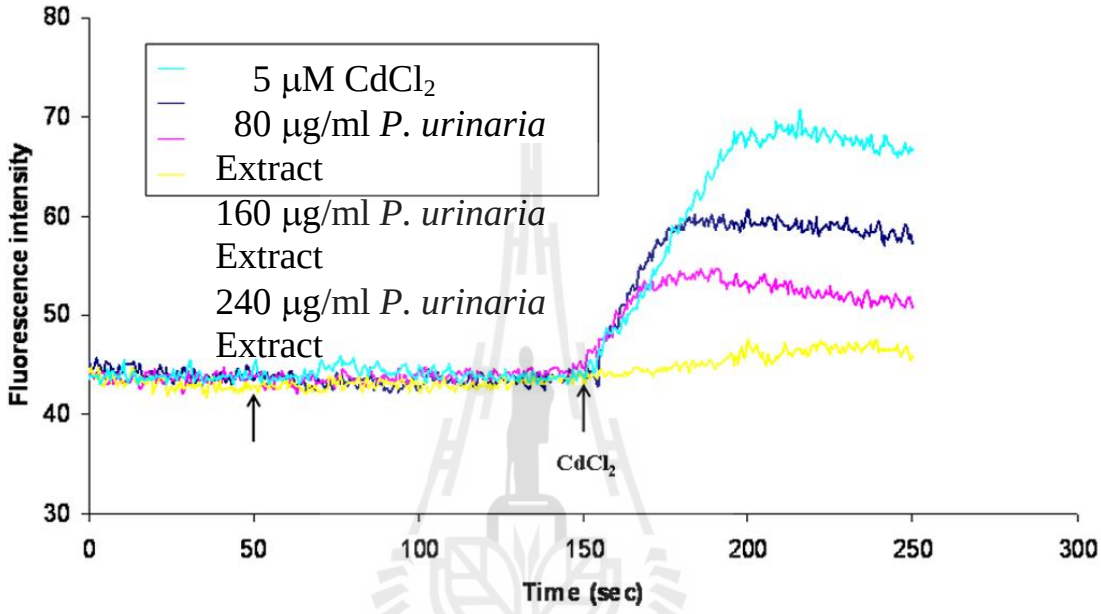

**รูปที่ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของลูกใต้ใบต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 และต่อค่าดัชนีการควบคุมการหายใจของไมโตคอนเดรีย** ค่าในแต่ละจุดคือ mean ± SEM; *, # และ † หมายถึง $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม; n=4

### 3.2 ผลของสารสกัดต่อความต่างศักย์ระหว่างด้านนอกและในของไมโตคอนเดรีย

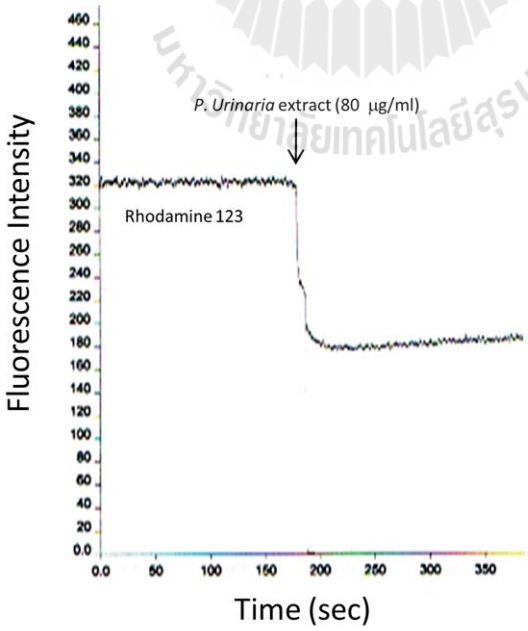
รูปที่ 3.3 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นต่อวิธีการวัดความต่างศักย์ระหว่างด้านนอกและในของไมโตคอนเดรียโดยใช้ $CdCl_2$ (1 μM) เป็นตัวกระตุ้น พบว่าสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าของไมโตคอนเดรียโดยใช้ rhodamine 123 เป็น probe ได้ตามที่มีผู้รายงานไว้ (Baracca et al., 2003) ผู้วิจัยจึงทดลองใช้สารสกัดร่วมกับ $CdCl_2$ พบว่าค่าการเรืองแสงหลังการกระตุ้นด้วย $CdCl_2$ ลดลง เสมือนหนึ่งว่าสารสกัดสามารถป้องกันการทำลาย proton gradient หรือความต่างศักย์ระหว่าง 2 ด้านของเมนเบรนชั้นในของไมโตคอนเดรียจากการชักนำของ $CdCl_2$ ได้ดังกราฟในรูปที่ 3.3a แต่หลังจากวัดอัตราส่วนระหว่างค่า excitation ที่ความยาวคลื่น 500 และ

ค่า emission ที่ความยาวคลื่น 527 ของสารสกัดร่วมกับ rhodamine 123 ในสารละลายที่ปราศจากไมโตคอนเดรีย พบว่าทำให้ค่า fluorescence intensity ของ rhodamine 123 ต่ำลง ดังแสดงไว้ในรูป 3.3 b ผลที่ได้ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดไปมีผลต่อการดูดกลืนแสงของ rhodamine 123 วิธีทดสอบนี้จึงไม่สามารถใช้วัดผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อศักย์ไฟฟ้าของไมโตคอนเดรียได้

(a)



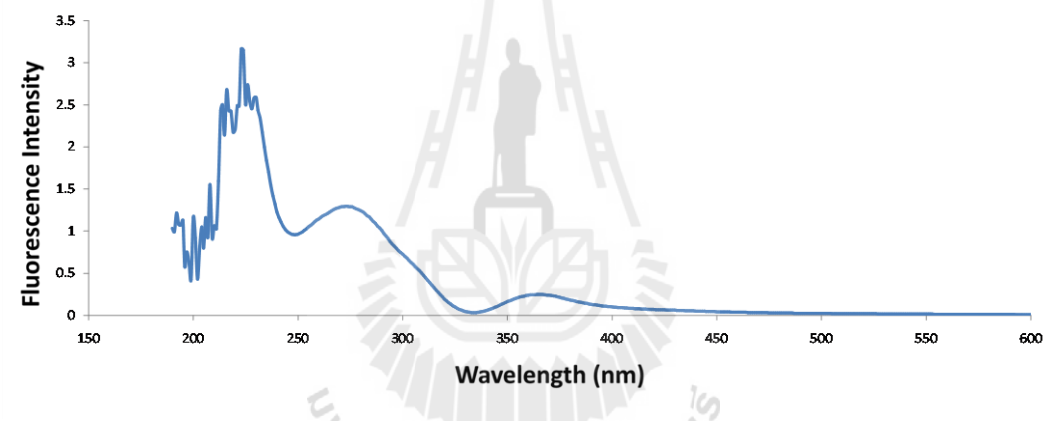

(b)




**รูปที่ 3.3 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อ Fluorescence intensity ของ rhodamine 123 (a)** ผลการกระตุ้นไมโตคอนเดรียด้วย $CdCl_2$ ขณะมีและไม่มีสารสกัด (b) ขณะที่ไม่มีไมโตคอนเดรีย

### 3.3 ผลของสารสกัดต่อไมโตคอนเดรียในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร

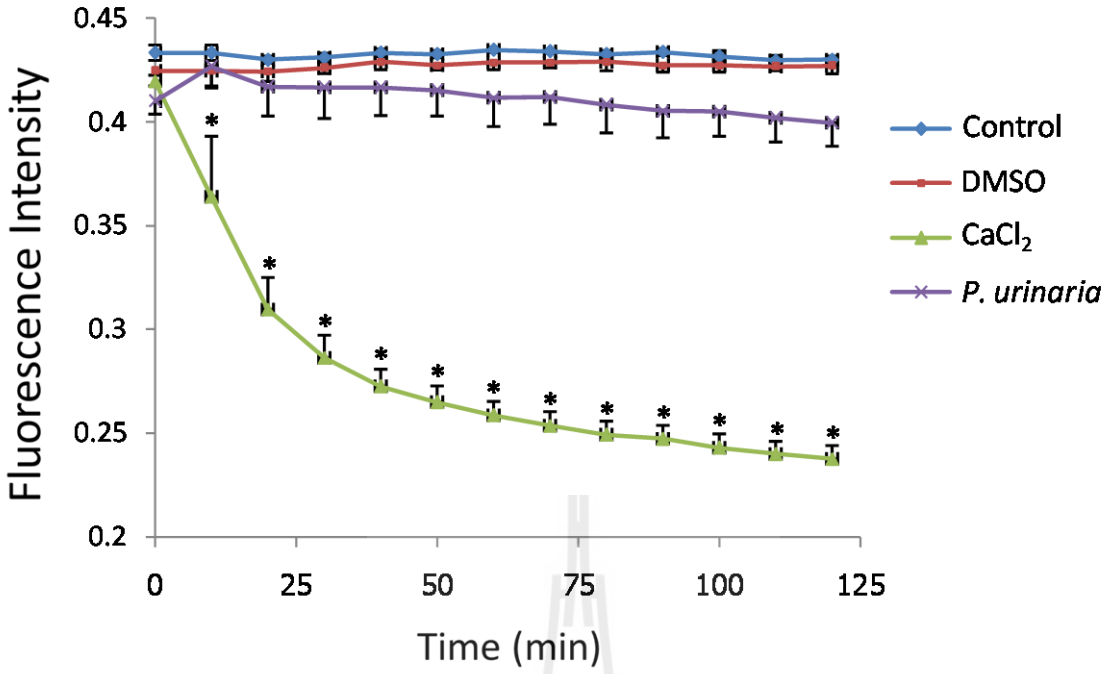
เนื่องจากเกิดปัญหาในการวัดความต่างศักย์ระหว่างด้านนอกและในของไมโตคอนเดรีย สาเหตุมาจากวิธีที่มีอยู่ ณ ปัจจุบันจำเป็นต้องใช้คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารที่ทำหน้าที่เป็น probe แต่สารสกัดเกิดการรบกวนการดูดกลืนแสงของ probe ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบผลต่อการบวมของไมโตคอนเดรียซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของไมโตคอนเดรียแทน เนื่องจากเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 520 นาโนเมตร ซึ่งได้ทำการตรวจสอบแล้วว่าสารสกัดไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ ดังรูปที่ 3.4 อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าสารสกัดไม่ได้ทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการบวมขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ $CaCl_2$ ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่าทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการบวม ดังรูปที่ 3.5



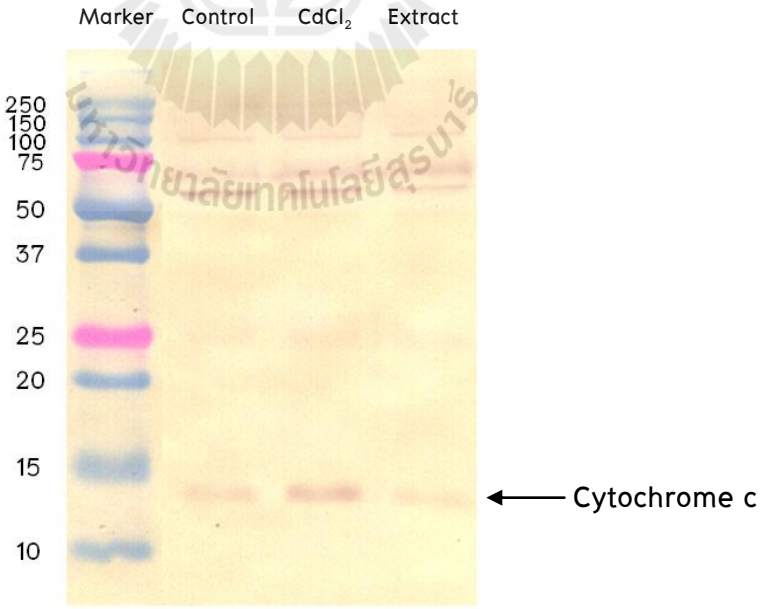

**รูปที่ 3.4 การดูดกลืนแสงของสารสกัดลูกใต้ใบ *P. urinaria* ความยาวคลื่นต่าง ๆ**

### 3.4 ผลของสารสกัดต่อการหลั่ง cytochrome c จากไมโตคอนเดรีย

ผลการทดลองในรูปที่ 3.6 ซึ่งเป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้ง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไม่มีผลต่อการหลั่ง cytochrome c จากไมโตคอนเดรียภายในระยะเวลา 10 นาทีที่บ่มด้วยสารสกัด ขณะที่ $CdCl_2$ ซึ่งเป็น positive control ทำให้ cytochrome c หลั่งออกมาเพิ่มขึ้น




**รูปที่ 3.5 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อเมมเบรนของไมโตคอนเดรียในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร** พบว่าสารสกัดไม่มีผลต่อการควบคุมดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ $CaCl_2$ (10 mM) ค่าในแต่ละจุดคือ mean ± SEM; * หมายถึง $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน; n=3




**รูปที่ 3.6 ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อการหลั่ง cytochrome c จากไมโตคอนเดรีย** พบว่าสารสกัดไม่มีผลต่อการการหลั่ง cytochrome c ขณะที่ $CdCl_2$ (5 μM) กระตุ้นให้ไมโตคอนเดรียหลั่งออกมาเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (n=3)

# บทที่ 4

## สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการวิจัยต่อยอดจากโครงการวิจัยเรื่อง "ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบ 3 ชนิด" ซึ่งพบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบทั้ง 3 ชนิดคือ *P. virgatus*, *P. amarus* และ *P. urinaria* มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ในงานวิจัยดังกล่าวผู้วิจัยได้พยายามหากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเพื่อใช้อธิบายความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และพบว่าสารสกัดกระตุ้นอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 หลังจากมีทบทวนวรรณกรรมแล้วพบว่า มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับลูกใต้ใบ 2 ชนิดในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ได้แก่ *P. amarus* (Rajeshkumar and Kuttan, 2000; Lawson-Evi et al., 2008) และ *P. urinaria* (Huang et al., 2003) จากการศึกษาการกระตุ้นการหายใจของเซลล์ HepG2 ที่ผ่านมาของผู้วิจัย พบว่า *P. urinaria* มีฤทธิ์ที่แรงกว่า *P. amarus* และเป็นที่ทราบกันดีว่า กลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ คือ การสูญเสียการทำงานปกติของไมโตคอนเดรียในการสร้าง ATP ทำให้เซลล์การขาดแคลนพลังงานที่นำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ (Bernardi et al., 2001) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปที่ผลของสารสกัดลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ต่อการทำงานของไมโตคอนเดรียเป็นสำคัญ

ผลการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียจากการศึกษานี้พบว่า สารสกัดลูกใต้ใบกระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 4 แต่ไปยับยั้งการหายใจใน state 3 ทำให้ค่าดัชนี RCR ลดลง ผลการทดลองชี้แนะว่าสารสกัดลูกใต้ใบออกฤทธิ์ไปขัดขวางการ coupling ระหว่างกระบวนการ respiration ใน electron transport chain และกระบวนการ phosphorylation ซึ่งน่าจะส่งผลให้สร้าง ATP ลดลง ฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดลูกใต้ใบนี้พบได้เช่นกันในพืชสมุนไพรชนิดอื่นซึ่งมีรายงานแล้วโดย Elingold และคณะ (2008) ซึ่งพบว่าสารกลุ่ม prenylated flavanone ที่ชื่อ 2',4'-dihydroxy-5'-(1'''-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin ที่สกัดได้จากรากของต้น *Dalea elegans* กระตุ้นการหายใจของไมโตคอนเดรียใน state 4 ขณะเดียวกันก็ยับยั้งการหายใจใน state 3 นอกจากนั้นยังมีรายงานพบว่า C-methylated flavonoids ซึ่งสกัดได้จากพืช *Myrica gale* Linn. ออกฤทธิ์ทำให้ไมโตคอนเดรียอยู่ในสภาวะ uncoupling ไม่สามารถเกิดกระบวนการ oxidative phosphorylation ได้ (Mathlesen et al., 1996) ฤทธิ์ในการเป็น uncoupler ของสารสกัดซึ่งสังเกตได้จากการกระตุ้น state 4 อาจเกิดจากสารกลุ่ม phenolic compound ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารสกัด โดยมีคุณสมบัติเป็น protonophoric uncouplers นักวิจัยชื่อ Canton และคณะ (1996) อธิบายฤทธิ์ดังกล่าวนี้ที่เกิดขึ้นโดยสารประกอบกลุ่ม myrigalones ซึ่งมีฤทธิ์เป็น

กรดและละลายได้ดีในไขมัน (lipophilic weak acid) ว่าเกิดจากการที่หมู่ phenol ในสารประกอบมีฤทธิ์ที่เรียกว่า protonophoric effect ทำให้ proton gradient ระหว่าง 2 ด้านของ inner membrane ของไมโตคอนเดรียสลายไป ผลคือไมโตคอนเดรียไม่สามารถสร้าง ATP ได้ นอกจากนั้นยังพบว่า epigallocatechin gallate ที่พบมากในชาเขียวและมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ polyphenols ก็มีฤทธิ์กระตุ้น state 4 และยับยั้ง state 3 respiration รวมทั้งลดค่า RCI index เช่นกัน (Trakamrungsee, 2004) เป็นไปได้มากว่าสารประกอบกลุ่ม phenolic ในสารสกัดลูกใต้ใบอาจเป็นสารที่มีรับผิดชอบต่อผลยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียที่พบในการศึกษาครั้งนี้ แต่จะเป็นสารใดนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อพิสูจน์ต่อไป

การใช้สาร rhodamine 123 เป็น probe ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้า (membrane potential) ของ ไมโตคอนเดรียเป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วไป (Baracca et al., 2003) โดยมีหลักการที่ว่าพลังงานที่ไมโตคอนเดรียสร้างขึ้นจะทำให้ rhodamine 123 เกิด fluorescence quenching reaction และปฏิกิริยานี้จะลดลงโดยแปรผันตาม membrane potential เนื่องจาก membrane potential จะก่อให้เกิดแรงผลักให้โปรตอนเคลื่อนที่ข้ามเมมเบรนและนำพลังงานไปสร้างเป็น ATP ผ่าน ATP synthase แต่เนื่องจากความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัด fluorescence quenching reaction ของ rhodamine 123 ต้องวัดอัตราส่วนระหว่างค่า excitation ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรและค่า emission ที่ความยาวคลื่น 527 นาโนเมตร และสีของสารสกัดลูกใต้ในการศึกษานี้รบกวนวิธีวัด ในการศึกษานี้ผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดลองโดยใช้ probe ชนิดอื่น เช่น Alexa หรือ Safranine เนื่องจากยังคงต้องใช้ความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกัน คือประมาณ 500 นาโนเมตร

เนื่องจากเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่า การบวมของไมโตคอนเดรียสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของไมโตคอนเดรียได้ (Narita et al., 1998) และผู้วิจัยได้ทดสอบแล้วว่าสารสกัดลูกใต้ใบไม่รบกวนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 520 นาโนเมตร ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีนี้ในการทดสอบและพบว่า สารสกัดทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการบวมเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามหากทดสอบทางสถิติร่วมกับการใช้ $CaCl_2$ ขนาดสูง (1 mM) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทราบว่าจะทำให้ไมโตคอนเดรียเกิดการบวม จะพบว่าการบวมซึ่งถูกชักนำโดยสารสกัดไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากทดสอบการรั่วของ cytochrome c แล้วพบว่าสอดคล้องกันคือ สารสกัดไม่มีผลต่อการหลุดออกของ cytochrome c จากไมโตคอนเดรีย การเพิ่มการหลั่งของ cytochrome c เป็นดัชนีชี้วัดอย่างหนึ่งของกระบวนการ apoptosis ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ caspase activation ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งของการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ เป็นไปได้ที่เวลาในการสัมผัสกับสารสกัดอาจมีส่วนในการทำให้ไม่สามารถสังเกตการเพิ่มขึ้นของความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อเมมเบรนของไมโตคอนเดรียและการหลั่ง cytochrome c เนื่องจากการทดสอบ

ผลที่สารสกัดฆ่าเซลล์นั้นทำการทดสอบหลังสัมผัสสาร 24 ชั่วโมง แต่ในการทดสอบกับไมโต-คอนเดรียใช้เวลาเพียงสั้นๆ เช่น ในการวัดการบวมของไมโตคอนเดรียมีการสัมผัสสารเป็นเวลา 2 นาที ซึ่งใน 2 นาทีนี้ positive control ที่ใช้คือ $CaCl_2$ ขนาดสูงทำให้เกิดการบวมอย่างรวดเร็ว ส่วนการวัดการหลั่ง cytochrome c ใช้เวลา 10 นาที ซึ่ง $CdCl_2$ สามารถกระตุ้นการหลั่ง cytochrome c ให้เพิ่มขึ้น ขณะที่สารสกัดลูกใต้ใบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวช้ากว่า positive control มาก

**สรุป** การศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบผลของสารสกัดลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบโดยใช้ 50% เมทานอลซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งตับ HepG2 นั้นส่วนหนึ่งน่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับไมโตคอนเดรีย คือ ไปรบกวนการหายใจหรือการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียโดยมีฤทธิ์เป็นทั้ง uncoupler และยับยั้งการสร้าง ATP ใน state 3 สารสกัดลูกใต้ใบมีผลต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารค่อนข้างน้อย และไม่มีผลต่อการหลั่ง cytochrome c ดังนั้นฤทธิ์ที่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ อาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากผลของต่อการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเป็นหลัก การทดสอบในการศึกษานี้มีข้อเสียเปรียบประการหนึ่งคือ เป็นการศึกษาโดยใช้สารสกัดหยาบ เนื่องจากสารสกัดหยาบมักจะมีส่วนประกอบที่เป็นสารเคมีมากมายหลายชนิด ฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบสารสกัดหยาบมักจะเป็นผลรวมของฤทธิ์จากสารเคมีเหล่านั้น ส่วนผสมบางอย่างอาจต้านฤทธิ์ของสารอีกชนิดหนึ่ง งานวิจัยจะมีประโยชน์มากขึ้นหากสามารถแยกสารประกอบบริสุทธิ์ออกมาทดสอบ เพื่อระบุชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ที่รับผิดชอบต่อผลที่พบจากงานวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# เอกสารอ้างอิง

Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., Lenaz, G. (2003) Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1606: 137–146.

Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F., Forte, M. (2001) A mitochondrial perspective on cell death. **Trends in Biochemical Sciences** 26: 112–117.

Canton, M., Gennari, F., Luvisetto, S., Azzone, G.F. (1996) The nature of uncoupling by n–hexane, 1–hexanethiol and 1–hexanol in rat liver mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta** 1274: 39–47.

Chance, B., Williams, G.R. (1955) A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature** 175: 1120–1121.

Chularojmontri, L., Wattanapitayakul, S.K., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsakul, S. (2005) Antioxidative and cardioprotective effects of Phyllanthus urinaria L. on doxorubicin–induced cardiotoxicity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 28: 1165–1171.

Elingold, I., Isollabella, M.P., Casanova, M.B., Celentano A.M., Perez, C., Cabrera, J.L., Diez, R.A., Dubin, M. (2008) Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. **Chemico–Biological Interactions** 171: 294–305.

Giridharan, P., Somasundaram, S.T., Perumal, K., Vishwakarma, R.A., Karthikeyan, N.P., Velmurugan, R., Balakrishnan, A. (2002) Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of c–myc and caspases leading to apoptosis. **British Journal of Cancer** 87: 98–105.

Hogeboom, G.H. (1955) Methods in enzymology. **Academic Press** 1: 16–19.

Hau, D.K.P., Gambari, R., Wong, R.S.M., Yuen, M.C.W., Cheng, G.Y.M., Tong, C.S.W., Zhu, G.Y., Leung, A.K.M., Lai, P.B.S., Lau, F.Y., Chan, A.K.W., Wong, W.Y., Kok, S.H.L., Cheng, C.H., Kan, C.W., Chan, A.S.C., Chui, C.H., Tang, J.C.O., Fong, D.W.F. (2009)

*Phyllanthus urinaria* extract attenuates acetaminophen induced hepatotoxicity: Involvement of cytochrome P450 CYP2E1. **Phytomedicine** 16: 751–760.

Huang, S.T., Yang, R.C., Chena, M.Y., Pang, J.H.S. (2004) *Phyllanthus urinaria* induces the Fas receptor/ligand expression and ceramide–mediated apoptosis in HL–60 cells. **Life Sciences** 75, 339–351.

Huang, S.T., Yang, R.C., Lee, P.N., Yang, S.H., Liao, S.K., Chen, T.Y., Pang, J.H.S. (2006) Anti–tumor and anti–angiogenic effects of Phyllanthus urinaria in mice bearing Lewis lung carcinoma. **International Immunopharmacology** 6: 870–879.

Huang, S.T., Yang, R.C., Yang, L.J., Lee, P.N., Pang, J.H.S. (2003) *Phyllanthus urinaria* triggers the apoptosis and Bcl–2 down–regulation in Lewis lung carcinoma cells. **Life Sciences** 72: 1705–1716.

Kumaran, A., Karunakaran, J.R. (2007) *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT – Food Science and Technology** 40: 344–352.

Lawson–Evi, P., Eklu–Gadegbeku, K., Agbonon, A., Aklikokou, K., Moukha, S., Creppy, E.E., Gbeassor, M. (2008) Toxicological assessment on extracts of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. **Scientific Research and Essays** 3: 410–415.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell–free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell** 86: 147–157.

Mathlesen, L., Malterud, K.E., and Sund, R.B. (1996) Uncoupling of respiration and inhibition of ATP synthesis in mitochondria by C–methylated flavonoids from *Myrica gale* L. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 4: 373–379.

Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. **Proceeding of National Academy of Sciences of the United State of America** 95: 14681–14686.

Rajeshkumar, N.V., Kuttan, R. (2000) *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology** 73: 215–219.

Shin, M.S., Kang, E.H., Lee, Y.I. (2005) A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus–e antigen secretion in HBV–infected hepatocytes. **Antiviral Research** 67: 163–168.

Szabó, E., Páska, C., Kaposi Novák, P., Schaff, Z., Kiss, A. (2004) Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. **Pathology and Oncology Research** 10: 5–11.

Thyagarajan, S., Jayaram, S., Gopalakrishnan, V., Hari, R., Jeyakumar, P., Sripathi, M. (2002) Herbal medicines for liver diseases in India. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 17: S370–S376.

Trakanrungsee, P. (2004) Effects of epigallocatechin gallate on respiratory function and monoamine oxidase activity of isolated rat liver mitochondria. M.S. thesis, Chulalongkorn University, Thailand, 103 pp.

Van Welzen, P., Chayamarit, K. (2007) Euphorbiaceae, in: Santisuk, T., Larsen, K. (Eds.), **Flora of Thailand**. Prachachon Co. LTD., Bangkok, pp. 473–507.

Velena, A., Zilbers, J., Duburs, G. (1999) Derivatives of 1,4–dihydropyridines as modulators of ascorbate–induced lipid peroxidation and high–amplitude swelling of mitochondria, caused by ascorbate, sodium linoleate and sodium pyrophosphate. **Cell Biochemistry and Function** 17: 237–252.

Wang, M., Cheng, H., Li, Y., Meng, L., Zhao, G., Mai, K. (1995) Herbs of the genus *Phyllanthus* in the treatment of chronic hepatitis B: observations with three preparations from different geographic sites. **Journal of Laboratory Clinical Medicine** 126: 350–352.

# ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี