ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 3A4 ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทย

Inhibition of cytochrome P450 3A4 by Thai herbal teas and fruit juices

ธันยาภรณ์ วงษ์ศรี[1], พรพิมล รงค์นพรัตน์[2], และ ทรงกลด สารภูษิต[1]*

Tunyaporn Wongsri[1], Pornpimol Rongnoparut[2] and Songklod Sarapusit[1]*

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

เอนไซม์ Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่ตับ ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายยาประมาณ 30% ของยาที่วางขายในปัจจุบัน เนื่องด้วยการรับประทานพืชสมุนไพรหรือผลไม้ควบคู่กับยา ทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยากับพืชสมุนไพร เพราะสารสมุนไพรออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ส่งผลกระทบต่อการย่อยสลายยาทำให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทยที่นิยมรับประทานต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 บริสุทธิ์ที่ได้จากการแสดงออกในระบบแบคทีเรียในหลอดทดลอง โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น 10% v/v น้ำขิงและน้ำมะเฟืองลดการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ได้ถึง 80% รองลงมาคือ น้ำทับทิม น้ำส้มเช้ง น้ำมะนาว และน้ำส้มเขียวหวาน (ลด 60-80%) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ควรที่จะระมัดระวังในการรับประทานยารักษาโรคที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP3A4 ร่วมกับพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยข้างต้น เพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้

คำสำคัญ : Cytochrome P450 3A4 / สมุนไพร / น้ำผลไม้ / การยับยั้ง

Abstract

The liver specific Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) enzyme plays an important role in metabolism of more than 30% of pharmaceutical drugs. However, inhibition of CYP3A4 activity by herbal or fruit constituents, the herb-drug interaction, could lead to various unpredicted side effects. In this study, the effect of popularly used herb and fruit juices were investigated on bacterially expressed and purified CYP3A4 enzyme *in vitro*. The remaining activities of CYP3A4 enzyme (testosterone 6ß-hydroxylation activity) at 10% v/v concentration of Thai herbs and fruit juices were determined. Among tested plant extracts (Anova, p-value < 0.05), *Zingiber officinale* and *Averrhoa carambola* juices could potently inhibit the human CYP3A4 by 80%, followed by *Punica granatum, Citrus reticulate*, *Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis* juices, (60-80%) respectively. According to the results, co-treatment of diseases by mentioned Thai herbs and fruit juices with pharmaceutical drug should be in caution, as the herb-drug interaction may lead to unpredictable outcome of treatment.

Keywords : Cytochrome P450 3A4 / Herbs / Fruit juices / Inhibition

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

1. บทนำ

ในปัจจุบันประชากรไทยมีแนวโน้มที่จะป่วยและเสียชีวิตจากโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูงเพิ่มมากขึ้น และเนื่องด้วยการรักษาโรคด้วยยาแผนปัจจุบันมักมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูง ดังนั้นผู้ป่วยและบุคคลทั่วไปจึงนิยมรับประทานสมุน ไพรและผลไม้ต่างๆ หรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นอาหารเสริมมากขึ้น อย่างไรก็ตามการรับประทานผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้ อาจมีปัญหาเกี่ยวกับความปลอดภัยที่อาจเกิดขึ้นเมื่อรับประทานร่วมกับยารักษาโรคต่างๆ ได้ (Food-drug interaction ; FDI หรือ Herb-drug interaction; HDI) เพราะสาระสำคัญในสมุนไพรหรือผลไม้ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายยารักษาโรค จึงส่งผลกระทบต่อประสิทธิ ภาพการรักษาและอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงจากยาที่รับประทานได้ (Hu *et al*, 2005) ทั้งนี้เพราะยารักษาโรคต่างๆ จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและถูกกระตุ้นหรือย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome P450 ที่ตับ โดยเฉพาะเอนไซม์ CYP3A4 ที่เป็นเอนไซม์ P450 ที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์ Cytochrome P450 reductase (CPR ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์ CYP3A4) ซึ่งพบมากที่สุดในตับและลำไส้เล็ก (~40% และ 80% ตามลำดับ) และสามารถทำปฏิกิริยากับยาต่างๆ ได้มากกว่า 150 ชนิดของยาที่วางขายในปัจจุบัน จากการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่รับประทานน้ำส้ม grape fruit ร่วมกับกับยาที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ CYP3A4 จะเกิดอาการข้างเคียงจากยาที่รับประทาน เนื่องจากสาร ประกอบทางธรรมชาติในน้ำส้ม grape fruit (*Citrus paradisi*) ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ทำให้ยาที่รับประทานเข้าไปถูกย่อยสลายช้าลง ดังนั้นยาจึงออกฤทธิ์นานขึ้นก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพตามมา (Bailey *et al*, 1993; Tassaneeyakul *et al*, 2000)

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำสมุนไพร และน้ำผลไม้ที่คนไทยนิยมรับประทานเพื่อสุขภาพที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ในหลอดทดลอง โดยนำพลาสมิด DNA ที่บรรจุยีน CYP3A4 มาเหนี่ยวนำการแสดงออกใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์และตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสาร testosterone ซึ่งเอนไซม์ CYP3A4 สามารถย่อยสลายได้ โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ 6ß-hydroxytestosterone ซึ่งนิยมนำมาใช้ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 (testosterone 6ß-hydroxylation) และทดสอบฤทธิ์ของพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำไปใช้เพื่อลดอัตราการเกิดผลกระทบต่างๆ เมื่อรับประทานร่วมกับยารักษาโรคต่างๆ ได้ (FDI หรือ HDI) ที่อาจเกิดขึ้นในขณะรับประทานยาต่อไป

2. วิธีการ (ภาพที่ 1)

2.1 การแสดงออกและทำบริสุทธิ์โปรตีน CYP3A4 และ CPR

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน CYP3A4 (ได้รับจาก Prof. Dr. Joyce D Goldstein, National Institute of Health, USA) และเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย 0.2 mM IPTG และ 0.005 mg/ml ∂ALA ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.4-0.6 เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รอบการปั่นเหวี่ยง 160 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับเอนไซม์ CPR ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ C41 (DE3) ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน CPR (ได้รับจาก Prof. Dr. Jung-Ja Kim, Medical College of Wisconsin, USA) และเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย 0.2 mM IPTG ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.4-0.6 เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รอบการปั่นเหวี่ยง 160 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์ CYP3A4 และ CPR โดยใช้หลักโครมาโตกราฟีที่มีโลหะนิกเกิลเป็นลิแกนด์ (Inui *et al*, 2007) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

2.2 การเตรียมน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้

ทำการซื้อพืชสมุนไพรและผลไม้ทั้งหมด 19 ชนิดจากตลาดแห่งเดียวกันในจังหวัดชลบุรี และนำมาเตรียมตามที่ได้มีรายงานไว้ (คมสัน หุตาแพทย์, 2549 และ รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550) ทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบ phenol (Shui and Leong, 2006) และสารประกอบ flavonoid (Liu *et al*, 2002) ในน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ที่ได้

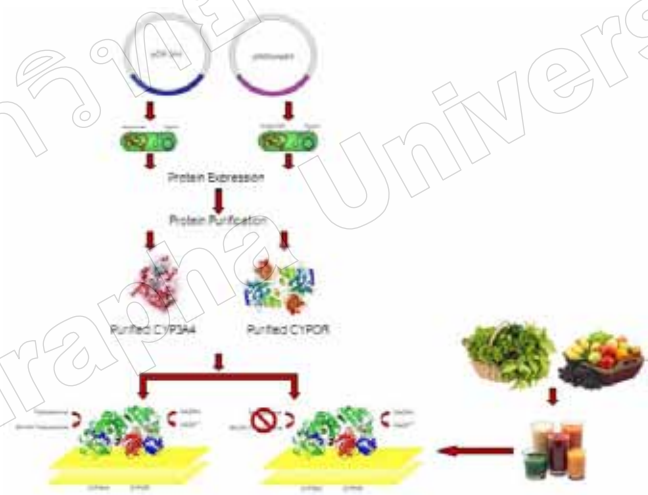
2.3 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CPR

ศึกษาปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเอนไซม์ CPR ไปยังตัวรับอิเล็กตรอน (Cytochrome c) โดยบ่มเอนไซม์ CPR บริสุทธิ์ที่ได้จากขั้นตอน 2.1 ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นร่วมกับ Cytochrome c (40 uM) ในสารละลาย 300 mM Kpi buffer pH 7.7 จากนั้นเติมสารละลาย NADPH (50 uM) เพื่อเริ่มปฏิกิริยา โดยการเพิ่มขึ้นของ Cytochrome c ในรูปรีดิวซ์ถูกวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่เพิ่มขึ้นที่ 550 นาโนเมตร (Sarapusit *et al*., 2008) ทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ โดยบ่มเอนไซม์ CPR และ Cytochrome c ร่วมกับน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% v/v แล้วเริ่มปฏิกิริยาด้วยสารละลาย NADPH ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS และ Prism5 เพื่อหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (remaining activity) เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CPR ในสภาวะที่ไม่มีน้ำสมุนไพรหรือน้ำผลไม้

2.4 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ CYP3A4 ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ศึกษาการเร่งปฏิกิริยา testosterone 6-β-hydroxylation ของเอนไซม์ CYP3A4 ในหลอดทดลอง (Reconstitution assay system) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Donato *et al* (2004) โดยบ่มเอนไซม์ CYP3A4 บริสุทธิ์ (100 µg โปรตีน) ร่วมกับเอนไซม์ CPR (10 unit) ในสารละลาย 50 mM Tris-Cl pH 7.4 เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงบ่มร่วมกับสารตั้งต้น testosterone (ความเข้มข้น 100 uM) และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 100 µM NADPH ทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (T_{20}) หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1 M HCl ผสม 40 µM androstenedione (Internal standard) แล้วสกัดด้วยสารละลาย ethyl acetate ระเหยให้แห้ง ละลายใน methanol แล้ววัดค่าการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (6ß-hydroxytestosterone) ด้วยวิธี HPLC UV detector โดยมีสารละลายเคลื่อนที่คือ 80% methanol และ 20% 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 อัตราการไหล 1 ml/min ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี Novapak-C18 ขนาด 3.9×300 mm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ต่างๆ โดยบ่มเอนไซม์ CYP3A4 และเอนไซม์ CPR ร่วมกับน้ำสมุนไพรหรือน้ำผลไม้ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% v/v และสารตั้งต้น testosterone จากนั้นเติม NADPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา ทำการหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CYP3A4 ในสภาวะที่ไม่มีน้ำสมุนไพรหรือน้ำผลไม้ และทดสอบค่าทางสถิติโดยใช้ Student's t-test และ analysis of variances ในโปรแกรม SPSS และ Prism5 เพื่อหาค่าสมุนไพรและน้ำผลไม้ที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด



ภาพที่ 1 ภาพรวมในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย การแสดงออกโปรตีน การทำบริสุทธิ์โปรตีน และการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ร่วมกับสารสกัดพืชสมุนไพรและผลไม้ไทย

3. ผลและอภิปราย

เมื่อทำการตรวจสอบโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue เมื่อทำบริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ CYP3A4 ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa และเมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ โดยวัดปฏิกิริยาการเพิ่มขึ้นของสารผลิตภัณฑ์ 6ß-hydroxytestosterone โดยวิธี HPLC (ภาพที่ 2) พบว่าเอนไซม์ CYP3A4 ที่ได้มีค่า specific activity เท่ากับ 0.2887 ± 7.77465E-06 µmol/6ß-hydroxytestosterone/min/µg protein ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Inui *et al*.,2007; Yamazaki *et al*., 2002)

จากการตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ พบว่า น้ำทับทิมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดคือ 1,393 ± 5.58 % mg gallic acid equivalent ต่อกรัมน้ำทับทิม รองลงมาได้แก่ น้ำเก๊กฮวย

น้ำมะตูม น้ำขิ้นฉ่าย น้ำบัวบก น้ำผักชี น้ำมะเฟือง น้ำหญ้าหมอน้อย และน้ำรางจืด (ประมาณ 300-800 mg gallic acid equivalent ต่อกรัมน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้) ในขณะเดียวกันน้ำทับทิมมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือ 312.51 ± 1.45% mg quercetin equivalent ต่อกรัมน้ำทับทิม รองลงมาได้แก่ น้ำดอกคำฝอย น้ำตะไคร้ น้ำถั่วเหลือง น้ำมะนาว น้ำส้มเขียวหวาน น้ำมะเฟือง น้ำหญ้าหนวดแมว น้ำหญ้าหมอน้อยและน้ำโปร่งฟ้า (ประมาณ 150-280 mg quercetin equivalent ต่อกรัมน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้)

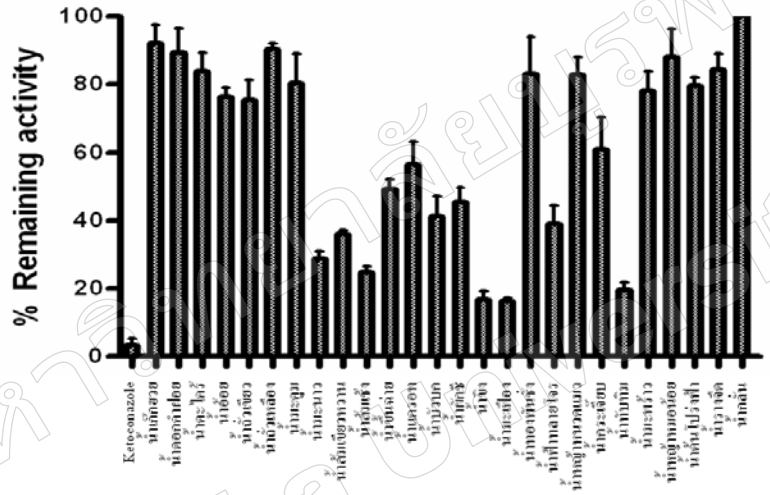
ภาพที่ 2 การตรวจสอบปฏิกิริยาของ CYP3A4 ต่อสารตั้งต้น testosterone (A) ที่เวลาเริ่มต้น (T_0) ปรากฏพีคของสารมาตรฐาน androstenedione (AND) และสารตั้งต้น testosterone (TST) ตามลำดับ (B) เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที (T_{20}) ปรากฏพีคของ สารผลิตภัณฑ์ 6ß-hydroxy testosterone (6□-TST ที่นาทีที่ 4.7) (C) การยับยั้งปฏิกิริยาของ CYP3A4 ต่อสารตั้งต้น testosterone (T_{20}) เมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดพืชสมุนไพรและผลไม้ไทย โดยพีคของสารผลิตภัณฑ์ 6ß-hydroxytestosterone มีขนาดลดลง

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ ที่ความเข้มข้น 10% v/v ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CYP3A4 พบว่าน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ CYP3A4 ได้แตกต่างกัน แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ไม่มี ความสัมพันธ์กับปริมาณของสารสำคัญฟีนอลและฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญ (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งอาจเกิดจากพืชสมุนไพรและผลไม้เหล่านี้อาจไม่มีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ได้ หรืออาจมีสารสำคัญในปริมาณที่น้อยมาก หรือมีสารสำคัญแต่การยับยั้งอาจมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน อันเนื่องจากความหลากหลายในเชิงโครงสร้างของสารประกอบทั้งสองกลุ่มนี้ ที่แม้จะมีโครงสร้างพื้นฐานที่ใกล้ เคียงกัน แต่อาจมีการเข้าจับในบริเวณเร่งของเอนไซม์ CYP3A4 ได้ต่างกัน

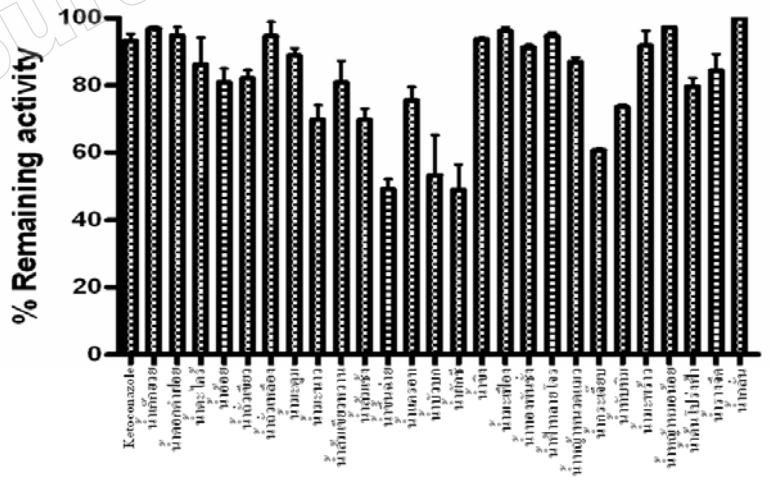
โดยน้ำขิงและน้ำมะเฟืองออกฤทธิ์ลดการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ได้ถึง 80% รองลงมาคือน้ำทับทิม น้ำส้มเช้ง น้ำมะนาว และน้ำส้มเขียวหวาน (ยับยั้ง 60-80%) ส่วนน้ำฟ้าทลายโจร น้ำบัวบก น้ำผักชี น้ำขิ้นฉ่าย น้ำแครอท น้ำกระเจี๊ยบ น้ำอ้อย น้ำถั่วเขียว และน้ำมะพร้าว (ยับยั้ง 20-60%) ในขณะที่น้ำโปร่งฟ้า น้ำมะตูม น้ำหญ้าหนวดแมว น้ำตะไคร้ น้ำรางจืด น้ำทองพันชั่ง น้ำหญ้าหมอน้อย น้ำดอกคำฝอย น้ำถั่วเหลือง และน้ำเก๊กฮวย ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยับยั้งมาตรฐาน Ketoconazole ที่ความเข้มข้น 10 µM (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำสมุนไพรและผลไม้ไทยร่วมกับ CPR พบว่า น้ำขิ้นฉ่าย น้ำผักชี น้ำบัวบกและน้ำกระเจี๊ยบ ยับยั้ง 50-60% รองลงมาคือน้ำมะนาว น้ำส้มเช้ง น้ำทับทิม น้ำแครอท และน้ำโปร่งฟ้า (ยับยั้ง 20-30%) ในขณะที่น้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ที่เหลือออกฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่า 20% (ภาพที่ 4) และเมื่อทำการวัดค่า pH ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ที่มีต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 (โดยค่า pH ในปฏิกิริยาที่ไม่เติมน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้เท่ากับ 7.5) พบว่า น้ำมะเฟืองมีฤทธิ์เป็นกรดค่อนข้างสูง (pH

ในปฏิกิริยาเท่ากับ 6.0) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ชนิดอื่นๆ เช่น น้ำขิง เป็นต้น (pH ในปฏิกิริยาเท่ากับ 7.5) ซึ่งค่าความเป็นกรด-เบส ของน้ำสมุนไพรและน้ำผลไม้ไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในน้ำขิง น้ำมะเฟือง และน้ำทับทิมสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CPY3A4 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Fujita *et al*., 2003; Guo *et al*., 2000; Hidaka *et al*.,2005; Hosoi *et al*., 2008; Nagata *et al*., 2007; Shui and Leong., 2006) เมื่อเปรียบเทียบกับ Ketoconazole ที่เป็นตัวยับยั้ง CYP3A4 มาตรฐาน แม้จะยังไม่สามารถทราบได้แน่ชัดว่าสารสำคัญใดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ของน้ำมะเฟืองและน้ำทับทิม แต่มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นสารในกลุ่ม furanocoumarin และ flavonoid บางชนิด ที่มีรายงานว่าพบในมะเฟืองสูง และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P450 ในคนได้ดี (Guo *et al*., 2000; Kim *et al*., 2006; Tassaneeyakul *et al*., 2000) สำหรับน้ำขิงที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ได้ดีเช่นกันนั้น พบว่ามีสารประกอบในกลุ่ม alkaloid ในปริมาณมาก (Guo *et al*., 2000) ถึงแม้ว่าสารในกลุ่ม alkaloid จะมีโครงสร้างพื้นฐานที่แตกต่างออกไป แต่มีความหลากหลายในโครงสร้างทางเคมีสูง (รัตนา อินทรานุปกรณ์ 2550) จึงเป็นไปได้ว่าสารนกลุ่มนี้บางชนิดที่อาจมีโครงสร้างที่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ CYP3A4 ได้



ภาพที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ CYP3A4 หลังจากทำการทดสอบร่วมกับสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (10% v/v) เมื่อทำการทดสอบทั้งหมดสามครั้ง และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS และ Prism5



ภาพที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ CPR หลังจากทำการทดสอบร่วมกับสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (10% v/v) เมื่อทำการทดสอบทั้งหมดสามครั้ง และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS และ Prism5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำส้มเช้ง น้ำมะนาว และน้ำส้มเขียวหวาน ซึ่งอยู่ใน genus citrus เช่นเดียวกันกับ grapefruit ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ได้โดยสารในกลุ่ม furanocoumarin (Guo *et al*., 2000; Kim *et al*., 2006; Tassaneeyakul *et al*., 2000) ออกฤทธิ์ยับยั้งประมาณ 60-80% ทั้งนี้อาจเกิดร่วมกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CPR (ยับยั้งประมาณ 20-30%) และน้ำในกลุ่มน้ำส้มนี้อาจส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P450 ตัวอื่นๆ ในการย่อยสลายยารักษาโรคได้ด้วยเช่นกัน เพราะเอนไซม์ CPR ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์ P450 ทุกไอโซฟอร์มในมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าน้ำฟ้าทลายโจรสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ได้มากกว่าเอนไซม์ CPR แสดงว่า น้ำฟ้าทลายโจรสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ได้โดยตรง (Pan *et al*., 2011; Pekthong *et al*., 2008) ส่วนน้ำบัวบก น้ำผักชี น้ำขึ้นฉ่าย น้ำแครอท น้ำกระเจี๊ยบ น้ำมะตูม และน้ำมะพร้าว สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งเอนไซม์ CYP3A4 และเอนไซม์ CPR ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ P450 ตัวอื่นๆ ได้เช่นเดียวกันกับน้ำส้มเช้ง น้ำมะนาว และน้ำส้มเขียวหวาน ในขณะที่น้ำอ้อย น้ำถั่วเขียว น้ำโปร่งฟ้า น้ำหญ้าหนวดแมว น้ำตะไคร้ น้ำรางจืด น้ำทองพันชั่ง น้ำหญ้าหมอน้อย น้ำดอกคำฝอย น้ำถั่วเหลือง และน้ำเก๊กฮวย พบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 และ CPR น้อยกว่า 20% และยังไม่มีการรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 จึงเป็นพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยที่นิยมรับประทานที่มีความปลอดภัยมากกว่าพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยชนิดอื่นๆ ที่ทำการศึกษา

4. บทสรุป

โดยสรุปผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าน้ำพืชสมุนไพรและน้ำผลไม้ไทยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4 ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายยาแผนปัจจุบันในคนได้ในระดับที่แตกต่างกันออกไป แม้ว่าผลการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สามารถนำมาบ่งบอกถึงประสิทธิภาพแท้จริงเมื่อนำมาใช้ได้ เนื่องจากยังต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เช่น การดูดซึมสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ของระบบย่อยอาหาร หรือการถูกขับออกจากร่างกายด้วยเอนไซม์อื่นๆ แต่ยังต้องควรระมัดระวังในการรับประทานพืชสมุนไพรและผลไม้ไทยร่วมกับยาแผนปัจจุบัน (Flockhart., 2007) เนื่องจากอาจส่งผลข้างเคียงต่อการย่อยสลายยาแผนปัจจุบันที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ CYP3A4 เช่น ยากดภูมิคุ้มกัน (cyclosporine) ยาลดระดับคอเลสเตอรอล (simvastatin หรือ lovastatin) และยานอนหลับ (midazolam) เป็นต้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนด้านงานวิจัยจากเงินงบประมาณงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล มหาวิทยาลัยบูรพา (#40/2555)

6. เอกสารอ้างอิง

คมสัน หุตะแพทย์ และ กำพล กาหลง. (2549). น้ำผักผลไม้ น้ำสมุนไพร คู่มืออาหารปลอดพิษ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กองบรรณาธิการวารสารเกษตรกรรมธรรมชาติ. 84 หน้า.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 215 หน้า.

Bailey DG, Arnold JM, Munoz C, Spence JD (1993) Grapefruit juice –felodipine interaction: mechanism, predictability and effect of naringin. *Clin Pharmacol Ther.* 53, 637-642.

Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón J. (2004) Fluorescence-based assay for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Disp* 32: 699-706

Flockhart, DA. (2007). Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine. http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.aspx.

Fujita, K., Hidaka, M., Takamura, N., Yamasaki, K., Iwakiri, T., Okumura, M., et al. (2003). Inhibitory effects of citrus fruits on cytochrome P450 3A (CYP3A) activity in humans. *Biolocial Pharmacology Bullein*, 26(9):1371-1373

Guo, LQ., Fukuda, K., Ohta, T. and Yamazoe, Y. (2000). Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition ofhuman CYP3A activity. *Drug Metabolism Disposition*, 28(7):766-771.

Hidaka, M., Okumura, M., Fujita, K., Okikubo, T., Yamasaki, K. and Iwakiri, T. (2005). Effect of pomegranate juice on human cytochrome P450 3A4 and carbamazepine pharmacokinetics in rat. *Drug Metabolism Disposition*, 33:644-648.

Hosoi, S., Shimizu, E., Arimori, K., Okumura, M., Hidaka, M., Yamada, M., *et al*. (2008). Analysis of CYP3A4 inhibitory components of star fruit (Averrhoa carambola L.) using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Nat Med*, 62:345-348.

Hu Z, Yang X, Ho PCL, Chan SY, Heng PWS, Chan E, Duan W, Koh1 HL and Zhou S. (2005) Herb-Drug Interactions: A Literature Review. *Drugs*. 65 (9): 1239-1282

Inui, H., Maeda, A. and Ohkawa, H. (2007). Molecular Characterization of Specifically Active Recombinant Fused Enzymes Consisting of CYP3A4 NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase, and Cytochrome b5. *Biochemistry*, 46, 10213-10221.

Kim, H., Yoon, YJ., Shon, JH., Cha, U., Shin, JG. and Liu, KH. (2006). Inhibitory effects of fruit juices on cyp3a activity. *Drug Metabolism Disposition*, 34(4):521-523.

Liu, M., Li, XQ., Weber, C., Lee, CY., Brown, J. and Liu, RH. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agriculteral Food Chemistry*, 50:2926-2930.

Nagata, M., Hidaka, M., Sekiya, H., Kawano, Y., Yamasaki, K. and Okumura, M. (2007). Effect of pomegranate juice on human cytochrome P450 2C9 and toibutamide pharmacokinetics in rat. *Drug Metabolism Disposition*, 35:302-305.

Pan, Y., Abd-Rashid, BA., Ismail, Z., Ismail, R., Mak, JW., Pook, P. et al. (2011). In vitro determination of the effect of Andrographis paniculata extracts and andrographolide on human hepatic cytochrome P450 activities. *Journal Nature Medicine*, 65:440-447.

Pekthong, D., Martin, H., Abadie, C., Bonet, A., Heyd, B., Mantion, G. et al. (2008). Differential inhibition of rat and human hepatic cytochrome P450 by Andrographis paniculata extract and andrographolide. *Journal of Ethnopharmacology*, 115:432-440.

Sarapusit S, Xia CW, Misra I, Rongnoparut P, Kim JJP (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. Arch. Biochem. Biophys. 277 (1): 53-58

Shui, GH. and Leong, LP. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97:277-284.

Tassaneeyakul, W., Guo, LO., Fukuda, K., Ohta, T. and Yamazoe, Y. (2000). Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochrome P450. *Archrive Biochemistry and Biophysic*, 378:356-363.

Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., et al. (2002). Roles of NADPH-P450 Reductase and Apo- and Holo-Cytochrome b5 on Xenobiotic Oxidations Catalyzed by 12 Recombinant Human Cytochrome P450s Expressed in Membranes of Escherichia coli. *Protein Expr Purif*, 24, 329-337.