

ผลต่อดับของ(+)กรดอัสนิกจากฝอยลมและ
การเหนียวนำเฮพาทิคไซโตโครม พี450 ในหนูขาว

นางสาวนุชจิรา พงศ์นิมิตประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-825-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HEPATIC EFFECT OF (+)-USNIC ACID FROM *USNEA SIAMENSIS* WAINIO AND INDUCTION
OF CYTOCHROME P450 IN RAT

MISS NUSHJIRA PONGNIMITPRASERT

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

Academic Year 1997

ISBN 974-638-825-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลต่อตับของ(+)กรดอัสนิกจากฝอยลมและการเหนียวน้ำ
เฮพาดิคไซโตโครม พี450 ในหนูขาว

โดย

นางสาว นุชจิรา พงศ์นิมิตประเสริฐ

ภาควิชา

เภสัชวิทยา

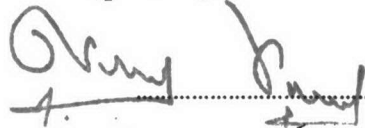
อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี

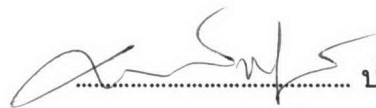
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

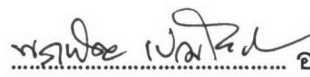
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุตินวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ศิริภรณ์ พุ่งวิทยา)



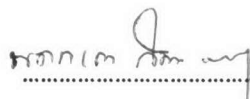
อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน)



อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี)



กรรมการ

(พันตำรวจโทหญิง ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

นุชจิรา พงศ์นิมิตประเสริฐ : ผลต่อตับของ(+)กรดอัลสนิกจากฝอยลมและการเหนี่ยวนำเฮปาทิคไซโตโครม
พี 450 ในหนูขาว (HEPATIC EFFECT OF (+)-USNIC ACID FROM USNEA SIAMENSIS WAINIO AND
INDUCTION OF CYTOCHROME P450 IN RAT) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน,
อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. นิจศิริ เรืองรังษี, 113 หน้า ISBN 974-638-825-8

(+)กรดอัลสนิก ((+)-usnic acid) เป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากฝอยลม (USNEA SIAMENSIS WAINIO) ได้ทำการ
ศึกษาการเกิดพิษต่อตับ, การเกิดพิษเมื่อให้ร่วมกับคาร์บอน เตตระคลอไรด์ และการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 isoenzymes
ในหนูขาวและ ในเซลล์ตับอิสระ โดยให้หนูขาวได้รับ(+)กรดอัลสนิกขนาด 50 และ 200 mg kg⁻¹ ทางช่องท้อง วันละครั้ง
เป็นเวลา 5 วัน อาศัยการตรวจวัด SGOT, SGPT และ จุลกายวิภาคศาสตร์ของตับ เป็นพารามิเตอร์บ่งชี้การเกิดพิษ
ต่อตับ (+)กรดอัลสนิกทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับและออร์แกเนลล์ที่สำคัญ ในขนาด 200 mg kg⁻¹ พบการเปลี่ยนแปลง
ของ mitochondria และ endoplasmic reticulum อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในเซลล์ตับอิสระ (+)กรดอัลสนิกความเข้มข้น 10⁻⁵, 10⁻⁴ และ 10⁻³ M มีผลเพิ่ม GOT, GPT,
malondialdehyde (MDA) และลด reduced glutathione content (GSH) ซึ่งเหมือนกับพิษที่เกิดจากคาร์บอน เตตระคลอไรด์
พิษต่อเซลล์ตับเพิ่มขึ้นเมื่อให้เซลล์ได้รับคาร์บอน เตตระคลอไรด์ร่วมกับ(+)กรดอัลสนิกในความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น

ในเซลล์ตับอิสระ (+)กรดอัลสนิกในความเข้มข้น 10⁻³ และ 10⁻² M มีผลเพิ่ม aniline hydroxylase activity
(CYP 2E1) แต่ให้ผลที่ลดลงต่อ aminopyrine N-demethylase activity (CYP 2B, 2C) ในความเข้มข้น 10⁻⁴ และ 10⁻³ M

การเกิดพิษต่อตับ การเกิดพิษเมื่อให้ร่วมกับคาร์บอนเตตระคลอไรด์ และการเหนี่ยวนำไซโตโครม พี450 2E1
โดย(+)กรดอัลสนิกสัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับ กลไกการเกิดพิษต่อตับยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับ
reactive metabolites ของ(+)กรดอัลสนิก

ภาควิชา เภสัชวิทยา
สาขาวิชา เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

3970853133 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: ENZYME INDUCTION / ISOLATED RAT HEPATOCYTES / (+)-USNIC ACID

NUSHJIRA PONGNIMITPRASERT : HEPATIC EFFECT OF (+)-USNIC ACID FROM *USNEA SIAMENSIS* WAINIO AND INDUCTION OF CYTOCHROME P450 IN RAT. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PORNPEN PRAMYOTHIN, Ph. D., THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. NIJSIRI RUANGRUNGSI, Ph. D., 113 pp. ISBN 974-638-825-8

(+)-Usnic acid is an important substance extracted from *Usnea siamensis* Wainio. Hepatotoxicity, combined toxic effect with carbon tetrachloride (CCl_4) and induction of cytochrome P450 isoenzymes by (+)-usnic acid were studied in rats and isolated rat hepatocytes. (+)-Usnic acid was administered intraperitoneally at the doses of 50 and 200 mg/kg/day for 5 days. The increase in SGOT, SGPT and histopathology were used as the criterion for liver injury. (+)-Usnic acid caused disruption of hepatocytes and important organelles. There were apparent morphological changes of mitochondria and endoplasmic reticulum at 200 mg/kg dose compared with control group.

In isolated rat hepatocytes, (+)-usnic acid at concentration of 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M increased GOT, GPT and MDA, and reduced GSH content. This effect was similar to CCl_4 induced cytotoxicity. The cytotoxicity increased with the combined exposure of CCl_4 and (+)-usnic acid in the above concentrations.

In isolated rat hepatocytes, (+)-usnic acid at concentration of 10^{-3} and 10^{-2} M increased aniline hydroxylase activity (CYP 2E1) but decreased aminopyrine N-demethylase activity (CYP 2B, 2C) at concentration of 10^{-4} and 10^{-3} M.

Hepatotoxicity, hepatotoxicity when combined with CCl_4 and induction of cytochrome P450 2E1 activity by (+)-usnic acid seem to correlate with dose administered. Mechanism of hepatotoxicity is still not clear but may involve the reactive metabolites of (+)-usnic acid.

ภาควิชา..... เกษัตริศาสตร์
สาขาวิชา..... เกษัตริศาสตร์
2540
ปีการศึกษา.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ตลอดการทำวิจัย ซึ่งสามารถทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์บัณฑิตศึกษาคณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุน การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษาตาม โครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ (U. D. C.)

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา, มารดา, พี่ชายและเพื่อนๆ ที่ให้การ สนับสนุนและกำลังใจตลอดการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

นุชจิรา พงศ์นิมิตประเสริฐ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฒ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่	

1. บทนำ (Introduction)

ฝอยลมและ Usnic acid.....	1
ตับ.....	10
ขบวนการเมตาบอลิซึมของตับ.....	15
กลไกการเกิดพิษต่อตับ.....	22
บทบาทของ Glutathione (GSH).....	32
กลไกการเกิดพิษต่อตับของคาร์บอนเตตระคลอไรด์.....	36
Induction และกลไกการเกิด Induction.....	37

2. สารเคมี-อุปกรณ์ และวิธีการ (Materials and Methods)

สัตว์ทดลอง.....	40
สารเคมีและเครื่องมือ.....	40
สถานที่ดำเนินการวิจัย.....	42
การเตรียมสารในการวิจัยและวิธีการทดลอง.	
การศึกษา in vivo.....	43
การศึกษา in vitro.....	48

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีดำเนินการวิจัย	
การศึกษา in vivo.....	55
การศึกษา in vitro.....	56
การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	59
 3. ผลการทดลอง (Results)	
การศึกษา in vivo	
การศึกษาขนาดและระยะเวลาการเกิดพิษของ	
(+)-usnic acid ต่อดับในหนูขาว.....	60
การศึกษา in vitro	
การศึกษาความเป็นพิษของ (+)-usnic acid ใน	
เซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	75
การศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้	
ร่วมกับ CCl ₄ ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	76
การศึกษาการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 (CYP 2B, 2C)	
ของ (+)-usnic acid ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว....	77
การศึกษาการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 (CYP 2E1)	
ของ (+)-usnic acid ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว....	77
 4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Conclusions and Discussions).....	88
รายการอ้างอิง.....	96
ภาคผนวก.....	103
ประวัติผู้เขียน.....	113

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. SGOT activity ในการศึกษาหาขนาดและระยะเวลา การเกิดพิษต่อตับของ (+)-usnic acid ในหนูขาว.....	103
2. SGPT activity ในการศึกษาหาขนาดและระยะเวลา การเกิดพิษต่อตับของ (+)-usnic acid ในหนูขาว.....	104
3. ผลของ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อ cell membrane integrity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	105
4. ผลของ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อระดับ reduced glutathione content (GSH) ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	106
5. ผลของ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเกิด lipid peroxidation (MDA) ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	107
6. ผลของ CCl ₄ ร่วมกับ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อ cell membrane integrity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	108
7. ผลของ CCl ₄ ร่วมกับ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อระดับ reduced glutathione content (GSH) ในเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	109
8. ผลของ CCl ₄ ร่วมกับ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเกิด lipid peroxidation (MDA) ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	110
9. ผลของ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อ aminopyrine N-demethylase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	111
10. ผลของ (+)-usnic acid ในความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อ aniline hydroxylase activity ของเซลล์ตับอิสระที่แยกได้จากหนูขาว.....	112

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1. ลักษณะทั่วไปของฝอยลม (<i>Usnea siamensis</i> Wainio).....	2
2. สูตรโครงสร้างทางเคมีของ (+)-usnic acid.....	4
3. โครงสร้างของตับ.....	12
4. ส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ตับ.....	13
5. เส้นเลือดที่มาเลี้ยงตับและการแบ่งไซนของ liver acinus.....	14
6. โครงสร้าง ferric protoporphyrin IX และ prosthetic group ของ cytochrome P450.....	18
7. catalytic cycle ของ cytochrome P450.....	20
8. บทบาทของ flavins ต่อการส่งผ่านอิเล็กตรอนของ cytochrom P450.....	21
9. triglyceride cycle ซึ่งเกี่ยวข้องกับกาเกิด liposes.....	25
10. ขบวนการเกิด lipid peroxidation.....	28
11. การสังเคราะห์และกลไกการทำงานของ reduced glutathione (GSH).....	35
12. แสดงกลไกการเกิดพิษของ CCl ₄	36
13. แสดงขบวนการเมตาบอลิซึมของ CCl ₄ ในตับ.....	37
14. ตำแหน่งการสอดท่อ cannula เข้า portal vein.....	51
15. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวปกติของกลุ่มควบคุม (กำลังขยาย x 3400).....	64
16. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวปกติของกลุ่มควบคุม (กำลังขยาย x 13600).....	65
17. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ DMSO (กำลังขยาย x 3400).....	66
18. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ DMSO (กำลังขยาย x 13600).....	67
19. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กำลังขยาย x 3400).....	68

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพที่	หน้า
20. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กำลังขยาย x 13600).....	69
21. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กำลังขยาย x 3400).....	70
22. ลักษณะของเซลล์ตับในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กำลังขยาย x 13600).....	71
23. ลักษณะของไมโทคอนเดรียในเซลล์ตับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กำลังขยาย x 68,000).....	72
24. ลักษณะของ dilated ER ในเซลล์ตับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กำลังขยาย x 68,000).....	73
25. ลักษณะของนิวเคลียสในเซลล์ตับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ (+)-usnic acid ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กำลังขยาย x 17,000).....	74

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1. activity ของเอนไซม์ SGOT ในซีรัมของหนูขาว จากการศึกษาขนาดและระยะเวลาการเกิดพิษต่อดับของ (+)-usnic acid ในหนูขาว.....	62
2. activity ของเอนไซม์ SGPT ในซีรัมของหนูขาว จากการศึกษาขนาดและระยะเวลาการเกิดพิษต่อดับของ (+)-usnic acid ในหนูขาว.....	63
3. activity ของเอนไซม์ GOT ที่ปล่อยจาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาความเป็นพิษของ (+)-usnic acid ต่อ isolated rat hepatocytes.....	78
4. activity ของเอนไซม์ GPT ที่ปล่อยจาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาความเป็นพิษของ (+)-usnic acid ต่อ isolated rat hepatocytes.....	79
5. reduced glutathione content (GSH) ใน isolated rat hepatocytes ในการศึกษาความเป็นพิษของ (+)-usnic acid ต่อ isolated rat hepatocytes.....	80
6. lipid peroxidation (MDA) จาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาความเป็นพิษของ (+)-usnic acid ต่อ isolated rat hepatocytes.....	81
7. activity ของเอนไซม์ GOT ที่ปล่อยจาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl ₄ ต่อ isolated rat hepatocytes.....	82
8. activity ของเอนไซม์ GPT ที่ปล่อยจาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl ₄ ต่อ isolated rat hepatocytes.....	83
9. reduced glutathione content (GSH) ใน isolated rat hepatocytes ในการศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl ₄ ต่อ isolated rat hepatocytes.....	84

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
10. lipid peroxidation (MDA) จาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาการเกิดพิษของ (+)-usnic acid เมื่อให้ร่วมกับ CCl_4 ต่อ isolated rat hepatocytes.....	85
11. aminopyrine N-demethylase activity จาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 (CYP 2B, 2C) ของ (+)-usnic acid ต่อ isolated rat hepatocytes.....	86
12. aniline hydroxylase activity จาก isolated rat hepatocytes ในการศึกษาการเหนี่ยวนำ cytochrome P450 (CYP 2E1) ของ (+)-usnic acid ต่อ isolated rat hepatocytes.....	87

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	=	Degree celsius
μl	=	Microlitre
%	=	Percent
BSA	=	Bovine serum albumin
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
ER	=	Endoplasmic reticulum
et al.	=	et alii (and other)
g	=	Gram
GSH	=	Reduced glutathione
HCl	=	Hydrochloric acid
i. p.	=	Intraperitoneal
kg	=	Kilogram
M	=	Molar
MDA	=	Malondialdehyde
MEM	=	Minimum Essential Medium Eagle
mg	=	Milligram
mg/kg	=	Milligram per kilogram body weight
ml	=	Millilitre
mM	=	Millimolar
nmole	=	nanomole
SEM	=	Standard error of the mean
SF units/ml	=	Sigma-Frankel units per millilitre
SGOT	=	Serum glutamate oxaloacetate transaminase
SGPT	=	Serum glutamate pyruvate transaminase
TBA	=	Thiobarbituric acid

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

TCA = Trichloroacetic acid
w/v = Weight by volume