การศึกษาโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งของควิโนนรีดักเทส 2 เป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับยับยั้งมะเร็งเต้านม

พรรณราย ศิยะพงษ์ สิริธร สโมสร และมะยูโซ๊ะ กูโน*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วัฒนา กรุงเทพฯ 10110
*E-mail: mayuso@swu.ac.th

รับบทความ: 24 ตุลาคม 2556 ยอมรับตีพิมพ์: 12 ธันวาคม 2556

บทคัดย่อ

ควิโนนรีดักเทส 2 (QR2) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยารีดักชันของควิโนนไปเป็นไฮโดรควิโนนซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์เอสโทรเจน มีรายงานว่าเอนไซม์ QR2 สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนควิโนนไปเป็นสารพิษที่มีความว่องไวสูงในการทำลายดีเอ็นเอและมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งเต้านม ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ QR2 ช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายจากสารพิษเหล่านั้นได้ งานวิจัยนี้ศึกษาโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งของเอนไซม์ QR2 ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายสำหรับยับยั้งการเกิดมะเร็งเต้านม โดยศึกษาโครงสร้างและอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้ง XM5 กับเอนไซม์ QR2 ที่อยู่ในบริเวณการจับของเอนไซม์ที่มีรหัส 3G5M.pdb จากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีนซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF–7 โดยใช้วิธีการคำนวณทางโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งด้วยโปรแกรม AutoDock 4.2 เพื่อออกแบบโมเลกุลใหม่หรือพัฒนาโมเลกุลเดิมให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ QR2 ดีขึ้น จากการศึกษาพบว่า โครงสร้างของสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนที่มีหมู่แอริลออกซีที่ตำแหน่ง C–13 และมีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ที่ตำแหน่ง C–9 และ C–10 จะให้ค่าพลังงานยึดเหนี่ยวดีที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวสามารถออกแบบโครงสร้างตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นได้ 3 โครงสร้าง

คำสำคัญ: ควิโนนรีดักเทส 2 โมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง เบอร์เบอรีน มะเร็งเต้านม

Molecular Docking Investigation of Quinone Reductase 2 as a Target Enzyme for Breast Cancer

Punnarai Siyapong, Siritron Samosorn and Mayuso Kuno*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok 10110, Thailand
*E-mail: mayuso@swu.ac.th

Abstract

Quinone reductase 2 (QR2) serves as an enzyme that catalyzes the reduction of quinones to hydroquinones involving in an estrogen synthetic pathway. Recent studies reported that QR2 may transform quinone into highly reactive toxins that are capable of causing more DNA damage and playing a crucial role in stimulating breast cancer. Inhibition of QR2 activities by its inhibitors, therefore, may lead to protection of cells from these toxins. This work focuses on the studies of molecular docking of QR2 inhibitor, XM5, was designed at enzyme binding site coded

3G5M.pdb from structural protein database. Berberine derivatives were designed to show growth inhibiting activity of breast cancer MCF–7. Docking simulation was performed using AutoDock 4.2 to improve the potential to existing QR2 inhibitors. The binding energy calculation using molecular docking showed that the structure of berberine derivatives having an aryloxy group at C–13, and two hydroxyl groups at C–9 and C–10 gave the best result. This finding was accomplished three structures of better potential inhibitors.

Keywords: Quinone reductase 2, Molecular docking, Berberine, Breast cancer

บทนำ

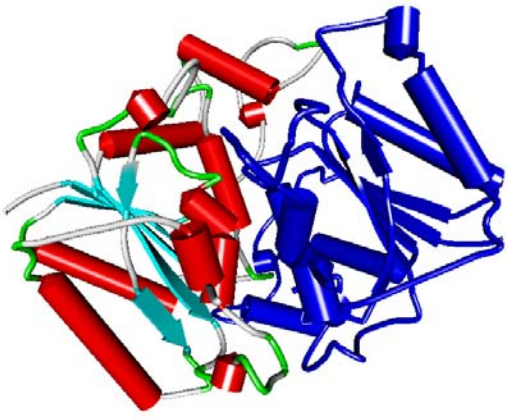
โรคมะเร็งเป็นโรคที่สามารถเกิดขึ้นได้กับทุกคน ในปี พ.ศ. 2554 พบว่า คนไทยเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับหนึ่ง และโรคที่ทำให้คนไทยเสียชีวิตมาเป็นอันดับแรก คือ มะเร็งเต้านม ซึ่งเกิดได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง แต่เพศหญิงมีโอกาสพบมะเร็งเต้านมได้มากกว่าเพศชาย เนื่องจากมะเร็งเต้านมเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนที่อยู่ในร่างกาย ปัจจุบันพบว่าการเกิดมะเร็งเต้านมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเพศหญิงมีโอกาสเป็นมะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้น (อัญชลี อุธา, 2554; Attasara and Buasom, 2011)

ในปัจจุบัน การศึกษาทางด้านอณูชีววิทยา ชีวโมเลกุล เทคโนโลยีชีวภาพ เคมี และด้านอื่น ๆ นิยมใช้เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์เข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากด้านฮาร์ดแวร์และซอฟต์แวร์ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและมีความก้าวหน้าอย่างมาก ทำให้เทคโนโลยีทางด้านคอมพิวเตอร์เข้ามามีบทบาทในทุกๆ ด้านไม่ว่าจะเป็นทางด้านเศรฐกิจ สังคม โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านวิทยาศาสตร์และการประยุกต์ใช้ สาขาเคมีได้นำเทคโนโลยีทางด้านคอมพิวเตอร์มาประยุกต์ใช้ในการศึกษา ค้นคว้าวิจัยอย่างหลากหลาย และเรียกสาขาดังกล่าวว่า “สาขาเคมีคอมพิวเตอร์” และในการศึกษาหรือการทดลองได้ดำเนินการโดยใช้คอมพิวเตอร์ในการคำนวณและออกแบบโมเลกุลก่อนทำการทดลองในห้องปฏิบัติการจริง จากนั้นนำผลที่ได้จากการศึกษาด้วยเคมีคอมพิวเตอร์ มาเป็นแนวทางนำไปสู่การทดลองในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังพบว่า เคมีคอมพิวเตอร์ยังสามารถประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมเพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในด้านการวิจัยและพัฒนาอีกด้วย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมทางด้านยา (ธีรเกียรติ์ เกิดเจริญ, 2539)

งานวิจัยทางด้านเคมีคอมพิวเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการค้นหาตัวยับยั้งใหม่ ๆ หรือการพัฒนาตัวยับยั้งเดิมให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นนั้น จำเป็นต้องพัฒนาด้านซอฟต์แวร์เพื่อใช้ในการค้นหาวิธีการในการศึกษาวิจัยให้ผลลัพธ์ที่ดีและมีประสิทธิภาพสูงสุด วิธีการหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาและเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน คือ การพัฒนาซอฟต์แวร์ที่ใช้การศึกษาวิจัยด้วยวิธีโมเลกุลลาร์ด๊อกกิ้ง ซึ่งเป็นการค้นหาโครงสร้างที่เป็นไปได้มากที่สุดในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์เป้าหมายที่กำลังศึกษา โดยในขั้นตอนการเข้าจับจะมีการคลื่อนย้ายตัวยับยั้งอย่างสุ่มไปยังบริเวณการจับของเอนไซม์เป้าหมายที่มีการกำหนดขอบเขตบริเวณการจับของเอนไซม์อย่างชัดเจนและมีขนาดใหญ่เพียงพอต่อการเกิดอัตรกิริยาระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ เพื่อให้ได้โครงสร้างที่ดีที่สุดและสอดคล้องกับค่าพลังงานอิสระในการจับกับเอนไซม์ ซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการศึกษาโมเลกุลลาร์ด๊อกกิ้งในปัจจุบันมีอยู่หลากหลาย ทั้งที่เป็นซอฟต์แวร์เชิงพาณิชย์และที่เป็นซอฟต์แวร์ฟรี และซอฟต์แวร์ฟรีที่ได้รับความนิยมอย่างมาก คือ AutoDock เนื่องจากสามารถทำงานบนระบบปฏิบัติการได้อย่างหลากหลาย เช่น MS Windows หรือ Linux นอกจากนั้นยังใช้งานได้ง่ายและมีโปรแกรมช่วยในการเตรียมไฟล์สำหรับการดำเนินการเพื่อทำโมเลกุลลาร์ด๊อกกิ้งอีกด้วย

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกของการเกิดโรคมะเร็งเต้านมมีด้วยกันหลายชนิด เช่น เอนไซม์แอโรมาเทส (aromatase) (Ghosh et al., 2012) ควิโนนรีดักเทส 2 (quinone reductase 2 (QR2) (Maiti et al., 2009) ดังนั้นในการรักษาหรือควบคุมไม่ให้โรคมะเร็งเกิดการแพร่กระจายจึงจำเป็นต้องยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง โดยเอนไซม์ที่น่าสนใจและเป็นเป้าหมายสำหรับงานวิจัยนี้ คือ เอนไซม์ QR2 เนื่องจากเป็นเอนไซม์เป้าหมายใหม่ที่นักวิจัยในปัจจุบันใช้ในการค้นหาตัวยับยั้งที่จะใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมหรือเพื่อใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม เอนไซม์ QR2 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) มีลักษณะโครงสร้างดังภาพที่ 1 เอนไซม์ชนิดนี้มีลักษณะเป็นฮอโมไดเมอร์ (homodimer) ภายในโครงสร้างมีเฟลวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (flavin adenine dinucleotide, FAD) เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ที่มีความสำคัญ

ต่อการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้พบว่า เอนไซม์ QR2 ยังเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในระยะ 2 (phase II) และเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการกำจัดพิษออกจากร่างกาย (detoxicification) มีรายงานว่า QR2 สามารถเปลี่ยนควิโนนซึ่งเป็นสารพิษที่มีความว่องไวสูงในการทำลายดีเอ็นเอ โดยพบเซลล์มะเร็งลุกลามมากขึ้นเมื่อเอนไซม์ QR2 มีปริมาณสูงขึ้น (Celli et al., 2006; Foster et al., 1999; Jamieson et al., 2006; Knox et al., 2000) ดังนั้นงานวิจัยนี้สนใจศึกษาลักษณะโครงสร้างและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ที่เป็นโครงสร้างที่ได้จากฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนที่มีรหัส 3G5M.pdb (RCSB PDB Protein Data Bank, 2013) ซึ่งในโครงสร้างของโปรตีนดังกล่าวมีตัวยับยั้งแคสิมิโรอิน (casimiroin, XM5) อยู่ในโพรงการจับของ QR2 (สาร XM5 เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากเมล็ดของ *Zapote blanco* หรือ *Casimiroa edulis* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ QR2) จากนั้นศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีน (berberine derivatives) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF–7 ว่าจะสามารถยับยั้งเอนไซม์ QR2 ได้หรือไม่ โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณทางโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง (molecular docking) ในขั้นตอนสุดท้ายออกแบบหรือพัฒนาโมเลกุลให้มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวยับยั้ง QR2 สูงกว่าสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีนเดิมที่ใช้ในการวิจัยนี้และคาดว่าจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการออกแบบตัวยับยั้งตัวใหม่หรือพัฒนาตัวยับยั้งที่มีอยู่เดิมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์และทดสอบในห้องปฏิบัติการทดลองจริงต่อไป

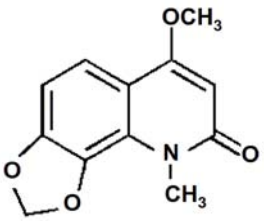


ภาพที่ 1 โครงสร้างเอนไซม์ QR2

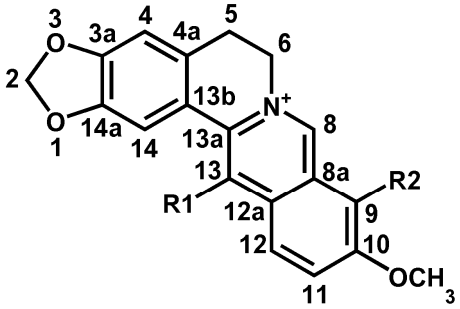
วิธีการศึกษา

การศึกษาโครงสร้างและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2 ศึกษาด้วยระเบียบวิธีโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง โดยใช้โปรแกรม AutoDock 4.2 ที่ทำงานบนระบบปฏิบัติการลีนุกซ์ (Linux) ส่วนในขั้นตอนการเตรียมไฟล์สำหรับการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งใช้โปรแกรม AutoDockTools 1.5.6 ที่ทำงานบนระบบปฏิบัติการวินโดว์ ซึ่งขั้นตอนการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งจำเป็นต้องมีโครงสร้างของเอนไซม์ โดยงานวิจัยนี้ใช้โครงสร้างที่ได้จากธนาคารฐานข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน (GenBank) ที่มีรหัสโครงสร้าง 3G5M.pdb และในโครงสร้างดังกล่าวมีตัวยับยั้ง XM5 ที่อยู่ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ QR2 และในงานวิจัยนี้ได้ทำการ Dock สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีน (ภาพที่ 2) การเตรียมโครงสร้างของตัวยับยั้งที่ใช้ในการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง ได้ดำเนินการคำนวณโดยใช้ระเบียบวิธี HF/3-21G ด้วยโปรแกรม Gaussian03 (Frisch et al., 2003) ที่ทำงานบนระบบปฏิบัติการลีนุกซ์ เพื่อหาโครงสร้างที่เหมาะสมและมีความเสถียรที่ระดับการคำนวนดังกล่าวมาใช้ในการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง โดยแบ่งขั้นตอนการศึกษาเป็นดังนี้

1. Redock ตัวยับยั้ง XM5 ไปยังเอนไซม์เป้าหมายเพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสม
2. Dock ตัวยับยั้งที่เป็นสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีน
3. Dock ตัวยับยั้งที่ผู้วิจัยได้พัฒนาสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีนเดิมให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น



XM5



R1 = alkoxy or aryloxy
R2 = hydroxy or methoxy

สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีน

ภาพที่ 2 โครงสร้างของสาร XM5 และสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีนที่ใช้ในการศึกษา

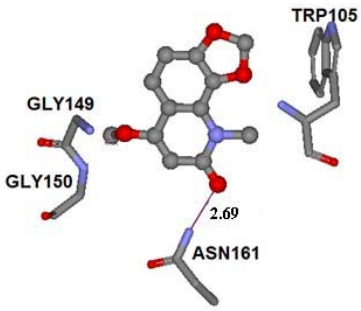
ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การรายงานผลและการอภิปรายผลการศึกษาโครงสร้างและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ QR2 ได้แบ่งออกเป็น 4 ส่วนดังนี้

1. พารามิเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับดำเนินการโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้ง

จากการทำ Redock ของตัวยับยั้ง XM5 โดยการกำหนดให้กรดอะมิโนที่สามารถ flexible ได้คือ กรดอะมิโน ASN161 ที่อยู่ในสาย A และสาย B บน grid ที่มีขนาด x=y=z มีค่าเท่ากับ 100 Å และมีศูนย์กลางของ grid ในโครงสร้างของเอนไซม์ QR2 อยู่ที่ x = 10.990, y = –8.142 และ z = –15.272 โดยใช้ grid point spacing เท่ากับ 0.375 Å ส่วนรูปแบบการ Docking เลือกแบบ Random เพื่อหาตำแหน่งในการเข้าจับของตัวยับยั้งในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ QR2 ได้ดีที่สุด โดยใช้จำนวนรอบในการค้นหารูปแบบการจับทั้งหมด 150 รอบ และใช้ Lamarckian GA ในการหาพลังงานที่เหมาะสมหรือพลังงานที่ดีที่สุดในแต่ละรอบของการ Docking ซึ่งค่าพลังงานที่ได้จากการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งคือค่าประมาณการของพลังงานอิสระในการเข้าจับ (estimated free energy of binding) จากการทำ Redock พบว่า พลังงานที่ได้มีค่าเท่ากับ –7.87 ถึง –8.01 kcal/mol และมีค่า RMSD (root mean square deviation) เท่ากับ 1.075 ถึง 2.396 Å เนื่องจากโครงสร้างของ 3G5M.pdb มีตัวยับยั้ง XM5 อยู่ในบริเวณการจับสองบริเวณ ดังนั้นเมื่อ Redock ตัวยับยั้งที่อยู่ทั้งสองบริเวณหลายครั้ง ทำให้ได้ค่าพลังงานและค่า RMSD ที่อยู่ในช่วงดังกล่าว จากข้อมูลที่ได้ทำให้สามารถกำหนดพารามิเตอร์ที่นำไปใช้ในการทำโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งของโมเลกุลอื่นต่อไป

จากการวิเคราะห์โครงสร้างอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวยับยั้ง XM5 ในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ QR2 ในรัศมี 4 Å พบว่า มีกรดอะมิโน Trp105, Gly149, Gly150 และ Asn161 (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นรูปที่ไม่ได้แสดงอะตอมของไฮโดรเจน จากรูปดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญที่ทำให้ XM5 สามารถยับยั้งเอนไซม์ QR2 ได้ โดยที่ Asn161 เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง –NH ของ Ans161 กับหมู่คาร์บอนิลของ XM5 ด้วยระยะห่างระหว่าง N ของ Asn161 กับหมู่คาร์บอนิลของ XM5 เท่ากับ 2.69 Å ซึ่งเป็นพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงมาก



ภาพที่ 3 โครงสร้างการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง XM5 และกรดอะมิโนในรัศมี 4 Å

2. การ Dock ตัวยับยั้งที่เป็นสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีน

โครงสร้างตัวยับยั้งที่เป็นสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีนที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดแสดงดังตาราง 1 ค่า IC50 และค่าพลังงานที่ได้จากการ Dock พบว่า โครงสร้างสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีน 1 ถึงสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอรีน 18 สามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ตามลักษณะของหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 13 กลุ่มแรกคือกลุ่มที่มีหมู่แอลคอกซี (alkoxy) ประกอบด้วยสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **1** ถึง **13** ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่มีหมู่แอริออกซี (aryloxy) ประกอบด้วยสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **14** ถึง **18** สำหรับสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **19** ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 9 มีการแทนที่หมู่ $–OCH_3$ ด้วยหมู่ –OH

จากการพิจารณาหมู่แอลคอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอน 13 (R1) พบว่า ค่า IC50 จะมีแนวโน้มลดลงและสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน 12 ให้ค่า IC50 น้อยที่สุดคือ 0.28 µg/mL นอกจากนี้พบว่า จำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 7 คาร์บอน ถึง 16 คาร์บอน ให้ค่า IC50 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อยู่ในช่วง 0.28 ถึง 2.04 µg/mL เมื่อพิจารณาผลที่ได้จากโมเลกุลลาร์ด็อกกิ้งพบว่าค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับอยู่ในช่วง –4.59 kcal/mol ถึง –9.82 kcal/mol โดยพลังงานอิสระในการเข้าจับมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากตามจำนวนคาร์บอนของหมู่แอลคอกซีที่เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อจำนวนคาร์บอนอะตอมของหมู่แอลคอกซี มีมากกว่า 8 คาร์บอน พบว่า พลังงานอิสระในการเข้าจับลดลงอย่างชัดเจน จึงสามารถสรุปได้ว่า จำนวนคาร์บอนของหมู่แอลคอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอน 13 ต้องมีจำนวนคาร์บอนไม่เกิน 8 อะตอม จึงทำให้พลังงานอิสระในการเข้าจับมีค่าที่เหมาะสม นอกจากนี้จำนวนคาร์บอนในหมู่แอลคอกซีมีค่าเท่ากับ 7 อะตอม

คือ สารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **8** สามารถให้พลังงานอิสระในการเข้าจับสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ –9.82 kcal/mol

เมื่อพิจารณาการแทนที่ด้วยหมู่แอริลออกซีที่ตำแหน่งคาร์บอน 13 ของสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน พบว่า ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับส่วนใหญ่มีค่ามากกว่าการแทนที่ด้วยหมู่แอลคอกซี ยกเว้นสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **16** และ **17** ซึ่งมีหมู่ดึงอิเล็กตรอน (electron withdrawing group) ที่ตำแหน่งพารา (*para*) บนวงเบนซีน มีค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับเท่ากับ –8.34 และ –7.92 kcal/mol ตามลำดับ ซึ่งมีค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับน้อยกว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **8** และเป็นสารอนุพันธ์ดีที่สุดในกลุ่มแอลคอกซี ส่วนสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนที่เหลือให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับไม่แตกต่างมาก คือ อยู่ในช่วง –10.26 kcal/mol ถึง –10.30 kcal/mol จึงสามารถสรุปได้ว่า หมู่แอริลออกซีที่ไม่มีหมู่ดึงอิเล็กตรอนแทนที่บนวงอะโรมาติกให้พลังงานอิสระในการเข้าจับได้ดีกว่าหมู่แอลคอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอน 13 ของสารอนุพันธ์เบอร์เบอรี

ผลที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ คือ IC50 เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการโมเลกุลลาร์ด๊อกกิ้ง พบว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนส่วนใหญ่ให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มสอดคล้องกัน ยกเว้นสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน 10–13 เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาของทั้งสองวิธีการศึกษาเป็นเอนไซม์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยว่า สารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนสามารถเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ในขั้นตอนใดของกลไกการยับยั้งมะเร็งเต้านม แต่สารมารถระบุได้ว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนสามารถลดการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนสามารถยับยั้งมะเร็งเต้านมในขั้นตอนของการใช้เอนไซม์ QR2 ได้

สำหรับสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **18** เป็นการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 9 ของเบอร์เบอรีน (สาร **1**) จากเดิมเป็นหมู่ $–OCH_3$ ให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับ –9.40 kcal/mol เปลี่ยนเป็นหมู่ –OH พบว่า ให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับเพิ่มขึ้นเป็น –10.01 kcal/mol ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

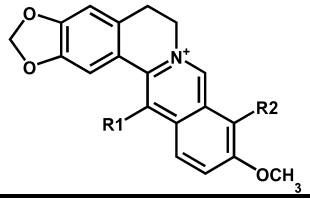
3. การ Dock ตัวยับยั้งอนุพันธ์เบอร์เบอรีนใหม่

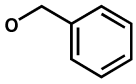
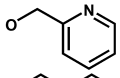
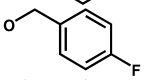
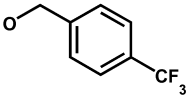
โครงสร้างและพลังงานอิสระในการเข้าจับที่ผู้วิจัยได้ออกแบบและพัฒนาสารอนุพันธ์เบอร์รีนเดิมให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นแสดงดังตาราง 2 โดยใช้ข้อมูลจากตาราง 1 พบว่าสาร **14** ซึ่งมีหมู่เบนซิลอีเทอร์ (–OBn) แทนที่ –H ของสาร **1** ที่ตำแหน่ง 13 ให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับสูงกว่าสาร **1** และสูงกว่าสารอนุพันธ์อื่น ๆ ในกลุ่มนี้ นอกจากนี้การดึงหมู่เมทิลออก (demethylation) ของสาร 1 ที่ตำแหน่ง 9 ให้สาร **18** ซึ่งให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับสูงกว่าสาร **1** งานวิจัยนี้ได้ออกแบบโมเลกุลใหม่โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ $–OCH_3$ ที่ตำแหน่ง 9 และ 10 ของสาร **1** ให้เป็นหมู่ –OH (สาร **19**) และแทนที่ –H ที่ตำแหน่ง 13 ของสาร **19** ด้วยหมู่ –OBn ให้สาร **20** พบว่าสาร **19** และ **20** ให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ได้ปรับเปลี่ยนหมู่ –OH ที่ตำแหน่ง 9 ของสาร **20** ให้เป็น $–OCH_3$ (สาร **21**) พบว่า ให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับต่ำกว่าสาร **20** เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสาร **20** ซึ่งให้ค่าพลังงานอิสระในการเข้าจับดีที่สุดในการเกิดอันตรกิริยาในบริเวณโพรงการจับของเอนไซม์ QR2 ในรัศมี 4 Å พบว่าสาร **20** เกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน Gly68, Cys121 และเกิดอันตรกิริยากับ Gly149 มากที่สุด (ภาพที่ 4)

สรุปผลการศึกษา

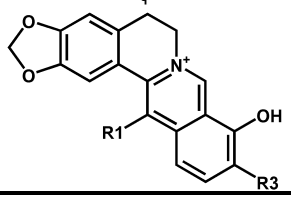
จากการศึกษาโมเลกุลลาร์ดอกกิ้งของตัวยับยั้ง XM5 ในการเข้าจับในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 เพื่อหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการ Dock สารอนุพันธ์เบอร์รีนและการออกแบบสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิม โดยพารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาสามารถให้ค่า RMSD ของ Redock ของ XM5 น้อยที่สุด คือ 1.075 Å แสดงให้เห็นว่า พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้เหมาะสม เมื่อพิจารณาผลของการศึกษาโมเลกุลลาร์ดอกกิ้งของสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์รีน พบว่า ที่ตำแหน่ง 13 มีหมู่แอริลออกซีที่ให้พลังงานอิสระในการเข้าจับได้ดีกว่าหมู่แอลคอกซีและหมู่แอลคอกซีต้องมีจำนวนคาร์บอนอะตอมไม่เกิน 8 อะตอมจึงจะให้พลังงานอิสระในการเข้าจับได้ดี ส่วนที่ตำแหน่ง 9 มีการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก $–OCH_3$ เป็นหมู่ –OH ให้ค่าพลังงานในการเข้าจับดีขึ้น จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยออกแบบโครงสร้างของสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีนได้สารใหม่ 3 โครงสร้าง (สาร **19**–**21**) ที่มีประสิทธิภาพในการเข้าจับในบริเวณการจับของเอนไซม์ QR2 ได้ดีกว่าสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน **2**–**18** จากโครงสร้างใหม่ที่ออกแบบได้สามารถนำไปสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

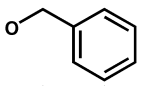
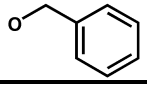
ตาราง 1 ค่า IC_{50} (µg/mL) (Samosorn et al., 2011; Samosorn, 2011) และพลังงานอิสระในการเข้าจับ (BE, kcal/mol) ระหว่างอนุพันธ์เบอร์เบอรีนกับเอนไซม์ QR2

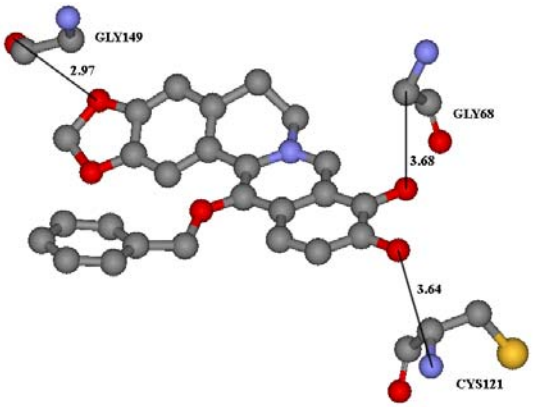


Ligand	R_1	R_2	IC_{50} (µg/mL)	BE (kcal/mol)
1	H	OCH_3	37.90	–9.40
2	OCH_3	OCH_3	46.16	–8.09
3	OC_2H_5	OCH_3	> 50.00	–8.77
4	OC_3H_7	OCH_3	40.26	–8.86
5	OC_4H_9	OCH_3	26.26	–9.15
6	OC_5H_{11}	OCH_3	7.51	–9.61
7	OC_6H_{13}	OCH_3	9.06	–9.33
8	OC_7H_{15}	OCH_3	2.04	–9.82
9	OC_8H_{17}	OCH_3	0.75	–9.01
10	OC_9H_{19}	OCH_3	1.18	–5.07
11	$OC_{10}H_{21}$	OCH_3	0.28	–5.23
12	$OC_{12}H_{23}$	OCH_3	1.70	–4.59
13	$OC_{16}H_{33}$	OCH_3	0.96	–5.72
14		OCH_3	2.03	–10.30
15		OCH_3	> 50.00	–10.26
16		OCH_3	3.71	–8.34
17		OCH_3	7.37	–7.92
18	H	OH	0.29	–10.01

ตาราง 2 พลังงานอิสระในการเข้าจับ (BE, kcal/mol) ระหว่างอนุพันธ์เบอร์เบอรีนใหม่กับเอนไซม์ QR2



Ligand	R_1	R_3	IC50 (µg/mL)	BE (kcal/mol)
19	H	OH	-	–10.71
20		OH	-	–12.33
21		OCH_3	-	–11.54



ภาพที่ 4 โครงสร้างการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสาร **21** และกรดอะมิโนในรัศมี 4 Å

กิตติกรรมประกาศ

งานได้รับการสนับสนุนจากทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (027/2555)

เอกสารอ้างอิง

ธีรเกียรติ์ เกิดเจริญ. (2539). เคมีคอมพิวเตอร์: คอมพิวเตอร์ช่วยออกแบบโมเลกุลกับการพัฒนานาโนเทคโนโลยี **วารสารเทคโนโลยีวัสดุ** 39(4): 17–22.

อัญชุลี อุธา. (2554). **กินต้านมะเร็งเต้านม**. กรุงเทพฯ: บี-เวลล์ สปีเชียล.

Attasara, P., and Buasom, R. (eds). (2011). Hospital-based cancer registry, National Cancer Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health. (in Thai)

Celli, C.M., Tran, N., Knox, R., and Jaiswal, A. K.. (2006). NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) catalyzes metabolic activation of quinones and anti-tumor drugs. **Biochemical Pharmacology** 72: 366–376.

Foster, C. E., Bianchet, M. A., Talalay, P., Zhao, Q., and Amzel, L. M. (1999). Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavo-protein. **Biochemistry** 38: 9881–9886.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., et al. (2003). **Gaussian 03, Revision B05**. Pittsburgh, PA: Gaussian.

Ghosh, D., Lo, J., Morton, D., Valette, D., Xi, J., Griswold, J., et al. (2012). Novel aromatase inhibitors by structure-guided design. **Journal of Medicinal Chemistry** 55: 8464–8476.

Jamieson, D., Tung, A. T., Knox, R. J., and Boddy, A. V. (2006). Reduction of mitomycin C is catalysed by human recombinant NRH:quinone oxidoreductase 2 using reduced nicotinamide adenine dinucleotide as an electron donating co-factor. **British Journal of Cancer** 95: 1229–1233.

Knox, R. J., Jenkins, T. C., Hobbs, S. M., Chen, S., Melton, R. G., Burke P. J. (2000). Bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: A novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. **Cancer Research** 60: 4179–4186.

Maiti, A., Reddy, P. V. N., Sturdy, M., Marler, L., Pegan, S. D., Mesecar, A. D., et al. (2009). Synthesis of casimiroin and optimization of its quinone reductase 2 and aromatase inhibitory activities. **Journal of Medicinal Chemistry** 52: 1873–1884.

RCSB PDB Protein Data Bank. (2013). **3G5M**. Retrieved from http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3G5M, March 6, 2013.

Samosorn S. (2011). **Thai Petty Patent Application Number 1103000985**, 16 September 2011.

Samosorn, S., Tanwirat, B., and Suksamrarn, A. (2011). Thai **Patent Application Number 1101002293**, 27 September 2011.