

ผลของไฟเพอรินที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโทคอนเดรีย
ที่แยกจากตับหนูขาว



นางสาววันทนา เจริญมงคล

ศูนย์วิทยุโทรทรรศน์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2529

ISBN 974-567-033-2

012332

17290843

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

Miss Wantana Reanmongkol

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

ผลของไฟเพอรินที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโทคอนเดรีย
ที่แยกจากตับหนูขาว

โดย

นางสาววันทนา เจริญมงคล

ภาควิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา

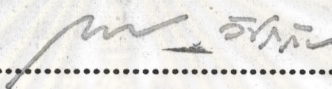
รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

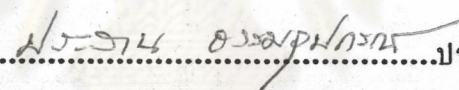
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร

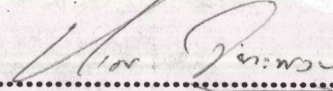


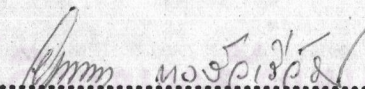
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้แนบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

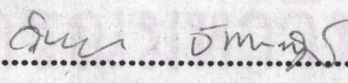

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชรากัญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ อุษณา หงส์วารีวัฒน์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของไพเพอรินที่มีต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับพลังงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับหนูขาว
ชื่อนิสิต	นางสาววันทนา เทริญมมงคล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จูชะพงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร
ภาควิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2529



บทคัดย่อ

ไพเพอรินเป็นอัลคาลอยด์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของ piperidine amide พบเป็นส่วนประกอบของพริกไทยชนิดต่าง ๆ อยู่ในวงศ์ Piperaceae ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของไพเพอรินอยู่ในรูป trans 2,4-pentadieneoic acid piperidide จากการศึกษาผลของไพเพอรินที่มีต่อกระบวนการ oxidative phosphorylation ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาวแสดงให้เห็นว่ากระบวนการนี้ถูกยับยั้งโดยไพเพอริน ไพเพอรินยับยั้งการเกิด state 3 respiration และ DNP-stimulated respiration นอกจากนี้ไพเพอรินสามารถยับยั้งการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่กำลังหายใจเมื่อมี glutamate + malate หรือ succinate เป็น respiratory substrate ไพเพอรินสามารถยับยั้งการ oxidation ของ NADH หรือ succinate แต่ไม่มีผลต่อการ oxidation ของ ascorbate + TMPD ใน hypotonic-treated mitochondria ไพเพอรินสามารถกระตุ้นเอนไซม์ ATPase ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาวแต่ฤทธิ์อ่อนกว่า DNP oligomycin และ atractyloside สามารถยับยั้งการกระตุ้นเอนไซม์ ATPase โดยไพเพอรินได้บ้าง นอกจากนั้นแล้วไพเพอรินสามารถยับยั้งการสะสมแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรียและทำให้ไมโทคอนเดรียปลดปล่อยแคลเซียมที่สะสมไว้ออกมา ผลจากการศึกษานี้ชี้แนะว่าไพเพอรินออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการ oxidative phosphorylation โดยไปยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการห่วงโซ่การหายใจของ

ไมโทคอนเดรีย ซึ่งตำแหน่งที่ไฟเฟอร์ินไปออกฤทธิ์ควรจะอยู่ระหว่าง coenzyme Q และ cytochrome c โดยไม่มีผลต่อกระบวนการ phosphorylation ไฟเฟอร์ินอาจออกฤทธิ์ โดยตรงต่อ ATPase complex ของไมโทคอนเดรียในการกระตุ้น activity ของเอ็นไซม์ ดังกล่าวนี



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
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



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.



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์ แห่ง ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ควบคุมการวิจัย และช่วยตรวจสอบงานวิจัยอย่างใกล้ชิด ตลอดจนให้ความรู้ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ และขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร แห่งภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นอาจารย์ ที่ปรึกษาร่วม ผู้ประสานงานการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์ หัวหน้าภาควิชา เภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยใช้ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา ตลอดจนเครื่องมือทางเภสัชวิทยา และขอขอบคุณ คุณวรรณ วรพิบูลย์ศักดิ์ นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่อง refrigerated centrifuge แก่ผู้วิจัยด้วยไมตรีจิตอันดียิ่ง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณมูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้สนับสนุนให้ทุน การศึกษาในชั้นมหาบัณฑิต และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการให้ ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จึงทำให้การวิจัยนี้สำเร็จได้ตามความมุ่งหมาย

วันทนา เจริญมงคล



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
กิตติกรรมประกาศ	ณ
รายการตารางประกอบ	ฎ
รายการภาพประกอบ	ฐ
คำย่อ	ฅ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	15
1. สัตว์ทดลอง	15
2. วิธีการวิจัย	15
2.1 การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับของหนูขาว	15
2.2 การเตรียม hypotonic-treated mitochondria จากตับของหนูขาว	16
2.3 การ incubate ไมโทคอนเดรีย	16
2.4 การวัด oxygen uptake และการหาค่าอัตราส่วนของ ADP/O และค่าของดัชนีการควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index ย่อว่า RCI) ..	17
2.5 การวัดการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมโดยไมโทคอนเดรีย	18
2.6 การวัด ATPase activity และการหาปริมาณของ inorganic phosphate	19

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

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงผลของ oligomycin หรือ atractyloside ที่มีต่อ เอ็นไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรียซึ่งถูกกระตุ้นโดยไพเพอรีน	59
2.	แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อเอ็นไซม์ ATPase ของไมโทคอนเดรีย เมื่อมี atractyloside ในขนาดต่าง ๆ	60

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
ศาลากลางกรมมหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1. สูตรโครงสร้างทางเคมีของ ไพเพอรีน	2
2. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาว	24
3. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของ ADP และ DNP ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ	27
4. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาว เมื่อมี succinate เป็น substrate	29
5. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของ ADP และ DNP ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ เมื่อมี succinate เป็น substrate	31
6. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาว	34
7. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ	37
8. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาว เมื่อมี succinate เป็น substrate	39
9. ผลการยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาวโดยไพเพอรีนในความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ เมื่อมี succinate เป็น substrate	41
10. แสดงผลของไพเพอรีนที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลล์ตับของหนูขาว	44

ภาพ

หน้า

11.	dose-response curve ของผลของไฟเพอรินที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย NADH ใน hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว	46
12.	dose-response curve ของผลของไฟเพอรินที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย succinate ใน hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว	48
13.	แสดงผลของไฟเพอรินที่มีต่อการหายใจของ hypotonic-treated mitochondria ที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว เมื่อใช้ ascorbate ร่วมกับ TMPD เป็น substrate	51
14.	ผลของไฟเพอรินที่มีต่อ ATPase activity ซึ่งถูกกระตุ้นโดย DNP ที่ความเข้มข้นขนาดต่าง ๆ ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว	54
15.	ผลการกระตุ้น ATPase activity ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ของหนูขาวเมื่อใช้ไฟเพอรินที่ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ	56
16.	แสดงผลของ atractyloside และ oligomycin ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดย ADP และ DNP ในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว	58
17.	แสดงผลของไฟเพอรินที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว เมื่อใช้ glutamate ร่วมกับ malate เป็น substrate	63
18.	แสดงผลของไฟเพอรินที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว เมื่อใช้ succinate เป็น substrate	65
19.	แสดงผลของไฟเพอรินที่มีต่อการสะสมและปลดปล่อยแคลเซียมในไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์ของหนูขาว 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