ผลของไพเพอรีนที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโตคอนเดรีย ที่แยกจากตับหนูขาว

นางสาววันทนา เหรียญมงคล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2529

ISBN 974-567-033-2

012332
i17290843

THE EFFECT OF PIPERINE ON ENERGY-LINKED REACTIONS OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA

Miss Wantana Reanmongkol

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacology
Graduate School
Chulalongkorn University
1986

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของไพเพอรีนที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโตคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว
โดย	นางสาววันทนา เหรียญมงคล
ภาควิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จูฑะพงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จูฑะพงษ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อุษณา หงส์วารีวัธน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของไพเพอรีนที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโตคอนเดรีย ที่แยกจากตับหนูขาว

ชื่อนิสิต นางสาววันทนา เหรียญมงคล

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จูฑะพงษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร

ภาควิชา เภสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไพเพอรีนเป็นอัลคาลอยด์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของ piperidine amide พบเป็นส่วนประกอบของพริกไทยชนิดต่าง ๆ อยู่ในวงศ์ Piperaceae ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของไพเพอรีนอยู่ในรูป trans 2,4-pentadieneoic acid piperidide จากการศึกษาผลของไพเพอรีนที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวแสดงให้เห็นว่ากระบวนการนี้ถูกยับยั้งโดยไพเพอรีน ไพเพอรีนยับยั้งการเกิด state 3 respirationและ DNP-stimulated respiration นอกจากนี้ไพเพอรีนสามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่กำลังหายใจเมื่อมี glutamate + malate หรือ succinate เป็น respiratory substrate ไพเพอรีนสามารถยับยั้งการ oxidation ของ NADH หรือ succinate แต่ไม่มีผลต่อการ oxidation ของ ascorbate + TMPDใน hypotonic-treated mitochondria ไพเพอรีนสามารถกระตุ้นเอ็นไซม์ ATPase ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวแต่ฤทธิ์อ่อนกว่า DNP oligomycin และ atractyloside สามารถยับยั้งการกระตุ้นเอ็นไซม์ ATPase โดยไพเพอรีนได้บ้าง นอกจากนั้นแล้วไพเพอรีนสามารถยับยั้งการสะสมแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรียและทำให้ไมโตคอนเดรียปลดปล่อยแคลเซี่ยมที่สะสมไว้ออกมา ผลจากการศึกษานี้ชี้แนะว่าไพเพอรีนออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการ oxidative phosphorylation โดยไปยับยั้งการขนส่งอิเลคตรอนในกระบวนการลูกโซ่การหายใจของ

ไมโตคอนเดรีย ซึ่งตำแหน่งที่ไพเพอรีนไปออกฤทธิ์ควรจะอยู่ระหว่าง coenzyme Q และ cytochrome c โดยไม่มีผลต่อกระบวนการ phosphorylation ไพเพอรีนอาจออกฤทธิ์โดยตรงต่อ ATPase complex ของไมโตคอนเดรียในการกระตุ้น activity ของเอ็นไซม์ดังกล่าวนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title The Effect of Piperine on Energy-Linked Reactions of Isolated Rat Liver Mitochondria

Name Miss Wantana Reanmongkol

Thesis Advisor Associate Professor Prakorn Chudapongse, Ph.D.

Thesis Co-advisor Assistant Professor Withaya Janthasoot

Department Pharmacology

Academic Year 1986

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

Piperine is a member of the piperidine amide group of alkaloid found in various piper species of Piperaceae family. The chemical structure of piperine is trans 2,4-pentadieneoic acid piperidide. The results on the effect of piperine on oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria demonstrated that this process was inhibited by piperine. Both state 3 and DNP-stimulated respiration were depressed by piperine. Piperine also inhibited calcium-stimulated respiration by respiring mitochondria in the presence of glutamate + malate or succinate as respiratory substrates. Piperine diminished the oxidation of added NADH or succinate but had no effect on the oxidation of ascorbate + TMPD by hypotonic-treated mitochondria. Piperine also activated ATPase in rat liver mitochondria but was less potent than DNP. Oligomycin and atractyloside only partially inhibited the piperine-induced ATPase activity. In addition, piperine inhibited calcium uptake by mitochondria and promoted the release of accumulated calcium.

These findings strongly suggest that piperine interferes with oxidative phosphorylation and other energy-linked functions by retarding electron flow from coenzyme Q to cytochrome c in the mitochondrial respiratory chain. Piperine may act directly on ATPase complex to cause activation of this mitochondrial enzyme.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จูฑะพงษ์ แห่งภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ควบคุมการวิจัย และช่วยตรวจสอบงานวิจัยอย่างใกล้ชิด ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ และขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร แห่งภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ประสานงานการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์ หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยใช้ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยาตลอดจนเครื่องมือทางเภสัชวิทยา และขอขอบคุณ คุณวรรณา วรพิบูลย์ศักดิ์ นักวิทยาศาสตร์ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่อง refrigerated centrifuge แก่ผู้วิจัยด้วยไมตรีจิตอันดียิ่ง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณมูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนการศึกษาในขั้นมหาบัณฑิต และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จึงทำให้การวิจัยนี้สำเร็จได้ตามความมุ่งหมาย

วันทนา เหรียญมงคล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ช

กิตติกรรมประกาศ ..... ฌ

รายการตารางประกอบ ..... ฏ

รายการภาพประกอบ ..... ฐ

คำย่อ ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์ และวิธีทำการวิจัย 15

1. สัตว์ทดลอง 15

2. วิธีทำการวิจัย 15

2.1 การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว 15

2.2 การเตรียม hypotonic-treated mitochondria จากตับของหนูขาว 16

2.3 การ incubate ไมโตคอนเดรีย 16

2.4 การวัด oxygen uptake และการหาค่าอัตราส่วนของ ADP/O และค่าของดัชนีการควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index ย่อว่า RCI) .. 17

2.5 การวัดการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรีย 18

2.6 การวัด ATPase activity และการหาปริมาณของ inorganic phosphate 19

หน้า

2.7 การหาปริมาณของโปรตีน 19
3. สารเคมีและตัวยา 20
3. ผลการวิจัย 22
1. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation และการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 22
1.1 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation 22
1.2 ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 32
2. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondria (HTM) เมื่อใช้ NADH, succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrate 42
3. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย 52
4. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรีย 61
4. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 69
เอกสารอ้างอิง 78
ภาคผนวก 89
ประวัติ 93

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1. แสดงผลของ oligomycin หรือ atractyloside ที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียซึ่งถูกกระตุ้นโดยไพเพอรีน 59

2. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียเมื่อมี atractyloside ในขนาดต่าง ๆ 60

รายการภาพประกอบ

ภาพที่ หน้า

1. สูตรโครงสร้างทางเคมีของไพเพอรีน 2
2. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 24
3. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของ ADP และ DNP ในไมโต-คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ 27
4. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อมี succinate เป็น substrate 29
5. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของ ADP และ DNP ในไมโต - คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ เมื่อมี succinate เป็น substrate 31
6. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโต-คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 34
7. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ 37
8. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซี่ยมในไมโต - คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อมี succinate เป็น substrate 39
9. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของแคลเซี่ยมในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ เมื่อมี succinate เป็น substrate 41
10. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 44

ภาพที่ หน้า

11. dose-response curve ของผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย NADH ใน hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 46

12. dose-response curve ของผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย succinate ใน hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 48

13. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ ascorbate รวมกับ TMPD เป็น substrate 51

14. ผลของไพเพอรีนที่มีต่อ ATPase activity ซึ่งถูกกระตุ้นโดย DNP ที่ความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 54

15. ผลการกระตุ้น ATPase activity ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาวเมื่อใช้ไพเพอรีนที่ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ 56

16. แสดงผลของ atractyloside และ oligomycin ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโตคอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว 58

17. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมในไมโต-คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ glutamate รวมกับ malate เป็น substrate 63

18. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมในไมโต-คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ succinate เป็น substrate 65

19. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมในไมโต-คอนเดรียที่แยกจากเซลตับของหนูขาว เมื่อใช้ ATP แทน substrate 68

คำย่อ

ก.	=	กรัม
กก.	=	กิโลกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
นน.	=	น้ำหนัก
มก.	=	มิลลิกรัม
มคก.	=	ไมโครกรัม
มคม.	=	ไมโครโมล
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
g	=	centrifugal force unit (gravity)
mM	=	millimolar
M	=	molar
nm	=	nanometer
N	=	normality
ppm	=	part per million
/	=	per
%	=	percent

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย