

ผลของซิลโลมารินต่อการทำงาน  
ของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับของหนูขาว

นางสาวอมรทัศน์ สดใส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-235-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECT OF SILYMARIN ON THE FUNCTION  
OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA**

**MISS AMORNTUS**

**SODSAI**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy**

**Department of Pharmacology**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

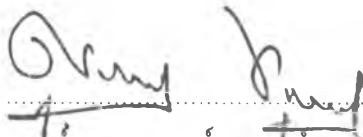
**Academic Year 1996**

**ISBN 974-636-235-6**

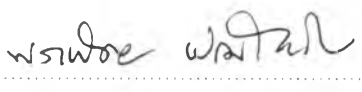
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของซิลโลมารินต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับ  
ของหนูขาว  
โดย นางสาวอมรทัศน์ สดใส  
ภาควิชา เภสัชวิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์  
อาจารย์ที่ปรึกษารวม ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิทยา จันทสุตร

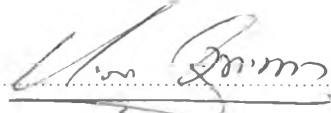
---

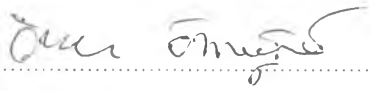
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

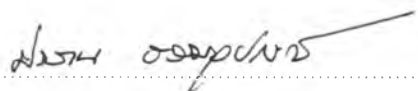
  
.....บัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุตินวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษารวม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสุตร)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาน ธรรมอุปกรณ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



อมรทัศน์ สดใส : ผลของซิลิมารินต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับของหนูขาว

( EFFECT OF SILYMARIN ON THE FUNCTION OF ISOLATED RAT LIVER

MITOCHONDRIA ) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ประกร จุฑะพงษ์ , อ. ที่ปรึกษาร่วม :

ผศ. วิทยา จันทสูตร , 98 หน้า . ISBN 974-636-235-6

ในการศึกษาถึงผลของซิลิมารินต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากตับของหนูขาว พบว่ามีผล 2 แบบต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย คือแบบที่ 1 เป็น uncoupler กระตุ้นการหายใจ state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate และกระตุ้นการทำงานของ ATPase ของไมโทคอนเดรีย แบบที่ 2 ซิลิมารินออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนที่ complex I และ complex II และ / หรือ complex III ของลูกลูโซการหายใจ ทำให้การหายใจ state 3 และ state 3u ของไมโทคอนเดรียมีอัตราการลดลงเมื่อใช้  $NAD^+$ -linked-substrate และ succinate เป็น substrate เป็นผลทำให้การควบคุมกันระหว่างกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริลเลชันเสียไป และทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรียลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าซิลิมารินยับยั้งการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรียด้วยแคลเซียม และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง monoamine oxidase การใช้ซิลิมารินอย่างไม่ถูกต้องหรือกรณีใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่อการทำงานของตับ แต่อย่างไรก็ตามคงต้องมีการศึกษาต่อไปถึงผลของซิลิมารินต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย ดังกล่าวว่ามีผลเกี่ยวข้องหรือไม่กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและ / หรือพิษวิทยาของยาตัวนี้

ภาควิชา ..... เภสัชวิทยา .....

สาขาวิชา .....

ปีการศึกษา ..... 2539 .....

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

# # : MAJOR

KEY WORDS : PHARMACOLOGY

: SILYMARIN / MITOCHONDRIA

AMORNTUS SODSAI : EFFECT OF SILYMARIN ON THE FUNCTION OF ISOLATED RAT LIVER MITOCHONDRIA . THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PRAKORN CHUDAPONGSE , Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. WITHAYA JANTHASOOT , 98 pp. ISBN 974-636-235-6

The effect of silymarin on the functions of isolated rat liver mitochondria has been studied. Silymarin has dual actions on mitochondrial respiration. This compound behaves as uncoupler by stimulating state 4 respiration using succinate as substrate and activating ATPase activity. This compound also acts as a respiratory chain inhibitor by inhibiting complex I and complex II and / or complex III of mitochondrial respiratory chain leading to reduction in state 3 and 3u respiratory rate with  $\text{NAD}^+$ -linked-substrate or succinate as substrates. These effects impair the coupling between oxidation and phosphorylation and reduce mitochondrial ATP synthesizing capability. In addition, calcium-stimulated respiration as well as monoamine oxidase activity are depressed by silymarin. These mitochondrial effects raise the possibility that improper or prolonged use of silymarin may adversely affect hepatic functions. It remains to be determined whether the effects of silymarin on mitochondrial functions have any contribution to the pharmacological and / or toxicological actions of this drug.

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา

สาขาวิชา.....

ปีการศึกษา.....2539

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ  
รองศาสตราจารย์ ดร. ประกร จุฑะพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วย  
ศาสตราจารย์วิทยา จันทสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์รวม ซึ่งให้ความช่วยเหลือและ  
กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในการวิจัยโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา  
ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆของภาควิชาในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณมารดา ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในเรื่องการศึกษา  
ตลอดมาและขอขอบคุณบุคคลแวดล้อมที่ได้มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

อมรทัศน์ สดใส

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.....	3
พิษวิทยาของ silymarin .....	6
การหายใจของไมโทคอนเดรียและออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน.....	11
2 อุปกรณ์และวิธีทำวิจัย	
สัตว์ทดลอง.....	30
การเตรียมไมโทคอนเดรียจากตับของหนูขาว.....	30
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	33
การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ ( RCI ) อัตราส่วน ADP/O และ	
อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ.....	37
การวัด ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย .....	42
การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย.....	44
การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี.....	45
การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	47

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3 ผลการวิจัย	
1. ผลของ silymarin ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่เตรียมจาก ตับของหนูขาว .....	48
1.1 ผลของ silymarin ในขนาดต่างๆที่มีต่ออัตราการ ใช้ออกซิเจนใน states ต่างๆของไมโทคอนเดรีย .....	48
1.2 ผลของ silymarin ในขนาดต่างๆที่มีต่อค่าดัชนีควบคุม การหายใจ( RCI ) อัตราส่วน ADP/O ของไมโทคอนเดรีย.....	49
1.2.1 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate .....	49
1.2.2 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate .....	50
1.3 ผลของ silymarin ต่อ state 3u respiration .....	50
1.3.1 เมื่อทดลองกับ intact mitochondria.....	50
1.3.2 เมื่อทดลองกับ osmotic-shocked mitochondria .....	51
1.4 ผลของ silymarin ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ NAD <sup>+</sup> -linked substrates ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ glutamate + malate.....	53
1.4.1 เมื่อใช้ $\beta$ -hydroxybutyrate เป็น substrate .....	53
1.4.2 เมื่อใช้ $\alpha$ -ketoglutarate เป็น substrate .....	53
1.5 ปัจจัยอื่นที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรีย.....	54
1.5.1 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin .....	54
1.5.2 ผลของ DTT.....	54
1.5.3 ผลของ bovine serum albumin.....	54



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2. ผลของ silymarin ต่อ ATPase activity ของไมโทคอนเดรีย.....	55
2.1 ผลของ silymarin ต่อ ATPase activity เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วย DNP.....	55
2.2 ผลของ silymarin ต่อ ATPase activity เมื่อถูกกระตุ้นด้วย DNP.....	56
3. ผลของ silymarin ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจโดยแคลเซียม.....	56
4. ผลของ silymarin ต่อ monoamine oxidase (MAO) activity .....	56
4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	84
เอกสารอ้างอิง.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	98

## สารบัญตาราง

หน้า

## ตารางที่

1	แสดงส่วนโครงสร้างของโมเลกุลของสารพวก flavonoids ที่มีผลต่อเอนไซม์ต่างๆ.....	2
2	แสดงถึง mitochondrial membrane transport system.....	13
3	แสดงถึงเอนไซม์ชนิดต่างๆในแต่ละส่วนของ ไมโทคอนเดรีย .....	13
4	แสดงส่วนประกอบต่างๆของ complexes ของ respiratory chain ที่อยู่ในผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย.....	20
5	ผลของ silymarin ต่อค่าดัชนีควบคุมการหายใจ ( RCI ) อัตราส่วน ADP/O ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate และ succinate เป็น substrates.....	67
6	ผลของ silymarin ต่อ state 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate , succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrates .....	68
7	ผลของ silymarin ต่อ state 3u respiration ของ osmotic-shocked mitochondria เมื่อใช้ NADH , succinate และ ascorbate + TMPD เป็น substrates .....	69
8	ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ของ incubation medium ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อ state 3 , 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate .....	74
9	ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ในการยับยั้งการหายใจ state 4, 3 และ 3u respiration ของ ไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate.....	75

## สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

10 ผลของ DTT ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ในการกระตุ้นการหายใจ state 4, การยับยั้งการหายใจ state 3 และ 3u respiration ของ ไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ succinate เป็น substrate .....	76
11 ผลของ silymarin ต่อ ATPase activity ของ ไมโทคอนเดรีย เมื่อมีหรือไม่มี DNP .....	79

## สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1	แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ silymarin .....	2
2	แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของไมโทคอนเดรีย.....	12
3	แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเอนไซม์ ATP synthase.....	12
4	แสดง $F_0F_1$ ATPase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาทั้งการสลายและการสังเคราะห์ ATP.....	15
5	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Krebs'cycle , respiratory chain และ ปฏิกิริยา oxidative phosphorylation.....	16
6	แสดงกระบวนการ oxidative phosphorylation และการแบ่งส่วนประกอบ ของ respiratory chain ของไมโทคอนเดรีย.....	19
7	แสดงการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระในขณะที่ยูนิคอนถูกส่ง ผ่านลูกลูโซการหายใจ .....	21
8	แสดงความเกี่ยวข้องระหว่างการส่งผ่านอิเล็กตรอนในลูกลูโซการหายใจกับปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ที่อธิบายโดย Chemiosmotic coupling hypothesis .....	23
9	ตำแหน่งที่มีการยับยั้งการหายใจ โดยสารยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอน ในลูกลูโซการหายใจ.....	27
10	แสดงความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงาน ที่ไมโทคอนเดรียสงวนไว้.....	28
11	แสดงขั้นตอนการแยกไมโทคอนเดรียจาก liver homogenate โดย differential centrifugation .....	31
12	แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลอง เพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียในสภาวะต่างๆ.....	34
13	แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode.....	35
14	ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI.....	41

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

15 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O .....	41
16 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโทคอนเดรีย ในระยะต่างๆ .....	41
17 ผลของ silymarin ในขนาด 150 , 300 , 375 $\mu$ M ที่มีต่อ อัตราการหายใจ ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate .....	60
18 Dose-response curve ของ silymarin ที่มีต่อ state 4 , 3 และ 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate .....	62
19 ผลของ silymarin ในขนาด 150 , 300 , 375 $\mu$ M ที่มีต่ออัตราการหายใจ ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate .....	64
20 Dose-response curve ของ silymarin ที่มีต่อ state 4 , 3 และ 3u respiration ของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ succinate เป็น substrate .....	66
21 ผลของ silymarin ในขนาด 300 $\mu$ M ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ $\beta$ -hydroxybutyrate เป็น substrate .....	71
22 ผลของ silymarin ในขนาด 300 $\mu$ M ที่มีต่ออัตราการหายใจของ ไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ $\alpha$ -ketoglutarate เป็น substrate .....	73
23 ผลของ bovine serum albumin (BSA ) ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ silymarin ต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate .....	78
24 ผลของ silymarin ที่มีต่อการกระตุ้นการหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยแคลเซียม เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate .....	81
25 ผลของ silymarin ต่อ monoamine oxidase activity ของไมโทคอนเดรีย .....	83

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

หนม.	=	นาโนโมล
มก.	=	มิลลิกรัม
มคล.	=	ไมโครลิตร
มคอ.	=	ไมโครอะตอม
มล.	=	มิลลิลิตร
ADP	=	adenosine-5'-diphosphate
ATP	=	adenosine-5'-triphosphate
BSA	=	bovine serum albumin
C°	=	degree Celsius
Ca <sup>2+</sup>	=	calcium ion
CCCP	=	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DNP	=	2,4-dinitrophenol
DTT	=	dithiothreitol
EGTA	=	ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminocethyl ether) N,N, N',N'-tetraacetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH <sub>2</sub>	=	reduced flavin adenine dinucleotide
FMN	=	flavin mononucleotide
g	=	centrifugal force unit ( gravity )
H <sup>+</sup>	=	proton
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
K <sup>+</sup>	=	potassium ion
M	=	molar
mM	=	millimolar

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ( ต่อ )

mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mOsm	=	milliosmolar
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
NAD <sup>+</sup>	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
natom	=	nanoatom
O	=	oxygen
Pi	=	phosphate
RCI	=	respiratory control index
RPM	=	revolution per minute
SIL	=	silymarin
TMPD	=	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent