



FINAL REPORT

Effect of Morelloflavone from *Garcinia dulcis* Flower on HMG-CoA Reductase Activity

Nongporn Towatana

and

Wilawan Mahabusarakam

(This research project was funded by Prince of Songkla University)

บทคัดย่อ

ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูงผิดปกติเป็นบ่อเกิดสำคัญของโรคหลอดเลือดหัวใจซึ่งมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและยังคงเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของประชากรในหลายประเทศ การรักษาด้วยยาลดไขมันในเลือดนั้น ถึงแม้จะให้ผลดี แต่มักเกิดอาการหรือภาวะข้างเคียงบางอย่างที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพร่วมด้วย ดังนั้น จึงมีผู้พยายามค้นหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการบำบัดความผิดปกติดังกล่าวซึ่งอาจให้ผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่ายาแผนปัจจุบันที่ใช้กันอยู่ในขณะนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า morelloflavone ซึ่งเป็นสารไบฟลาโวนอยด์จากมะพูดสามารถลดระดับไขมันในเลือดของกระต่ายที่ได้รับอาหารผสมคอเลสเตอรอลในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สารฟลาโวนอยด์จากพืชบางชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ควบคุมวิถีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย และยังเป็นเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของ statins ซึ่งเป็นกลุ่มยาลดไขมันในเลือดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดในโลก ดังนั้น เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดของ morelloflavone งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของสารสำคัญดังกล่าวซึ่งแยกได้จากดอกมะพูด ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในหลอดทดลอง

ผลการทดสอบกับบริเวณเร่งของ HMG-CoA reductase ซึ่งเตรียมโดยถ่ายฝากยีน plasmid pET 17b-CD-HMG เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 นั้น เอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถเร่งปฏิกิริยาในอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) เท่ากับ $5 \pm 0.26 \mu\text{M NADPH/mg/min}$ โดยมีค่าคงที่ของ Michaelis (K_m) สำหรับ HMG-CoA และ NADPH เป็น $74 \pm 0.06 \mu\text{M}$ และ $133 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ในสภาวะที่มี morelloflavone พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งแบบแข่งขันกับ HMG-CoA โดยมีค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i) เท่ากับ $80.87 \pm 0.06 \mu\text{M}$ แต่ยับยั้งแบบไม่แข่งขันกับ NADPH โดยมีค่า K_i เป็น $103 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ในขณะที่ naringenin กับ luteolin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์หน่วยย่อยของ morelloflavone ยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขันกับ HMG-CoA ด้วยค่า K_i ที่เท่ากันคือ $83.58 \pm 4.37 \mu\text{M}$ และ $83.59 \pm 0.94 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับ morelloflavone และสารทั้งสองยังยับยั้งแบบไม่แข่งขันกับ NADPH โดยมีค่า K_i เท่ากับ $182 \pm 0.67 \mu\text{M}$ และ $188 \pm 0.14 \mu\text{M}$ ตามลำดับ การที่ morelloflavone และหน่วยย่อยทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ทัดเทียมกัน แสดงว่า แต่ละโมเลกุลของ morelloflavone อาจใช้หน่วยย่อยข้างใดข้างหนึ่งเข้าแย่งจับกับเอนไซม์ โดยคาดว่า ตำแหน่งจับที่เหมาะสมน่าจะเป็นวงแหวนฟีนอลิกเดี่ยว (ring B) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับของ HMG และ statin อีกทั้งเป็นโครงสร้างที่ naringenin และ luteolin มีร่วมกัน

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า morelloflavone เป็นสารออกฤทธิ์จากมะพูดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้ดี ซึ่งควรค่าแก่การค้นคว้าวิจัยเพิ่มเติมเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดต่อไป

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a leading cause in the development of atherosclerosis-associated cardiovascular disease which still occurs increasingly and accounts for the majority of mortality worldwide. Although normalization of plasma cholesterol or LDL concentrations through drug administration is nowadays the most effective way to decrease atherogenic risk, these synthetic lipid-lowering drugs have been shown to cause serious side effects in various clinical settings. As such, there are attempts to find anti-hyperlipidemia agents from natural sources possessing lesser adverse effects. In previous studies, morelloflavone, a biflavonoid abundant in *Garcinia dulcis*, has exhibited its lipid-lowering property in high-cholesterol fed rabbits. However, a mechanism underlying such beneficial effect of this compound is not known. Several plant derived flavonoids have been reported for their inhibitory activities on HMG-CoA reductase, the key enzyme in the early step of cholesterol biosynthesis pathway and the main target of statins, the most prescribed cholesterol-lowering drugs. Therefore, to investigate whether morelloflavone would reduce blood cholesterol levels primarily through the inhibition of HMG-CoA reductase, morelloflavone from *G. dulcis* flower was then examined for its effect on this enzyme activity.

For the kinetics assay, the catalytic domain of house mouse HMG-CoA reductase was prepared by transforming plasmid pET 17b-CD-HMG to *Escherichia coli* of BL21 strain. It catalyzed the reaction at a maximum velocity (V_{max}) of $5 \pm 0.26 \mu\text{M NADPH/mg/min}$, with the Michaelis constant (K_m) values for HMG-CoA and NADPH calculated to be $74 \pm 0.06 \mu\text{M}$ and $133 \pm 0.21 \mu\text{M}$, respectively. Morelloflavone from *G. dulcis* flower, however, inhibited the enzyme by competing with HMG-CoA resulting in the inhibition constant (K_i) of $80.87 \pm 0.06 \mu\text{M}$ but exhibited noncompetitive inhibition towards NADPH with K_i of $103 \pm 0.07 \mu\text{M}$. In accordance with morelloflavone, both flavonoid subunits, narigenin and luteolin, competed with HMG-CoA with similar K_i values of $83.58 \pm 4.37 \mu\text{M}$ and $83.59 \pm 0.94 \mu\text{M}$, respectively. These isoflavone compounds were also noncompetitive with

NADPH and gave K_i of $182 \pm 0.67 \mu\text{M}$ and $188 \pm 0.14 \mu\text{M}$, respectively. Due to the finding that morelloflavone and its subunits were equally effective at inhibiting HMG-CoA reductase, it was likely that this biflavonoid would bind with the enzyme active site *via* either naringenin or luteolin subunits. The moiety favorable for such binding could be the phenolic structure (ring B), commonly existing in both flavonoids and having HMG-like feature.

The findings from this study thus indicate a potentiality of morelloflavone isolated from *G. dulcis* as an effective HMG-CoA reductase inhibitor that might be developed into a new hypocholesterolemic agent in the future.



***Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz.**

(<http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=2302>)