

บทคัดย่อ

ต้นครีเป็นพืชในสมาชิวงศ์ถั่ว (Fabaceae) ที่มีการใช้เป็นยาแผนไทยในโรคสตรีที่มีระดูผิดปกติ แต่ยังไม่มีการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อใช้อธิบายฤทธิ์ดังกล่าว งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมี และตรวจสอบโครงสร้างสารประกอบทางเคมีจากแก่นของต้นครี ทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ โดยในการศึกษาได้ใช้การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีต่างๆ และตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค NMR, UV, CD, Mass spectrometer จากนั้นสารบริสุทธิ์จะนำมาทดสอบคล้ายเอสโตรเจนของสารประกอบทางเคมีบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T47-D และศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารประกอบกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบทางเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด 34 สาร ในจำนวนนี้มีสารใหม่จำนวน 9 สาร ได้แก่ krinone A-E, 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone และสารเคยทราบแล้ว 22 สาร ได้แก่ 7-Demethylrobustigenin, 2-Methoxybiochanin A, Tectoritigenin, Pratensein, 2'-Methoxyformononetin, Formononetin, 3'-Methoxydaidzein, Calycosin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Bowdichion, Violanone, Isodalparviquinone, Isodarparvinol B, 2',3',7-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone, Claussequinone, 4',7-Dihydroxyflavone, 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin, 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, Xenognsin และ 2'-Methoxyisoliquiritigenin และจากการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ในการคล้ายเอสโตรเจน พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Khrinone D, Biochanin A, Tectoritigenin, 2'-Methoxyformononetin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, Isodarparvinol B, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Claussequinone, 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin 4',7-Dihydroxyflavone, 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, Xenognsin และ 2'-Methoxyisoliquiritigenin ทั้งนี้สารประกอบที่มีความแรงมากที่สุด ได้แก่ 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Genistein และ Claussequinone ซึ่งมีค่า EqE_{10} ซึ่งมีค่าความเข้มข้นในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ และการทดสอบด้วย luciferase reporter gene พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Khrinone D, Biochanin A, Formononetin, Theralin, Genistein, Bowdichione, Liquiritigenin, Naringenin, 4',7-Dihydroxyflavone, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan และ Xenognsin ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความแรงสูงโดยมีค่าความเข้มข้น (EqE_{10}) ในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ พบว่าฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขึ้นกับการมีอยู่ของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 7 และ 4' ของ ring A ของ flavonoids ซึ่งจะเกิดอันตรกิริยาที่ histidine 524 และ หมู่hydroxyl ตำแหน่งที่ 3' และ 5' ของวงอะโรมาติก B ของ flavonoids จะเกิดอันตรกิริยากับ glutamine 353, arginine 394 สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์เชิงปริมาณ (QSAR) ที่เอื้อให้โครงสร้างของสารจับรีเซพเตอร์ estrogen receptor α and β ($ER\alpha$ และ $ER\beta$) อธิบายในเชิงพลังงานพันธะในการเกิดอันตรกิริยา (affinity) ที่

ดีและมี correlation R^2 value 0.89 ในการ validation model ระหว่าง observed estrogenic activities and computed descriptors โดยใช้ LigScore scoring function of Cerius2 virtual screening module จากการศึกษาสรุปได้ว่าการเกิดอันตรกิริยาของ $ER\alpha$ และ $ER\beta$ ไม่มีผลเกี่ยวเนื่องกันหรือเป็นอิสระต่อกัน ดังนั้น การกระตุ้นอันตรกิริยา และการแย่งจับของสารกับรีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดเกิดขึ้นด้วยการมีอยู่ หรือการหายไป ของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่อธิบายในข้างต้น ซึ่งใช้เป็นการพิจารณาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของ สารที่ออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับเอสโตรเจนได้ หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึก งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการสนับสนุนองค์ความรู้ใหม่เพื่อใช้ในการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับกลไกของการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยก ได้ทั้งในระดับในกาย (*in vivo*) ในระดับโมเลกุล

คำสำคัญ : ศรี, ไฟโตเคมี, ฤทธิ์เอสโตรเจน, การทดสอบในเซลล์, การทดสอบด้วยคอมพิวเตอร์

Abstract

Dalbergia parviflora Roxb is a family member of Fabaceae has been used to normalize the menstruation in Thai traditional medicine. To support its common use, further investigation on its constituents were carried out. the heartwood was chromatographed on a silica gel column chromatography and elucidate structure by using spectroscopic technique such as UV, NMR, MS. Estrogenic activity and antiestrogenic activities were evaluated by monitoring cell proliferation of estrogen responsive human breast cancer, MCF-7 and T47D cells and luciferase reporter gene assay. This set of compounds was studied by means of computational techniques including quantitative structure-activity relationships (QSAR) and molecular modeling. This investigation yields 34 compounds with 9 novel compounds e.g. krinone A-E, 7,4'-dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, isodalparviquinone, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone and 22 known compounds such as 7-demethylrobustigenin, 2-methoxybiochanin A, tectoritigenin, pratensein, 2'-methoxyformononetin, formononetin, 3'-methoxydaidzein, calycosin, theralin, genistein, 4',7-dihydroxy-8-methoxyisoflavone, bowdichion, violanone, isodalparviquinone, isodarpavinol B, 2',3',7-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone, claussequinone, 4',7-dihydroxyflavone, 3',4',6-trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin, 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, xenognsin and 2'-methoxyisoliquiritigenin. It was found that 7,4'-dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, khrinone D, biochanin A, tectoritigenin, 2'-methoxyformononetin, theralin, genistein, 4',7-dihydroxy-8-methoxyisoflavone, 7,4'-dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, isodalparviquinone, isodarpavinol B, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone, claussequinone, 3',4',6-trihydroxy-7-methoxyflavanone, liquiritigenin, naringenin 4',7-dihydroxyflavone, 6,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, xenognsin and 2'-methoxyisoliquiritigenin, among these 4',7-dihydroxy-8-methoxyisoflavone, genistein and claussequinone at EqE_{10} less than 0.01 μ M. The determination by luciferase reporter gene found that 7,4'-Dihydroxy -1'-methoxyisoflavanone, khrinone D, biochanin A, formononetin, theralin, genistein, bowdichione, liquiritigenin, naringenin, 4',7-Dihydroxyflavone, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan and xenognsin showed high potency at $EqE_{10} < 0.01 \mu$ M. The estrogenic potencies of the studied compounds depend mainly upon the presence/absence of hydroxyl groups attached to 3' and 5' positions of B ring of the isoflavone scaffold and the inter-atomic distance between the hydroxyl groups attached to the outer terminal positions 7 of A ring and 4' of B ring. In a QSAR model employing ligand-receptor interaction energy descriptors, the LigScore scoring function of Cerius2 virtual screening module, which describes the receptor affinities of simultaneous binding to estrogenic receptors α and β ($ER\alpha$ and $ER\beta$), led to the best correlation between the observed estrogenic activities and computed descriptors. Correlation with R^2 value of 0.89 confirmed the validity of this model. Consideration of independent binding to $ER\alpha$ and $ER\beta$

did not result in statistically significant QSAR models. It was thus concluded that simultaneous and possibly competitive interaction of the compounds with the ER α and ER β receptors, in which the presence of hydroxyl groups at the abovementioned positions of the isoflavonoids and diphenolics molecular scaffold plays a dominant role, may determine the estrogenic potency of the considered phytochemicals. The further study, the mechanism of action *in vivo* model and molecular level would be examined for development of phytoestrogen therapy or anticancer induced by estrogen hormone.

Keywords : *Dalbergia parviflora*, phytoestrogen, estrogenic activity, cell based assay, *in silico*