

การสร้างแบบจำลองโมเลกุลของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทูเมอร์นิโครซิสแพคเตอร์แอลฟาจากบัวบก

สถาปัตย์ ราชา^{1*} สรัญญา ชวนพงษ์พานิช¹ เอกพนธ์ หิรัตณพันธ์² และ กรรณิการ์ ราชา³

¹กลุ่มวิชาเคมีเภสัชและยาจากธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ

²กลุ่มวิชาบริหารเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ

³กลุ่มวิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ

*satapatto@gmail.com

บทคัดย่อ

สะกัดเงินเป็นโรคทางระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแบบเรื้อรังชนิดหนึ่งที่ผิวหนังบริเวณชั้นหนังกำพร้าเกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคนี้อาจไม่ทราบแน่ชัด เมื่อเร็วๆ นี้ไปไซโตไคน์ทูเมอร์นิโครซิสแพคเตอร์แอลฟาเป็นเป้าหมายที่ได้รับความสนใจสำหรับการรักษาโรคสะเก็ดเงิน ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้สารสำคัญในบัวบก ได้แก่ เอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside), กรดเอเชียติค (Asiatic acid), มาดีแคสโซไซด์ (Madecassoside) และกรดมาดีแคสซิก (Madecassic acid) เพื่อวิเคราะห์บริเวณที่จับกับทูเมอร์นิโครซิสแพคเตอร์แอลฟาโดยอาศัยโปรแกรม Autodock Vina ในการจำลองการจับเชิงโมเลกุลเทียบกับสารมาตรฐาน SPD304 นอกจากนี้ได้วิเคราะห์รูปแบบการเข้าจับในระดับอะตอมด้วยโปรแกรม Discovery Studio Visualizer 2017 ผลการศึกษาพบว่าสารมาดีแคสโซไซด์ (Madecassoside) จากบัวบกมีศักยภาพเป็นสารต้นแบบสำหรับรักษาโรคสะเก็ดเงิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์การเข้าจับระหว่างโมเลกุลได้อธิบายถึงกรดแอมิโนที่มีความสำคัญในการเข้าจับกับทูเมอร์นิโครซิสแพคเตอร์แอลฟา การเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และรูปแบบการเข้าจับของลิแกนด์กับโปรตีน นำไปสู่องค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์สำหรับการค้นพบและพัฒนาต่อยอดต่อไป

คำสำคัญ: สะกัดเงิน ทูเมอร์นิโครซิสแพคเตอร์แอลฟา บัวบก การจำลองการจับเชิงโมเลกุล

Molecular Modeling of Anti-tumor Necrosis Factor Alpha from *Centella asiatica*

Satapat Racha^{1,*}, Sarunya Chuanphongpanich¹, Ekkapon Hirattanapun², and Kannika Racha³

1 Department of Pharmaceutical Chemistry and Natural Medicine, Faculty of Pharmacy,
Payap University

2 Department of Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Payap University

3 Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmacy, Payap University

*Corresponding Author; email: satapatto@gmail.com

Abstract

Psoriasis is a chronic immune-mediated inflammatory disease characterize by hyperproliferative epidermal cells. The exact cause of the disease is still unknown. Recently, the pro-cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) has been an attractive target for the treatment of psoriasis. In this study, major compounds include asiaticoside, asiatic acid, madecassoside and madecassic acid form Centella asiatica were selected and virtually docked with TNF-alpha binding site through a molecular docking approach using Autodock Vina program. SPD304 was also used as a positive control for the docking study. Moreover, the binding mode at the atomistic level was analyzed by using Discovery Studio Visualizer 2017 program. The results showed that madecassoside from Centella asiatica has the potential to be lead compounds for psoriasis treatment. Especially, binding analysis explained in detail information showing the key amino acid residues involved in TNF-alpha binding. In conclusion, the understanding of the relationship between structures and pharmacological effects and the ligand-protein binding pattern leads to important information for further drug discovery and development.

Keywords: psoriasis, tumor necrosis factor alpha, *Centella asiatica*, molecular docking simulation

1. บทนำ

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) จัดเป็นโรคทางระบบภูมิคุ้มกันโรคที่ก่อให้เกิดอาการเสบของผิวหนังแบบเรื้อรังชนิดหนึ่ง มีลักษณะอาการที่สำคัญของโรคคือ เป็นปื้นหนา มีผื่นแดง คัน ร่วมกับมีสะเก็ดสีขาวคล้ายเงิน เมื่อสะเก็ดหลุดออกจะพบจุดเลือดออกอยู่บนชั้นผิวหนังของรอยโรค การเกิดโรคสะเก็ดเงินมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งจากพันธุกรรมของผู้ป่วย และสิ่งกระตุ้นจากภายนอกร่างกาย ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหลังสารก่ออักเสบเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง ทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา (tumor necrosis factor alpha หรือ TNF-alpha) เป็นโปรไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง มีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน โดยพบว่าผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีระดับ TNF-alpha สูงทั้งในกระแสเลือด และบริเวณรอยโรคที่ผิวหนัง ดังนั้นการรักษาโรคสะเก็ดเงินจึงได้พิจารณาใช้ยาที่มีคุณสมบัติยับยั้ง TNF-alpha (TNF-alpha inhibitors) เป็นแนวทางหนึ่งในการรักษา (Bissonnette et al., 2017)

นอกจากการใช้ยาในการรักษาโรคสะเก็ดเงินแล้ว การใช้สมุนไพรถือเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับรักษาโรคสะเก็ดเงิน มีการรายงานว่ามีประสิทธิผลของสมุนไพรโรคสะเก็ดเงินในประเทศแถบยุโรป และสหรัฐอเมริกา ได้ใช้สมุนไพรในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน ทั้งรูปแบบที่ใช้เป็นการรักษาเดี่ยว และรูปแบบที่ใช้ร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบัน *Centella asiatica* หรือบัวบก เป็นสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้รักษาโรคหลายชนิดในประเทศไทย โดยพบว่าบัวบกมีสรรพคุณต้านการอักเสบ ลดปวด ยับยั้งเชื้อรา

ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้านเซลล์มะเร็ง รวมถึงรักษาโรคและอาการผิดปกติทางผิวหนังต่างๆ เช่น โรคเรื้อน สมานแผล แก้ฟกช้ำ และโรคสะเก็ดเงิน เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงสารประกอบทางเคมีในบัวบกพบว่า ประกอบด้วยสารหลักคือ asiaticoside, asiatic acid, madecassoside และ madecassic acid (Wu et al., 2012) อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า สารประกอบใดในบัวบกที่มีฤทธิ์รักษาโรคสะเก็ดเงิน ผู้วิจัยจึงประสงค์ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารประกอบหลักในบัวบก โดยมุ่งเน้นศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านสะเก็ดเงินเชื่อมโยงกับการยับยั้ง TNF-alpha

การจำลองการจับเชิงโมเลกุล (Molecular docking simulation) เป็นกระบวนการทางคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการค้นหาสารยับยั้งต้นแบบกับโปรตีนเป้าหมายที่สนใจ วิธีการนี้สามารถช่วยทำนายฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบสารในห้องปฏิบัติการให้น้อยลง โดยอาศัยการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างสารยับยั้งที่จับอยู่กับโครงสร้างโปรตีนที่สนใจ และใช้ค่าพลังงานที่ได้มาวิเคราะห์ (Trott & Olson, 2010) หากสารใดมีพลังงานต่ำที่สุดดีกว่าสารยับยั้งจากโปรตีนต้นแบบ ก็จะเป็นโมเลกุลที่สนใจนำมาทดสอบต่อในห้องปฏิบัติการต่อไปได้ ผลของการศึกษานี้จะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่ เพื่อให้เข้าใจกลไกในระดับโมเลกุล และนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรไทย ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินต่อไปได้

2. วัตถุประสงค์

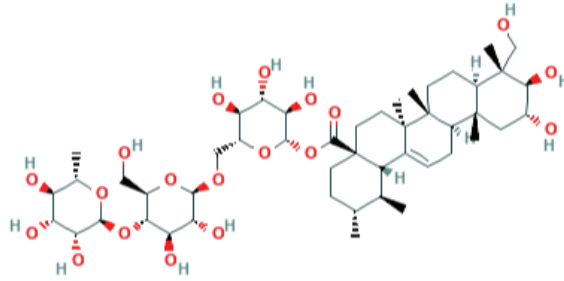
- 2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง TNF-alpha ของสารประกอบหลักในบัวบก
- 2.2 เพื่อศึกษาการเข้าจับระหว่างโมเลกุลของสารประกอบหลักในบัวบกกับ TNF-alpha

3. วิธีดำเนินการวิจัย

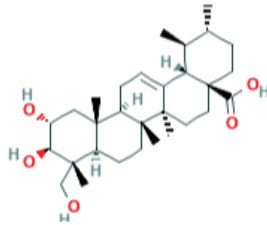
3.1 การเตรียมโครงสร้างโมเลกุลของลิแกนด์และโปรตีนเป้าหมาย

การเตรียมลิแกนด์ใช้ข้อมูลโครงสร้างสามมิติจากฐานข้อมูล Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยดาวน์โหลดโครงสร้างลิแกนด์จากหมายเลขรหัส (Pubchem CID) ดังต่อไปนี้ asiaticoside (CID108062), asiatic acid (CID119034), madecassoside (CID45356919), madecassic acid (CID73412), และตัวยับยั้ง TNF-alpha ต้นแบบ SPD304 (CID5327044) ดังภาพที่ 1 จากนั้นทำการคำนวณปรากฏการณ์เชิงควอนตัม (quantum computing) เพื่อให้ได้โครงสร้างสามมิติของสารที่เหมาะสม (optimization) ด้วยระเบียบวิธี Density Function Theory (DFT) ที่ระดับความถูกต้อง B3LYP/6-31G(d,p) โดยโปรแกรม Gaussian 09 (Lakshmi, Balachandran, Arul, Ronaldo, & Hubert, 2019) การเตรียมโปรตีนเป้าหมาย TNF-alpha จะดาวน์โหลดโครงสร้างโปรตีน 3 มิติ TNF-alpha จากฐานข้อมูลโปรตีนโครงสร้าง (Protein Data Bank, PDB) รหัส 2AZ5 จากนั้นกำจัดโมเลกุลน้ำ และโมเลกุลอื่นๆ ให้คงเหลือเพียงโครงสร้างโปรตีน TNF-alpha เพียงอย่างเดียว ด้วยโปรแกรม UCSF Chimera 1.14 (Pettersen et al., 2004)

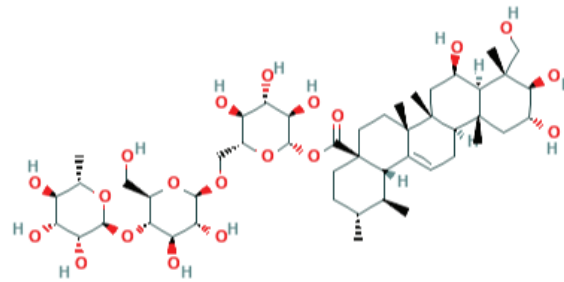
a)



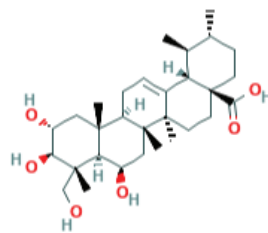
b)



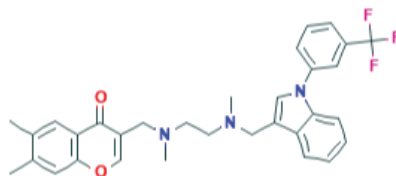
c)



d)



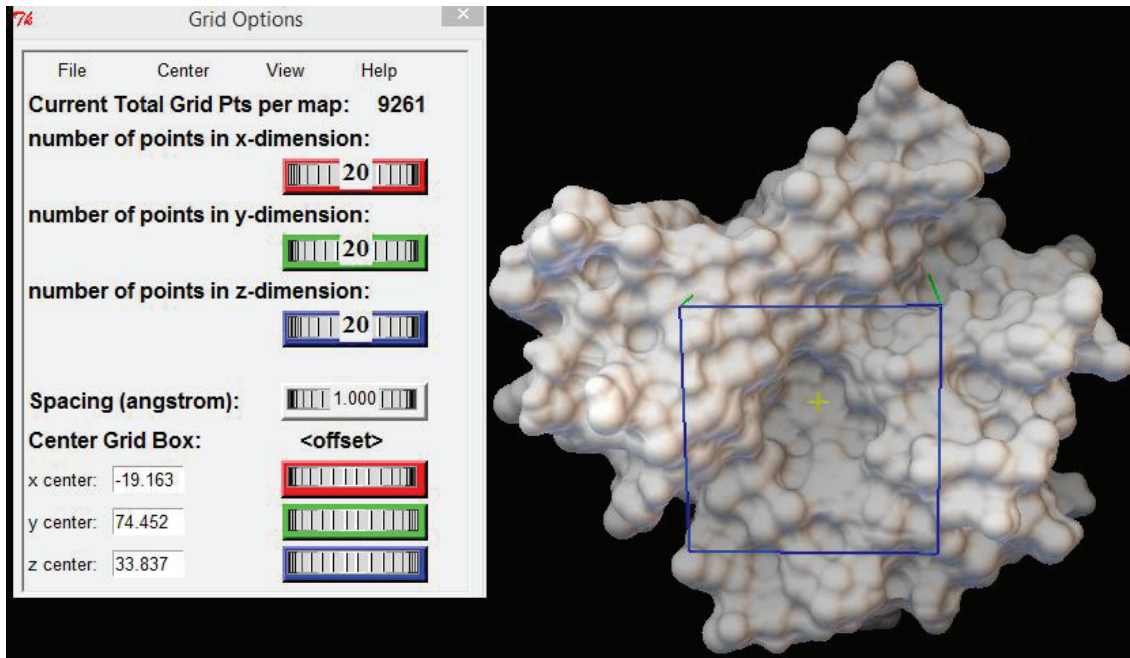
e)



ภาพที่ 1 โครงสร้าง 2 มิติของสาร a) asiaticoside, b) asiatic acid, c) madecassoside, d) madecassic acid และ e) SPD304 (positive control)

3.2 การจำลองการจับเชิงโมเลกุล

จำลองการจับเชิงโมเลกุลแบบจำกัดการหมุนด้วยโปรแกรม Autodock Vina โดยกำหนดขอบเขตบริเวณของเป้าหมายที่ทำการศึกษาในตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐานที่จับกับ TNF-alpha จากโปรตีนโครงสร้าง รหัส 2AZ5 ด้วยโปรแกรม Autodock tools ดังภาพที่ 2 ผลลัพธ์ที่ได้จะแสดงเป็นค่าพลังงานการเข้าจับที่เหมาะสมของแต่ละโมเลกุล (binding affinity; kcal/mol)



ภาพที่ 2 ตำแหน่งเป้าหมายบริเวณที่ออกฤทธิ์ของ TNF-alpha

3.3 การวิเคราะห์รูปแบบการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับโมเลกุลเป้าหมาย

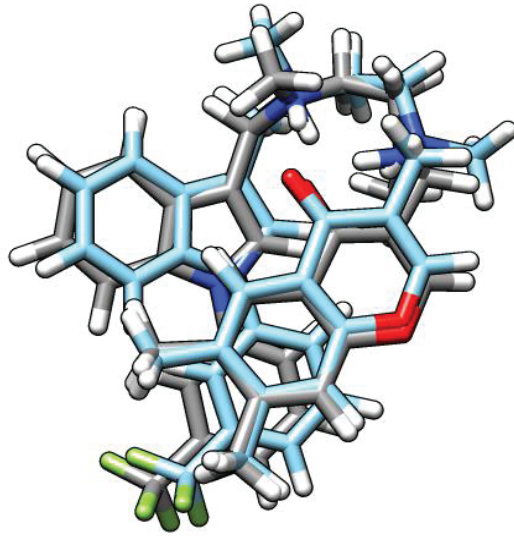
ใช้โปรแกรม Discovery Studio Visualizer 2017 วิเคราะห์รูปแบบอันตรกิริยาการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับกรดแอมิโนของโมเลกุลเป้าหมาย (Wang et al., 2015)

4. ผลการวิจัยและอภิปราย

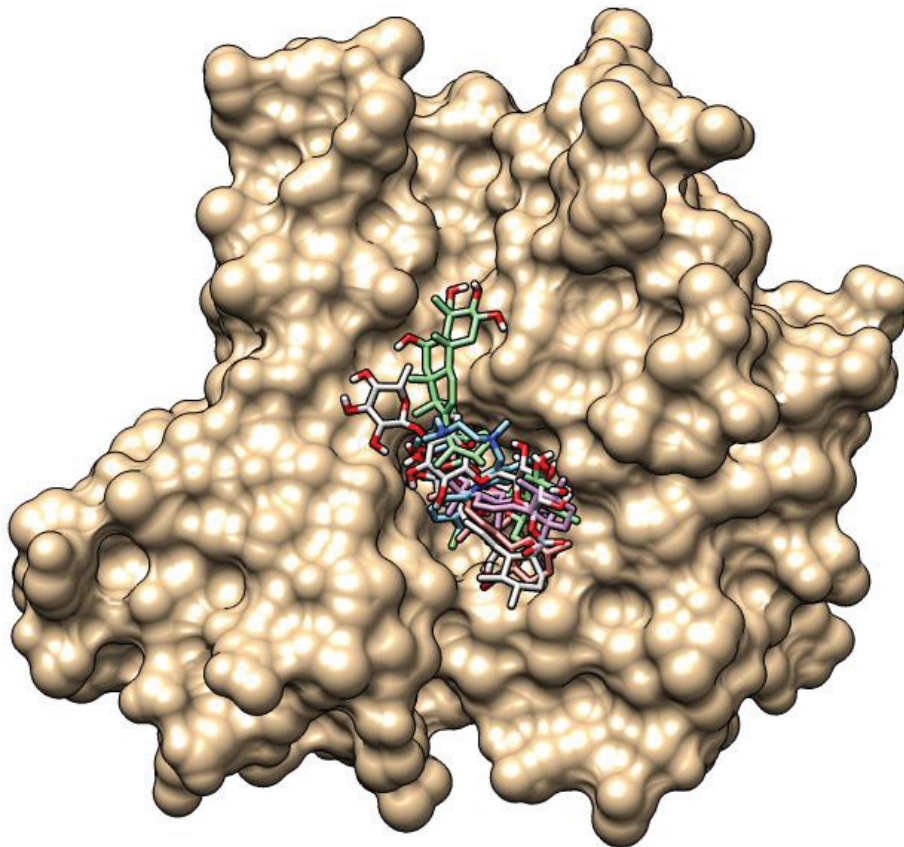
4.1 การจำลองการจับเชิงโมเลกุล

ในการตรวจสอบความถูกต้องของโปรแกรมที่ใช้ในการจำลองการจับเชิงโมเลกุลอาศัยโครงสร้างของลิแกนด์ (SPD304) ที่ได้จากโปรตีน TNF-alpha รหัส 2AZ5 เปรียบเทียบกับ SPD304 (CID5327044) ที่ได้จากฐานข้อมูล pubchem ดังภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าโครงสร้างโมเลกุล 3 มิติ ของลิแกนด์มีขนาด และการจัดเรียงตัวอยู่ในระนาบที่ซ้อนทับกัน บ่งบอกว่าโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ

การศึกษากการเข้าจับกันระหว่างสารที่ใช้ศึกษาทั้ง 5 ชนิด กับ TNF-alpha ด้วยโปรแกรม Autodock Vina พบว่าค่า binding affinity ของสารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ madecassoside, SPD304, madecassic acid, asiatic acid และ asiaticoside และมีค่าเท่ากับ -8.7, -8.6, -8.5, -8.4 และ -7.4, kcal/mol ตามลำดับ จากผลการศึกษา มีเพียง madecassoside เท่านั้นที่มีค่า binding affinity ต่ำกว่า สาร SPD304 และมีการจัดเรียงตัวอยู่ในตำแหน่งที่ออกฤทธิ์เดียวกัน ดังภาพที่ 4 บ่งบอกว่า madecassoside มีศักยภาพในการเข้าจับ และยับยั้งโมเลกุล TNF-alpha ได้ดีกว่า SPD304 ที่เป็นสารมาตรฐานต้นแบบในการยับยั้งการทำงานของ TNF-alpha



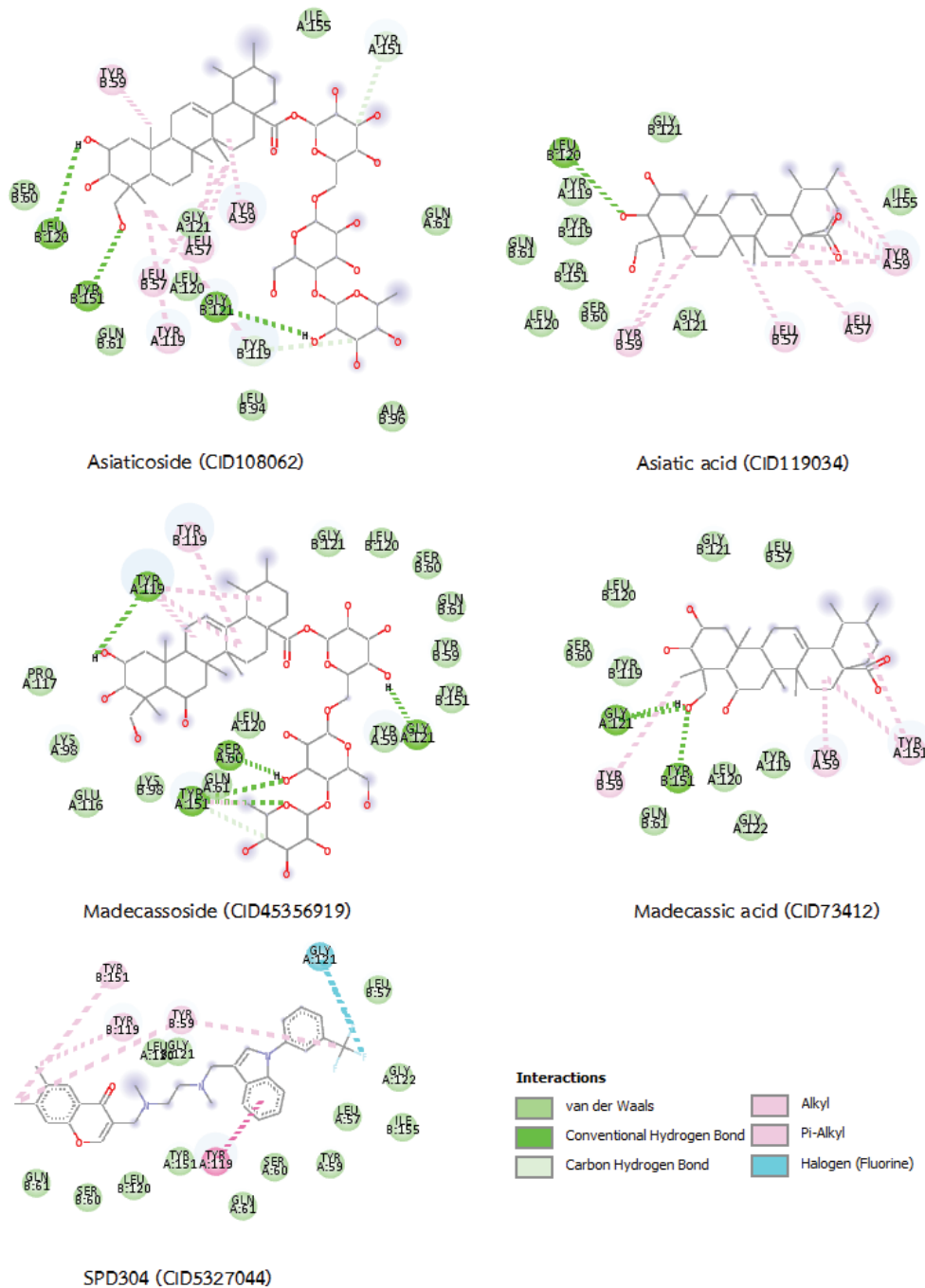
ภาพที่ 3 การจัดเรียงตัวโครงสร้าง 3 มิติ ของสารมาตรฐาน SPD304 (สีเทา) จากโครงสร้างของ PDB และ โครงสร้างจากการจำลองการจับเชิงโมเลกุล (สีฟ้า)



ภาพที่ 4 การการจัดเรียงตัวในบริเวณตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ของสาร asiaticoside (สีเทา), asiatic acid (สีส้ม), madecassoside (สีเขียว), madecassic acid (สีม่วง) และ SPD304 (สีฟ้า)

4.2 การวิเคราะห์รูปแบบการเข้าจับระหว่างลิแกนด์กับโมเลกุลเป้าหมาย

ข้อมูลการเข้าจับกันระหว่างลิแกนด์กับโมเลกุลเป้าหมายนั้นนับว่ามีความสำคัญอย่างมากในการศึกษาและพัฒนายา โดยทั่วไปแล้วจะเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์แบบไฮโดรโฟบิกและพันธะไฮโดรเจน จากการศึกษาที่ส่วนนี้ส่วนใหญ่เกิดปฏิสัมพันธ์การเข้าจับแบบไฮโดรโฟบิกและพันธะไฮโดรเจน (ภาพที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารมาตรฐาน SPD304 และ madecassoside ที่มีความสามารถในการเข้าจับดีที่สุด พบว่าสารมาตรฐาน SPD304 สามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่าง TNF-alpha ที่กรดแอมิโน Leu57, Tyr59, Ser60, Gln61, Leu120, Gly121, Gly122, Tyr151 และ Tyr191 ของ chain A และเกิดอันตรกิริยากับกรดแอมิโน Leu57, Tyr59, Ser60, Gln61, Tyr119, Leu120, Gly121, Tyr151 และ Ile155 ของ chain B ในส่วน madecassoside มีตำแหน่งการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง TNF-alpha ที่กรดแอมิโนมีความแตกต่างจากสารมาตรฐาน SPD304 เพียงเล็กน้อยคือที่บริเวณ chain A ไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดแอมิโน Leu57 และ Gly122 แต่มีการเกิดอันตรกิริยากับกรดแอมิโน Lys98, Glu116 และ Pro117 ในขณะที่บริเวณ chain B ไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดแอมิโน Leu57 และ Ile155 แต่เกิดอันตรกิริยากับ Lys98 อย่างไรก็ตาม รูปแบบกรดแอมิโนของตำแหน่งที่แตกต่างกันนี้ส่วนใหญ่อาศัยแรงแวนเดอร์วาลส์ในการเข้าจับจึงไม่น่ามีผลต่อการเข้าจับมากนัก เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นพบว่าสารมาตรฐาน SPD304 จะอาศัยปฏิสัมพันธ์ส่วนใหญ่แบบไฮโดรโฟบิกในการเข้าจับกับ TNF-alpha มีเพียง Gly121 ที่บริเวณ chain A เท่านั้นที่อาศัยพันธะแอสโลเจนในการเข้าจับกับ TNF-alpha ในขณะที่ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นของสาร madecassoside พบว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนที่บริเวณ chain A ระหว่างกรดแอมิโน Ser60, Tyr119, Gly121 และ Tyr151 นอกจากนี้ที่ Tyr151 ยังสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์ได้ จึงทำให้การจับระหว่างโมเลกุลของสาร madecassoside และ TNF-alpha มีความเสถียรและมีค่าพลังงานการเข้าจับที่ดีกว่าสารอื่นๆ



ภาพที่ 5 อันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์กับโมเลกุลเป้าหมาย

5. บทสรุป

การจำลองการจับเชิงโมเลกุลเป็นวิธีการค้นพบและพัฒนา ยา ที่มีความรวดเร็ว และสะดวกสำหรับการทำนายฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในการศึกษา นี้ พบว่า สาร madecassoside ซึ่งเป็นสารประกอบหลักชนิดหนึ่งในบัวบก มีความสามารถในการเข้าจับกับ TNF-alpha ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสาร SPD304 ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้ง TNF-alpha ดังนั้น สาร madecassoside จึงเป็นสารในบัวบกที่มีศักยภาพในการลดการอักเสบ รักษาโรคสะเก็ดเงินผ่านกลไกการยับยั้ง TNF-alpha

เอกสารอ้างอิง

- Bissonnette, R., Harel, F., Krueger, J. G., Guertin, M.-C., Chabot-Blanchet, M., Gonzalez, J., & Tardif, J.-C. (2017). TNF-alpha Antagonist and Vascular Inflammation in Patients with Psoriasis Vulgaris: A Randomized Placebo-Controlled Study. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(8), 1638-1645.
- Lakshmi, C. S. N., Balachandran, S., Arul, D. D., Ronaldo, A. A., & Hubert, J. I. (2019). DFT analysis on spectral and NLO properties of (2E)-3-[4-(dimethylamino) phenyl]-1-(naphthalen-2-yl) prop-2-en-1-one; a d- π -A chalcone derivative and its docking studies as a potent hepatoprotective agent. *Chemical Data Collections*, 20, 100205.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Wang, Q., He, J., Wu, D., Wang, J., Yan, J., & Li, H. (2015). Interaction of alpha-cyperone with human serum albumin: Determination of the binding site by using Discovery Studio and via spectroscopic methods. *Journal of Luminescence*, 164, 81-85.
- Wu, F., Bian, D., Xia, Y., Gong, Z., Tan, Q., Chen, J., & Dai, Y. (2012). Identification of Major Active Ingredients Responsible for Burn Wound Healing of Centella asiatica Herbs. *Evidence-based complementary and alternative medicine*: 2012(4), 848093.