

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์

จากตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้งหมด 141 ชนิด นำมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 95% ethanol โดยใช้วิธีการดอง ได้สารสกัดอย่างหยาบเพื่อนำมาทดสอบทั้งหมด 141 ตัวอย่าง และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดอย่างหยาบเป็น 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตร และใช้ FK506 ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์ 2 ไมโครลิตร ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Acanthaceae	AEB	<i>Acanthus ebracteatus</i> Vahl	-
	AIL	<i>Acanthus ilicifolius</i> . L	-
	AVA	<i>Adhatoda vasica</i> Nees	-
	APA	<i>Andrographis paniculata</i>	+++
	BPU	<i>Barleria pulina</i> Lindl.	-
	CNU	<i>Clinacanthus nutans</i> (Burm.F.) Lindau	-
	RNA	<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.)Kurz.	-
	TLA	<i>Thunbergia laurifolia</i> L.	-
Aizoaceae	GOP	<i>Glinus oppositifolius</i> A.DC.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Alliceae	ALSA	<i>Allium sativum</i> Linn.	-
Amaranthaceae	IHE	<i>Iresine herbstii</i> Hook f.	-
Amaryllidaceae	CAS	<i>Crinum asiaticum</i> Linn.	-
Anacardiaceae	MUS	<i>Melanorrhoea usitata</i> Wall.	-
Apocynaceae	AGMA	<i>Aganosma marginata</i>	-
	ASC	<i>Alstonia scholaris</i> (Linn.) R. Br.	-
Araceae	AIN	<i>Alocasia indica</i> Schott var. <i>metallica</i> Schott	-
	AOD	<i>Alocasia odorata</i> C. Koch	-
	ABL	<i>Amorphophallus companulatus</i> Blume.ex Dene	-
	LSP	<i>Lasia spinosa</i> Thw.	-
Asclepiadaceae	HOV	<i>Hoya ovalifolia</i> W. & A.	-
Asparagaceae	ARA	<i>Asparagus racemosus</i> willd	-
Asteraceae	PIN	<i>Pluchea indica</i> (Linn.) Less.	-
	SAC	<i>Spilanthes acmella</i> Murr.	-
Avicenniaceae	AAL	<i>Avicennia alba</i> Bl.	-
Bixaceae	BOR	<i>Bixa orellana</i> L.	-
Boraginaceae	HIN	<i>Heliotropium indicum</i>	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Caesalpinaceae	CGA	<i>Cassia garrettiana</i>	-
	CSA	<i>Caesalpinia sappan</i> Linn.	-
Caesalpinaceae	CTO	<i>Cassia tora</i> Linn.	-
Caricaceae	CPAA	<i>Carica papaya</i> Linn.	-
Celastraceae	SCE	<i>Siphonodon celastrineus</i> Griff.	-
Cleomaceae	CVI	<i>Cleome viscosa</i> Linn.	-
Clusiaceae	GAC	<i>Garcinia acuminata</i> Planch. & Triana	-
Combretaceae	LLI	<i>Lumnitzera littorea</i> Voigt	-
	TBE	<i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb.	-
	TCH	<i>Terminalia chebula</i> Retz. var. <i>chebula</i>	-
Compositae	ACO	<i>Ageratum conyzoides</i> Linn.	-
	ASCO	<i>Artemisia scoparia</i> Waldst. & Kit.	-
Compositae	CTI	<i>Carthamus tinctorius</i> Linn.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Compositae	CAN	<i>Centratherum anthelminthicum</i> (Willd.) Kuntz.	-
	CGR	<i>Coccinia grandis</i> (Linn.) Voigt.	-
	EPR	<i>Eclipta prostrata</i> Linn.	-
	EST	<i>Eupatorium stoechadosnum</i> Ham	-
	GPS	<i>Gynura pseudo – china hispida</i>	-
	TCU	<i>Trichosanthes cucumerrina</i> Linn.	-
	VCI	<i>Vermonia cinerea</i> Less.	-
Cucurbitaceae	GIN	<i>Gymnopetalum integriforium</i> Kurz.	-
Cucurbitaceae	MCH	<i>Momordica charantia</i> L.	-
	MOCO	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng.	-
Dioscoreaceae	DHI	<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Euphorbiaceae	BMO	<i>Baliospermum montanum</i> Muell. Arg.	-
Euphorbiaceae	BOV	<i>Bridelia ovata</i> Decne	-
	COR	<i>Cladogynos orientalis</i> Zipp.ex Span.	-
	CTIG	<i>Croton tiglium</i> Linn.	-
	EHI	<i>Euphorbia hirta</i>	-
	ECO	<i>Excoecarice cochinueuse</i>	-
	GMU	<i>Gelonium multiflorum</i> A. Juss.	-
	COB	<i>Croton oblongifolius</i> Roxb.	-
	PAC	<i>Phyllanthus acidus</i> Skeels.	-
	PEM	<i>Phyllanthus emblica</i> Linn.	-
	PAM	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	-
	SIN	<i>Sapium indicum</i> Willd.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Flacourtiaceae	FIN	<i>Flacourtia indica</i> Merr.	-
Goodeniaceae	STA	<i>Scaevola taccada</i> Roxb.	-
Gramineae	CDA	<i>Cynodon dactylon</i> Pers	-
Guttiferae	GMA	<i>Garcinia mangostana</i> L.	-
Guttiferae	GCO	<i>Garcinia cowa</i> Roxb.	-
Iridaceae	BCH	<i>Belamcanda chinensis</i> (Linn.) DC.	-
Labiatae	OSA	<i>Ocimum sanctum</i> Linn.	-
	OCA	<i>Ocimum canum</i> Sims	-
Lauraceae	CBE	<i>Cinnamomum bejolghota</i> Sweet	-
	CIN	<i>Cinnamomum iners</i> Blume.	-
	LGL	<i>Litsea glutinosa</i> (Lour.) C.B. Robinson	-
Leguminosae	APR	<i>Abrus precatorius</i> Linn.	-
	CFI	<i>Cassia agnes</i> Brenan	-
	EVA	<i>Erythrina variegata</i> L.	-
	MPI	<i>Mimosa pigra</i> L.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Liliaceae	GSU	<i>Gloriosa superba</i> Linn.	-
Menispermaceae	CPA	<i>Cissampelos pareira</i> Linn.	-
Menispermaceae	SPI	<i>Stephania pierrei</i> Diels.	-
Menispermaceae	TTI	<i>Tiliacora triandra</i> Diels.	-
	TTU	<i>Tinospora tuberculata</i> Beumee	-
Melastomataceae	MPO	<i>Melastoma polyanthum</i> Bl.	-
Malvaceae	HAS	<i>Hibiscus sabdariffa</i> linn.	-
Meliaceae	AIN	<i>Azadirachta indica</i> A.Juss var.siamensis Valet	-
Milacaceae	SMI	<i>Smilax</i> spp. S	-
Mimosoideae	ARU	<i>Acacia rugata</i> Merr.	-
	ACA	<i>Acacia catechu</i> Willd.	-
Moraceae	FHI	<i>Ficus hispida</i> Linn. f.	-
	FPU	<i>Ficus pubigera</i> Wall.	-
	MCO	<i>Maclura cochinchinensis</i> Corner	-
	MAL	<i>Morus alba</i> L.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Moraceae	SAS	<i>Streblus asper</i> Lour.	-
Myristicaceae	MFR	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	-
Myrtaceae	SAR	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry	-
Nelumbonaceae	NNU	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	-
Orchidaceae	LDI	<i>Ludisia discolor</i> (Ker-Gawl.) A.Rich.	-
Pandanaceae	POD	<i>Pandanus odoratissimus</i> L.f.	-
Papilionaceae	DEL	<i>Derris elliptica</i> (Roxb.) Benth.	-
	GGL	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	-
Piperaceae	PCH	<i>Piper chaba</i> Hunter.	-
	PINI	<i>Piper nigrum</i> L.	-
	PRI	<i>Piper ribesoides</i> Wall.	-
	PSA	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	-
Plantaginaceae	PMA	<i>Plantago major</i> Linn.	-
Plumbaginaceae	PRO	<i>Plumbago rosea</i> Linn.	-
	PZE	<i>Plumbago zeylanica</i> Linn.	-
Poaceae	CAN	<i>Cymbopogon nardus</i> Rendle	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Punicaceae	PGR	<i>Punica granatum</i> Linn.	-
Rhizophoraceae	RMU	<i>Rhizophora mucronata</i> Poir.	-
Rubiaceae	HFO	<i>Hydnophytum formicarum</i> Jack	-
Rubiaceae	MCI	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.	-
	PFO	<i>Paederia foetida</i> Linn.	-
Rutaceae	AEMA	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.	-
Salvadoraceae	ASA	<i>Azima sarmentosa</i> Benth. & Hook.	-
Sapindaceae	CHA	<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	-
Saururaceae	HCO	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	-
Scrophulariaceae	AHI	<i>Adenosma hirsutum</i> (Miq.) Kurz	-
	SDU	<i>Scoparia dulcis</i> L.	-
Simaroubaceae	BJA	<i>Brucea javanica</i> Merr.	-
	ELO	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack.	-
Solanaceae	SST	<i>Solanum stramonifolium</i> Jacq.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Sonneratiaceae	SOV	<i>Sonnertia ovata</i> Back.	-
Sterculiaceae	AAU	<i>Abroma augusta</i> Linn.f.	-
	SMA	<i>Scaphium macropodum</i> Beaumee	-
Umbelliferae	AGR	<i>Anethum graveolens</i> Linn.	-
	CASI	<i>Centella asiatica</i> Linn.	-
	CCY	<i>Cuminum cyminum</i> Linn.	-
	EFO	<i>Eryngium foetidum</i> Linn.	-
Umbelliferae	HIS	<i>Heracleum siamicum</i> Craib var. <i>gracilius</i> Craib	-
Verbenaceae	VTR	<i>Vitex trifolia</i> Linn.	-
Zingiberaceae	AKR	<i>Amomum kriveranh</i> Pierre	-
	AVI	<i>Amomum villosum</i> Lour. var. <i>xanthioides</i> (Wall)	-
	ANI	<i>Alpinia nigra</i> (Gaertn.)	-
	AOF	<i>Alpinia officinarum</i> Hance.	-
	BPA	<i>Boesenbergia pandurata</i>	+++*
	CLO	<i>Curcuma longa</i> Linn.	-
	CXA	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์
Zingiberaceae	CZE	<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc.	-
	ZMO	<i>Zingiber montanum</i> (Koen.) Theilade	-
	ZZE	<i>Zingiber zerumbet</i> Smith	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย - คือ ได้ผลการทดสอบเป็นลบ (negative) กล่าวคือไม่มีการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย
 เครื่องหมาย + คือ ได้ผลการทดสอบเป็นบวก (positive) กล่าวคือมีการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย
 เครื่องหมาย +* คือ ได้ผลการทดสอบเป็นบวกโดยมีลักษณะการเจริญเป็นแบบวงแหวน (ring-like growth)
 จำนวนเครื่องหมาย + บอกระดับความแรงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบ โดยกำหนดให้ FK506 ที่เป็น positive control มีความแรงเป็น +++

ผลการทดสอบสารสกัดทั้งหมด 141 ตัวอย่าง พบสารสกัดที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก 2 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือ สารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*, BPA) กระชายเหลืองป็นพืชที่พบได้ในครัวเรือนและเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณต้านอักเสบที่สารสกัดอย่างหยาบจากฟ้าทลายโจร (*Andrographis paniculata*, APA) ฟ้าทลายโจรเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย

ฟ้าทลายโจรอยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Nees (รูปที่ 4.1) ฟ้าทลายโจรนับเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันมากในประเทศไทย จีน อินเดีย และ ชาวาโดยมีสรรพคุณหลากหลายเช่น แก้ไข้หวัด แก้ไอ รักษาอาการตับอักเสบ ลำไส้อักเสบ หลอดลอักเสบ วัณโรค ท้องร่วงเฉียบพลัน (Panossian และคณะ, 2002) โดยจากรายงานทางเคมีพบว่าฟ้าทลายโจรประกอบไปด้วยสารหลายชนิดเช่น andrographolide, andrographiside and neoandrographolide, 14-deoxy-11-oxoandrographolide, 14-

deoxyandro-grapholide, 14-deoxy-11,12-idehydroandogropholide and 14-deoxy-11,14-didehydro-andogropholide (Honssain และคณะ, 2007)



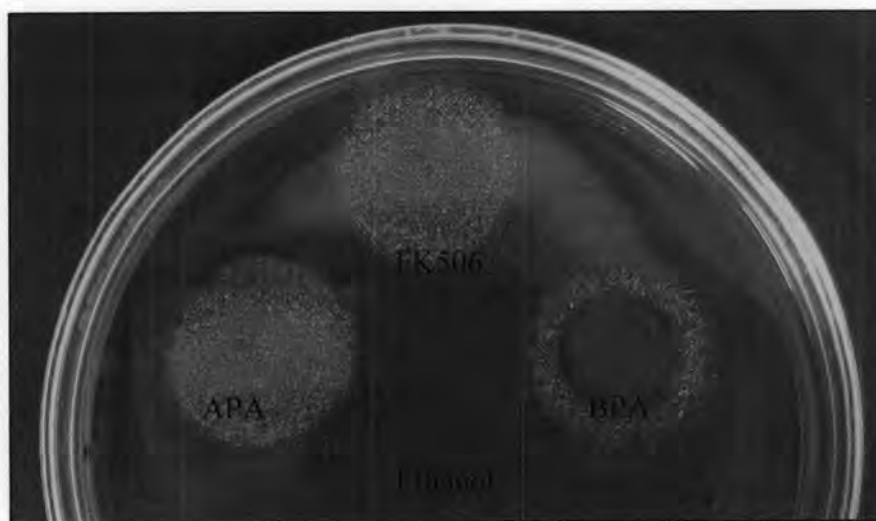
รูปที่ 4.1 ฟ้าทลายใจ *Andrographis paniculata*

กระชายเหลืองจัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia pandurata* (Roxb) (รูปที่ 4.2) กระชายเหลืองเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีการใช้ในการประกอบอาหารและเป็นสมุนไพร กระชายเหลืองเป็นพืชที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย ในรากและเหง้า กระชายเหลือง ได้แก่ ไพนีน (pinene), แคมฟิน (camphene), ทูจีน (thujene), ลิโมนีน (limonene) และ กานบูร ในเหง้ากระชายเหลืองมีน้ำมันหอมระเหยแต่พบในปริมาณน้อย (ราวร้อยละ 1-3) น้ำมันหอมระเหยของกระชายเหลืองประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด เช่น 1, 8-cineol, camphor, d-borneol และ methyl cinnamate น้ำมันหอมระเหยที่พบส่วนน้อย ได้แก่ d-pinene, zingiberene, zingiberone, curcumin และ zedoarin นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ได้แก่ กลุ่มไดไฮโดรซาลโคน boesenbergin A กลุ่ม ฟลาโวน, ฟลาวาโนน และฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ alpinetin, pinostrobin) และ pinocembrin และกลุ่มซาลโคน (ได้แก่ 2, 4, 6-trihydroxy chalcone และ cardamonin (Mongkolsuk และ Dean, 1964, Jaipetch และคณะ, 1982, Tuntiwachwuttikul และคณะ, 1982, Mahidol และคณะ, 1984)



รูปที่ 4.2 กระชายเหลือง *Boesenbergia pandurata*

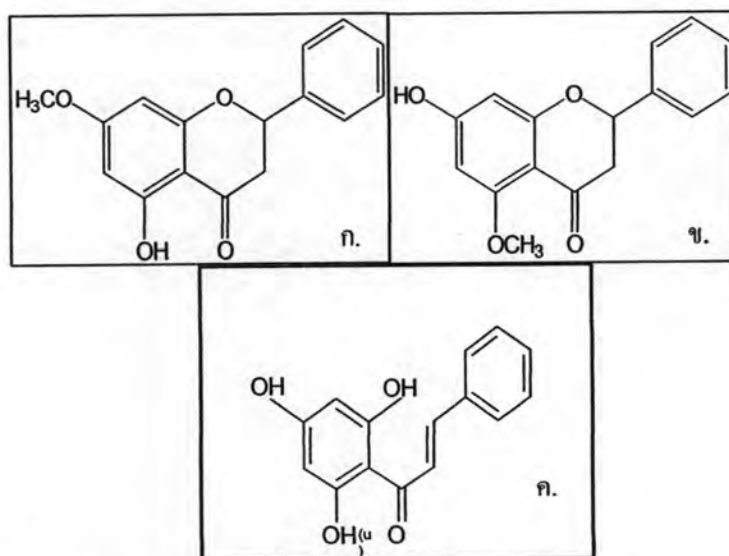
ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่ากระชายเหลือง มีสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีผลยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ใช้เป็นเซลล์บ่งชี้ในระบบคัดกรองนี้ และลักษณะของผลบวกที่ได้แสดงการเจริญแบบวงแหวน ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าอาจเกิดได้จากสองสาเหตุคือ มีสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อเซลล์ยีสต์มากกว่าหนึ่งชนิดและหนึ่งในนั้นเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และยังมีสารชนิดอื่นที่มีผลยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมทำให้เกิดการเจริญรอบนอก ส่วนอีกสาเหตุหนึ่งคือเนื่องสารออกฤทธิ์ที่ได้มีนั้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง แต่ถ้าความเข้มข้นลดลงจะสามารถยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้เพราะการหยุดการทดสอบโดยตรงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะทำให้บริเวณตรงกลางของหยดมีความเข้มข้นสูงและเมื่อสารแพร่ออกจากจุดศูนย์กลางออกไปจะทำให้ความเข้มข้นของสารบริเวณรอบนอกลดลง เป็นผลให้เห็นการเจริญแบบวงแหวน และเพื่อยืนยันผลบวกทั้งสองที่ได้นี้จึงทำการทดสอบตัวอย่างสารสกัดอย่างหยาบช้าและหาวัตถุดิบใหม่เพื่อมาสกัดสารสกัดอย่างหยาบและทดสอบโดยระบบยีสต์ข้างต้น



รูปที่ 4.3 ลักษณะของงานเพาะเชื้อที่ให้ผลการทดสอบบวกของสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลือง (BPA) และฟ้าทลายโจร (APA) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ ethanol เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ

4.2 ทดสอบระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกโดยระบบยีสต์

จากงานวิจัยของ นางสาวสายพิน บุญเกิด(ยังไม่ได้ตีพิมพ์) พบว่าจากการแยกสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลืองให้เป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีและการตกผลึก รวมทั้งทำการติดตามฤทธิ์ของสารที่แยกได้แต่ละส่วนย่อยโดยใช้ระบบยีสต์ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกได้ 3 ชนิด โดยเมื่อนำไปหาโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่อง NMR ดังแสดงในรูป 4.4 และเปรียบเทียบกับสูตรโครงสร้างของสารที่ได้กับรายงานที่ผ่านมาของ Burke และ Nair (1986), Tanaka และคณะ (1985), Itokawa และคณะ (1981) พบว่าสาร ก คือ 5-hydroxy-7-methoxyflavanone (pinostrobin) และสาร ข คือ (7-hydroxy-5-methoxyflavanone) alpinetin และจากรายงานของ Bohlmann และคณะ (1979), Bremner และคณะ (1998) พบว่าสาร ค คือ 2',4',6'-trihydroxy chalcone (pinocembrin chalcone)



รูปที่ 4.4 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายเหลือง ก. Pinostrobin ข. Alpinetin ค. Pinocembrin chalcone

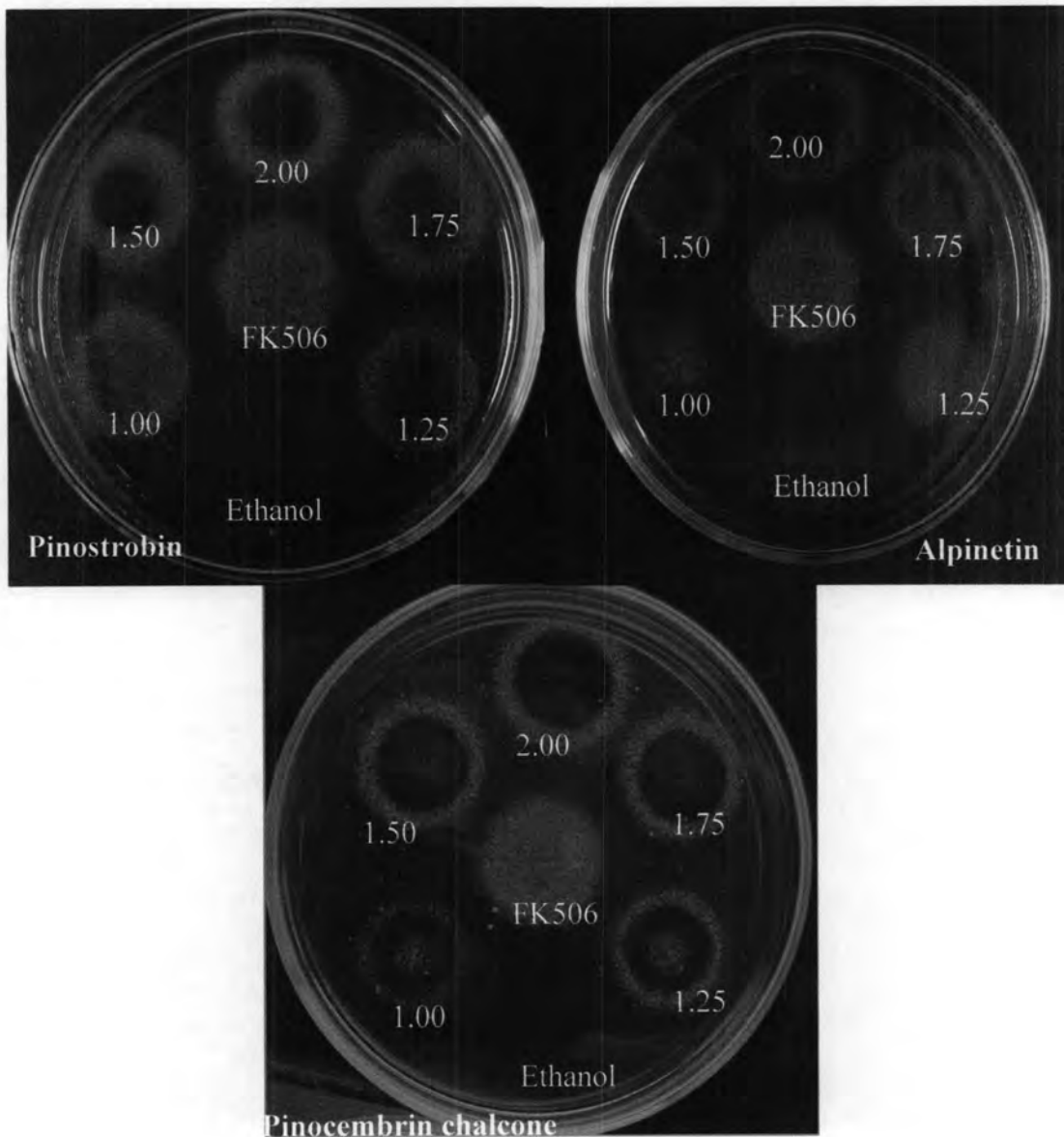
และในงานวิจัยนี้ นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายเหลืองถูกนำมาหาระดับแอกติวิตีโดยระบบยีสต์ โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.5 จากผลการทดลองพบว่าสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกเรียงจากมากไปน้อย คือ pinostrobin, Alpinetin และ pinocembrin chalcone ตามลำดับ โดยผลจากการทดสอบในระบบยีสต์พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ให้ผลการเจริญในลักษณะวงแหวนที่ความเข้มข้นสูงและลักษณะการเจริญปกติที่ความเข้มข้นต่ำลงมา แสดงว่าสารเหล่านี้ที่ความเข้มข้นสูงๆจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์และที่ค่าความเข้มข้นน้อยๆจะยับยั้งวิถีแคลเซียม

โดยพบว่า pinostrobin และ alpinetin ที่ความเข้มข้น 1 และ 1.25 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ไม่เกิดการเจริญลักษณะวงแหวน แต่แสดงลักษณะการเจริญแบบปกติดังรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์

ความเข้มข้น	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์		
	Pinostrobin	Alpinetin	Pinocebrin chalcone
2.00 มิลลิโมลาร์	+++*	++*	+++*
1.75 มิลลิโมลาร์	+++*	++*	+++*
1.50 มิลลิโมลาร์	+++*	++*	++*
1.25 มิลลิโมลาร์	++*	++	++*
1.00 มิลลิโมลาร์	++	+	+
0.75 มิลลิโมลาร์	++	weak	+
0.5 มิลลิโมลาร์	+	-	weak*
0.25 มิลลิโมลาร์	-	-	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย - คือ ได้ผลการทดสอบเป็นลบ (negative) กล่าวคือไม่มีการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$
 เครื่องหมาย + คือ ได้ผลการทดสอบเป็นบวก (positive) กล่าวคือมีการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$
 เครื่องหมาย +* คือ ได้ผลการทดสอบเป็นบวกโดยมีลักษณะการเจริญเป็นแบบวงแหวน (ring-like growth)
 จำนวนเครื่องหมาย + บอกถึงความแรงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบ โดยกำหนดให้ FK506 ที่เป็น positive control มีความแรงเป็น +++



รูปที่ 4.5 ผลของการทดสอบด้วยระบบยีสต์ของ pinostrobin, alpinetin, pinoembrin chalone ที่คัดกรองได้จากกระชายเหลืองที่ค่าความเข้มข้นต่างๆในหน่วยมิลลิโมลาร์ โดยใช้ FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์และ ethanol เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ

4.3 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของสารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จากระบบยีสต์โดย Flow cytometry และลักษณะการแตกหน่อของยีสต์

เนื่องจากการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ มีผลทำให้เกิดการชะลอหรือหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G2 และเกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติ(ส่วนที่แตกหน่อออกมาจะมีลักษณะยี่ตขาว)(Shitamukai และคณะ, 2000) สารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จาก

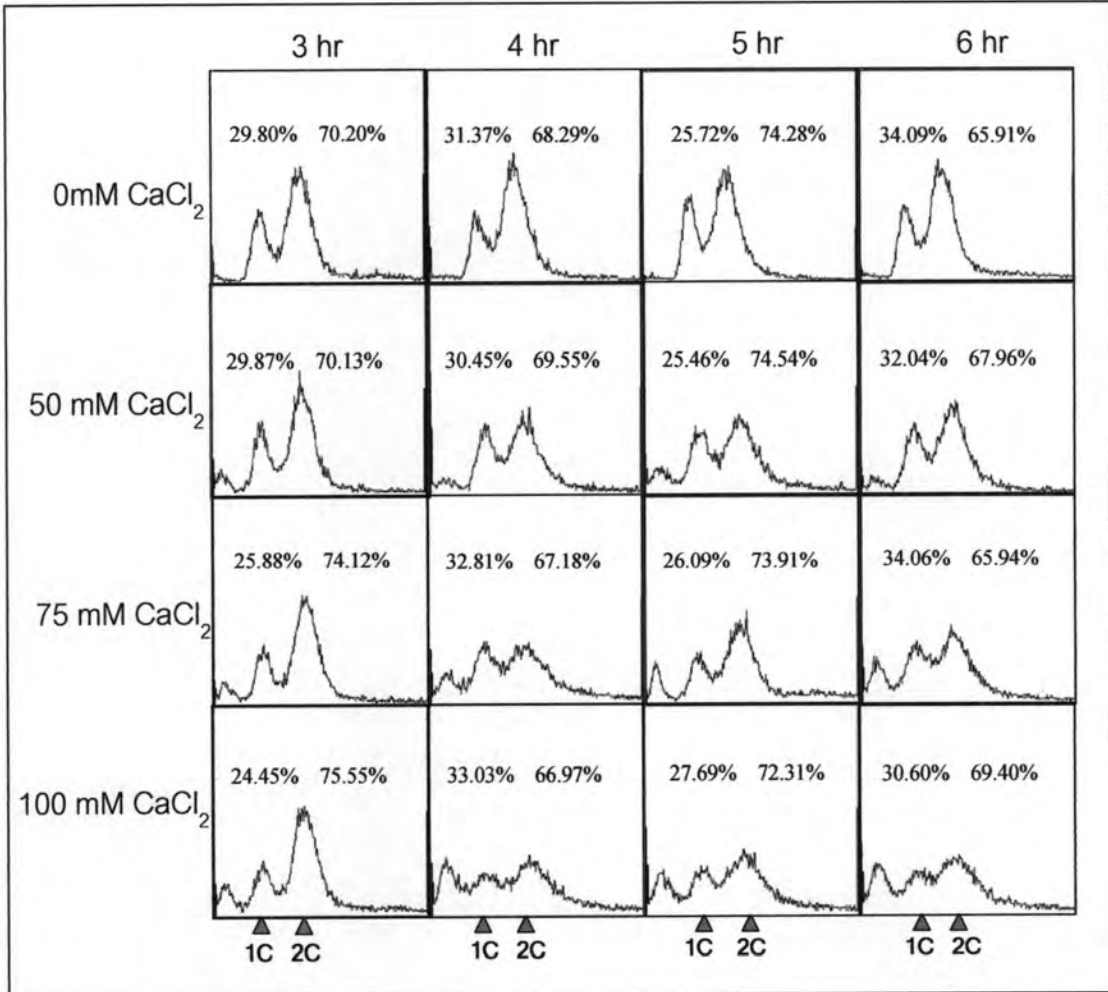
ระบบยีสต์นั้นสามารถยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ได้ ดังนั้นสารออกฤทธิ์ที่ได้นี้ จะสามารถยับยั้งการเกิดการชะลอหรือหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G2 และยับยั้งการแตกหน่อที่ผิดปกติของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ได้ การตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์สามารถทำได้โดยการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ ถ้าเกิดการชะลอหรือหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G2 จากการกระตุ้นวิถีส่งสัญญาณของแคลเซียมจะทำให้เซลล์ยีสต์ ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า (2C DNA content) มีจำนวนมากกว่าเซลล์ยีสต์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 1 เท่า (1C DNA content) การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide ซึ่งจะย้อมติดดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ยีสต์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ยีสต์โดยเครื่อง flow cytometry

4.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ โดยเครื่อง Flow cytometry

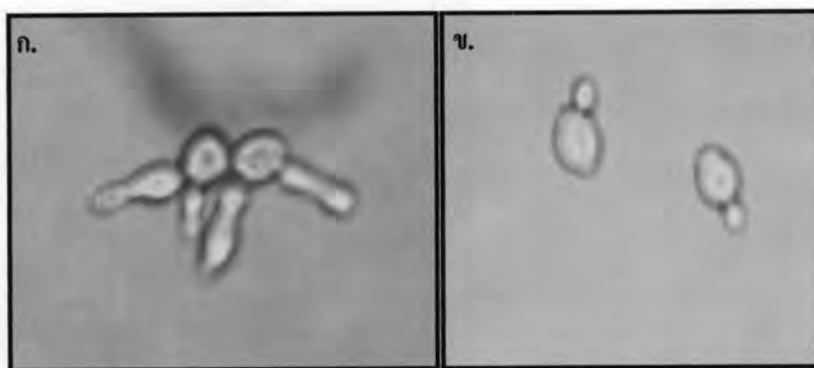
เพื่อตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ โดยการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometry จึงได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยการแปรผันตัวแปรต่างๆ ได้แก่ ค่าความเข้มข้นของ CaCl_2 (50-100 มิลลิโมลาร์) และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มภายหลังการเติม CaCl_2 (3-6 ชั่วโมง) โดยเลือกจากลักษณะผลการทดลองดังนี้

- ก. ในสภาวะที่เติมแคลเซียมมีปริมาณเซลล์ที่มีดีเอ็นเอเป็นหนึ่งเท่า (พีค 1C) น้อยกว่าในสภาวะที่ไม่เติม CaCl_2
- ข. ในสภาวะที่เติมแคลเซียมการแตกหน่อของเซลล์จะมีลักษณะยี่ดียวออกส่วน สภาวะที่ไม่มีการเติมแคลเซียมการแตกหน่อจะมีลักษณะปกติ(ทรงกลมหรือรี เล็กน้อย)

ผลของการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์โดย flow cytometry และลักษณะของการแตกหน่อ แสดงอยู่ในรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 Flow cytometry profile ของเซลล์ยีสต์ที่ถูกกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมด้วย CaCl₂ ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 3, 4, 5, และ 6 ชั่วโมง โดยแกน x แสดงปริมาณดีเอ็นเอ แกน y แสดงปริมาณเซลล์ 1C คือปริมาณดีเอ็นเอหนึ่งเท่า 2C คือปริมาณดีเอ็นเอเป็นสองเท่า



รูปที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้กำลังขยาย 40 เท่า

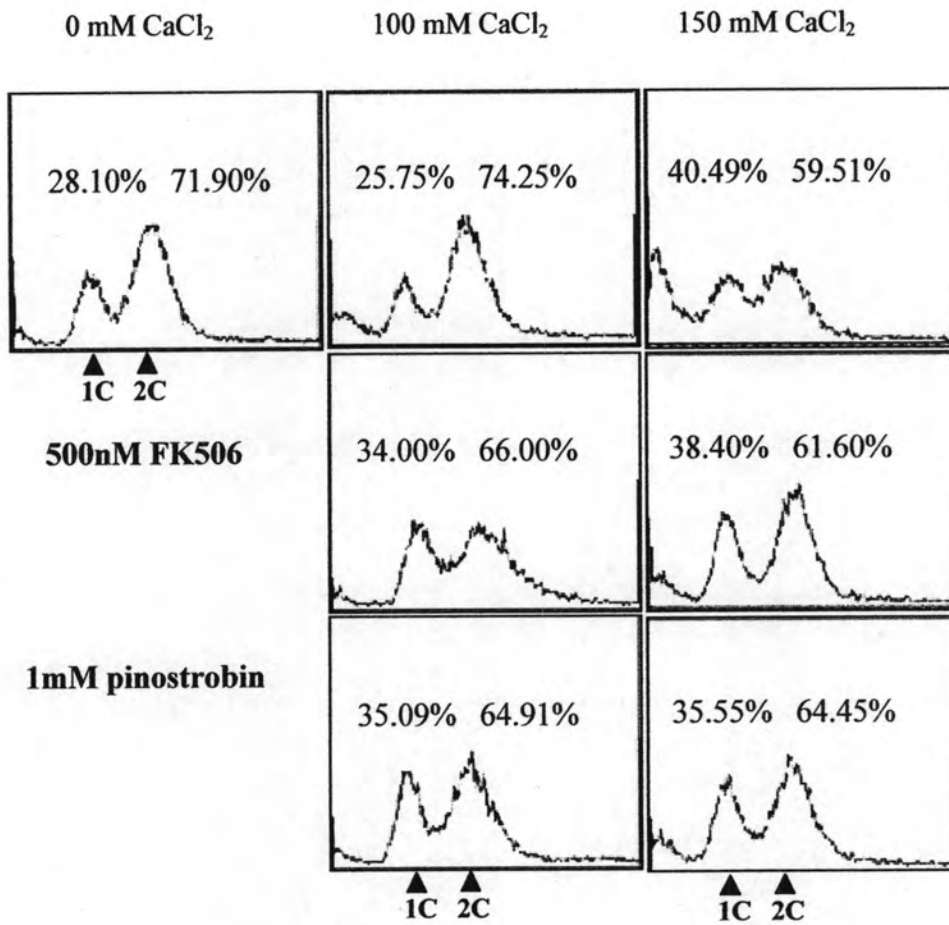
ก. แสดงลักษณะการแตกหน่อภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย CaCl_2 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ข. แสดงแสดงลักษณะการแตกหน่อในสภาวะปกติ(ไม่มีการเติม CaCl_2)

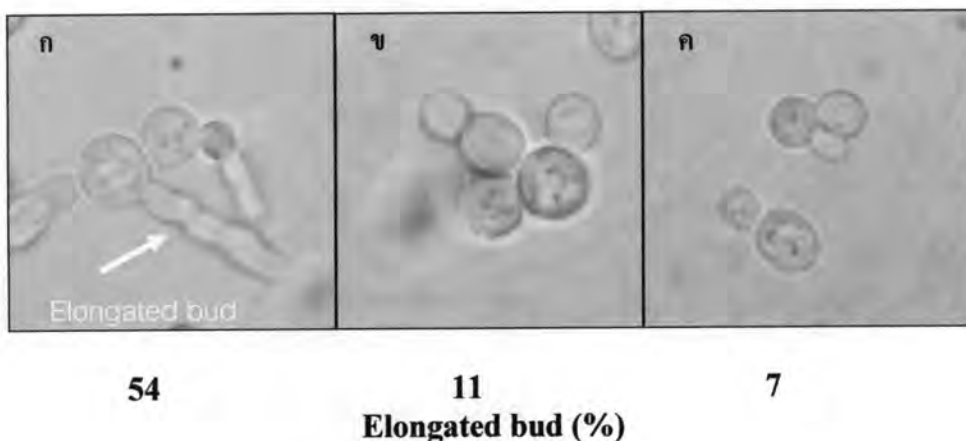
จาก Flow cytometry profile และสัญญาณวิทยาของการแปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 และเวลาที่กระตุ้นวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียม พบว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบระยะเวลาการแบ่งเซลล์โดยเครื่อง flow cytometry คือ CaCl_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์ และบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยพบว่าในสภาวะที่มีการกระตุ้นการส่งสัญญาณแคลเซียมด้วยคือ CaCl_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์ และบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า (2C) เพิ่มขึ้น (75.55%) ในขณะที่จำนวนเซลล์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 1 เท่า (1C) ลดลง (24.45%) เมื่อเทียบกับสภาวะไม่เติม CaCl_2 ที่มีค่าดังกล่าวเป็น 70.20% และ 29.80% ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) และเกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติ (รูปที่ 4.7)

4.3.2 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของ pinostrobin ที่คัดกรองจากระบบยีสต์โดย Flow cytometry profile และลักษณะการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย *Azds1*

การทดลองนี้ใช้ค่าที่เหมาะสมของความเข้มข้นของ CaCl_2 และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่หาได้จากการทดลองที่ 4.4.1 เพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมของ pinostrobin ที่แยกได้จากกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*) ซึ่งคัดกรองและติดตามโดยระบบยีสต์ จากข้อ 4.2 โดยใช้สารยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียม FK506 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 นาโนโมลาร์เป็นชุดควบคุมผลบวก และการทดลองนี้ได้เพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมเป็น 150 มิลลิโมลาร์เพื่อติดตามผลของแคลเซียมที่ชะลอ (delay) หรือหยุด (arrest) การแบ่งเซลล์ยีสต์อยู่ที่ระยะ G2 ซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์(ทิศทางด้านซ้ายมือของพีค 1C ดังรูปที่ 4.8) ส่วน alpinetin และ pinocembrin chalone ที่แยกจาก *B. pandurata* นั้นพบว่ามีความเป็นพิษสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้ไม่สามารถทำการทดลองนี้ได้ ผลการตรวจสอบระยะเวลาการแบ่งเซลล์และลักษณะการแตกหน่อแสดงได้ดังรูปที่ 4.8, 4.9 และ 4.10



รูปที่ 4.8 Flow cytometry profile ของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เมื่อบ่มด้วย pinostrobin ก่อนที่จะมีการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมด้วย CaCl₂ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ และมี FK506 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนโมลาร์เป็นตัวควบคุมผลบวก



รูปที่ 4.9 ผลของ pinostrobin ที่มีต่อการแตกหน่อของยีสต์ภายใต้สภาวะที่วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายถูกกระตุ้นด้วย CaCl_2 ด้วยความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า ตัวเลขด้านล่างของภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อที่ผิดปกติ (Elongated bud)

ก แสดงลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแคลเซียมและไม่มีการเติมสารบริสุทธิ์ pinostrobin (ชุดควบคุมผลลบ)

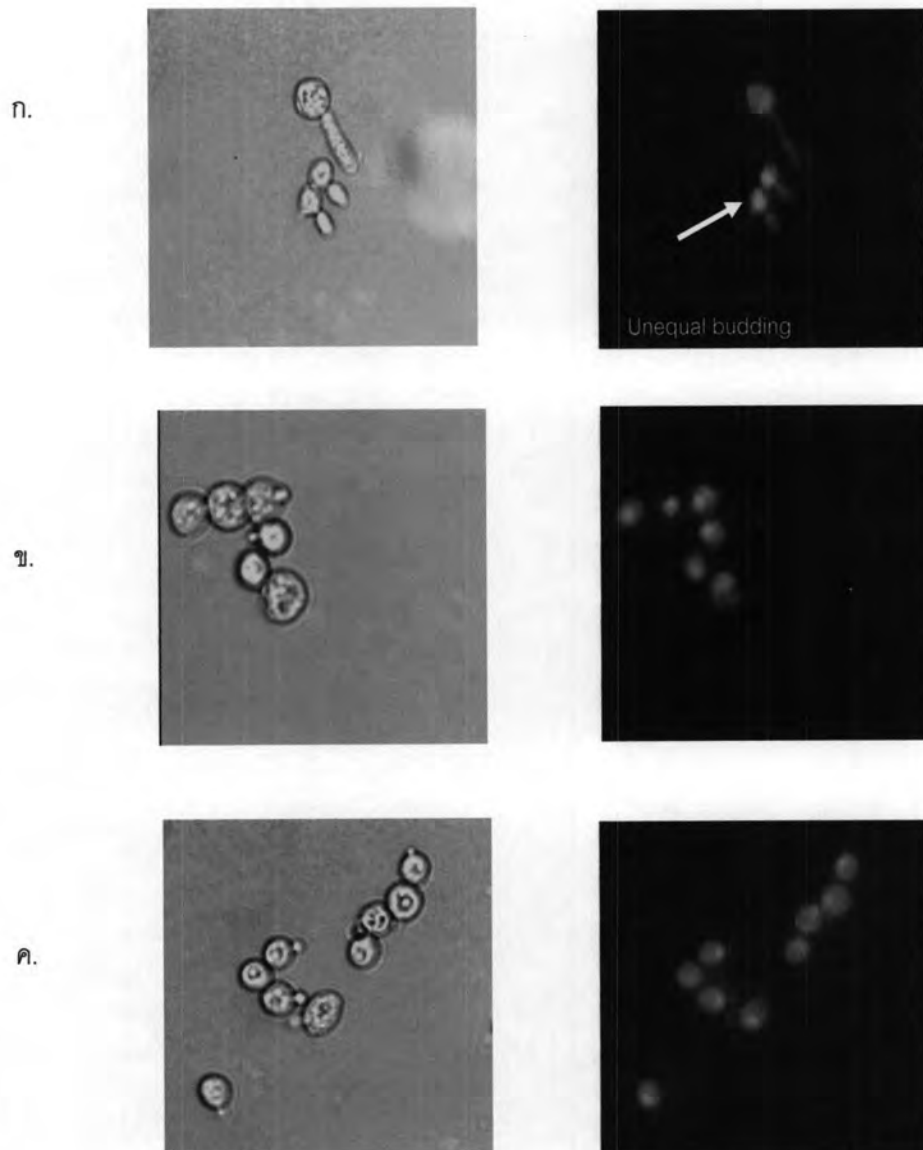
ข แสดงลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแคลเซียมและมีการเติมสารบริสุทธิ์ pinostrobin ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์

ค แสดงลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์ที่มีการเติม FK506 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 นาโนโมลาร์ (ชุดควบคุมผลบวก)

pinostrobin ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์สามารถที่ป้องกันการเกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติภายใต้สภาวะที่มีการกระตุ้นวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม โดยพบว่าเมื่อมีการเติม pinostrobin จะมีผลให้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีการแตกหน่อผิดปกติลดลง(11%) เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้เติม pinostrobin (54%)

จากผลการตรวจสอบระยะเวลาการแบ่งเซลล์ในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ และลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ภายใต้สภาวะที่วิธีส่งสัญญาณของแคลเซียมถูกกระตุ้น พบว่า pinostrobin สามารถที่จะยับยั้งการชะลอ หรือหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G2 ได้(รูปที่ 4.8) เมื่อเติม pinostrobin จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า (2C) ลดลง (64.91%) ในขณะที่จำนวนเซลล์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 1 เท่า (1C) เพิ่มขึ้น (35.09%) เมื่อเทียบกับสภาวะไม่เติม pinostrobin ที่มีค่าดังกล่าวเป็น 75.25% และ 25.75% ตามลำดับ และผลจากการย้อมสีดีเอ็นเอภายในนิวเคลียสด้วยสี Hoechst 33342 ในรูปที่ 4.8 พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีแคลเซียมสูง

นิวเคลียสของยีสต์สายพันธุ์กลาย *Azds1* ไม่สามารถแบ่งไปสู่เซลล์ลูกได้ แต่เมื่อเติม pinostrobin นิวเคลียสของเซลล์ยีสต์ดังกล่าวสามารถแบ่งได้ตามปกติดังรูป 4.10 ก. และ 4.10 ข. ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเติม FK506 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนโมลาร์ ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (ชุดควบคุมผลบวก)(4.10 ค.) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าในสภาวะที่วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมถูกกระตุ้น pinostrobin สามารถป้องกันการเกิดการชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 (G2 delay) ได้ และ pinostrobin ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1 มิลลิโมลาร์ยังสามารถป้องกันการเกิดการหยุดการแบ่งเซลล์ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ในสภาวะที่มีสัญญาณการกระตุ้นของแคลเซียมที่ความเข้มข้นสูง (100 และ 150 มิลลิโมลาร์ของ CaCl_2)



รูปที่ 4.10 ผลของสารบริสุทธิ์ pinostrobin ที่มีต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ (budding) ภายใต้สภาวะที่วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายถูกกระตุ้นด้วย CaCl_2 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดีเอ็นเอในนิวเคลียสถูกย้อมด้วยสี Hoechst 33342 โดยรูปทางขวาแสดงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้อง Fluorescence (กำลังขยาย 40 เท่า)

ก) แสดงลักษณะแบ่งนิวเคลียสของเซลล์เมื่อไม่มีการเติมสาร (ชุดควบคุมผลลบ)

ข) แสดงลักษณะแบ่งนิวเคลียสของเซลล์เมื่อมีการเติม pinostrobin ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์

ค) แสดงลักษณะแบ่งนิวเคลียสของเซลล์ที่มีการเติม FK506 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 นาโนโมลาร์ (ชุดควบคุมผลบวก)

4.4 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของ pinostrobin ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์

จากผลการทดลองข้อ 4.4 ทำให้สามารถยืนยันผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์โดย pinostrobin การทดลองต่อไปจะทำการตรวจหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของ pinostrobin ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์โดยวิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์เพื่อศึกษาถึงผลของ pinostrobin ที่อาจมีผลไปกระตุ้นหรือยับยั้งโปรตีนเป้าหมายที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม

4.4.1 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์

เพื่อศึกษาว่า pinostrobin สามารถลดระดับหรือขัดขวางการทำงานของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ในสถานะที่มีแคลเซียมสูงหรือไม่ ยีน *PMR2A* ประมวลรหัส ion transporter มีความสำคัญต่อกระบวนการรักษาสสมดุลย์ของไอออน (ion homeostasis) ถูกควบคุมระดับการแสดงออกโดยระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ผ่านทาง calcineurin (Cunningham และ Fink, 1996) ในการทดลองนี้ได้ใช้ยีสต์สายพันธุ์ W303 ที่มีพลาสมิด pKC190 พลาสมิดดังกล่าวประกอบด้วย promotor ของยีน *PMR2A* เชื่อมกับยีนรายงานผล lacZ ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ β -galactosidase โดยที่ถ้ายีสต์ดังกล่าวอยู่ในสถานะที่มีแคลเซียมสูง จะมีการแสดงออกของยีนรายงานผลมากกว่าปกติ ถ้าสารออกฤทธิ์ที่ได้มีผลต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์จะทำให้การกระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงานผลอยู่ในระดับต่ำกว่าชุดที่ไม่มีการเติมสาร (ชุดควบคุมผลลบ) การวัดระดับการแสดงออกของยีนรายงานผลทำได้โดยวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ β -galactosidase ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4.3 พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวในสถานะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงนั้น ในชุดการทดลองที่มีการเติม pinostrobin พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมผลลบ สำหรับชุดควบคุมผลบวกที่ใช้ FK506 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง calcineurin ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์อยู่ในระดับที่ต่ำจนไม่สามารถวัดได้โดยวิธีนี้ จากผลการทดลองนี้แสดงว่า pinostrobin ไม่มีผลต่อระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์

ตารางที่ 4.3 ผลของ pinostrobin ต่อระดับแคลเซียมในเซลล์โดยการวัดระดับแอกติวิตีของเอนไซม์ β -Galactosidase

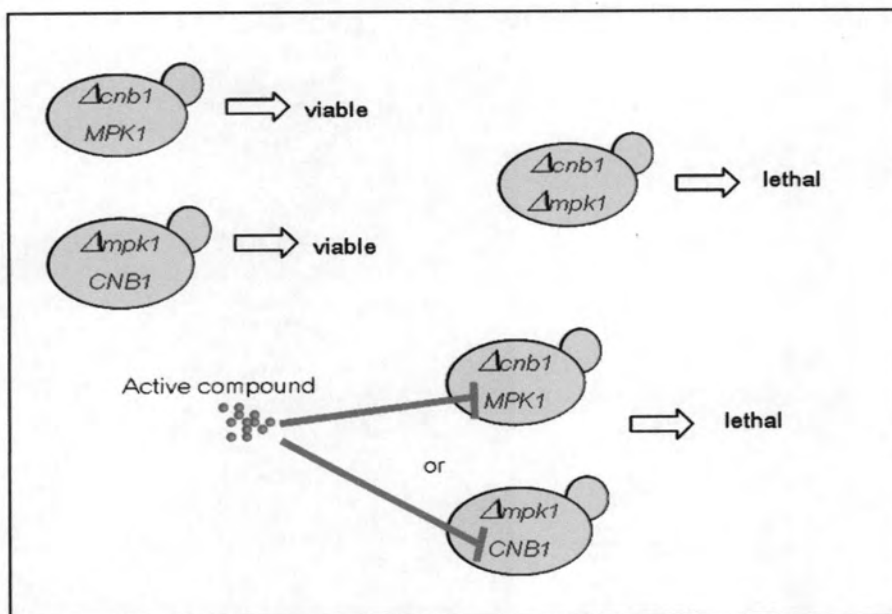
สภาวะในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงานผล	β -Galactosidase (U)
YPD	0.1
YPD+Ca ²⁺ (ชุดควบคุมผลลบ)	45.95 \pm 0.46
YPD+Ca ²⁺ +500 nm FK506 (ชุดควบคุมผลบวก)	0.1
YPD+Ca ²⁺ + 2 mM pinostrobin	45.81 \pm 0.21

หมายเหตุ ความไวของการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ β -galactosidase โดยวิธีนี้อยู่ที่ 0.1 ยูนิต

4.4.2 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อ Mpk1 และ Calcineurin

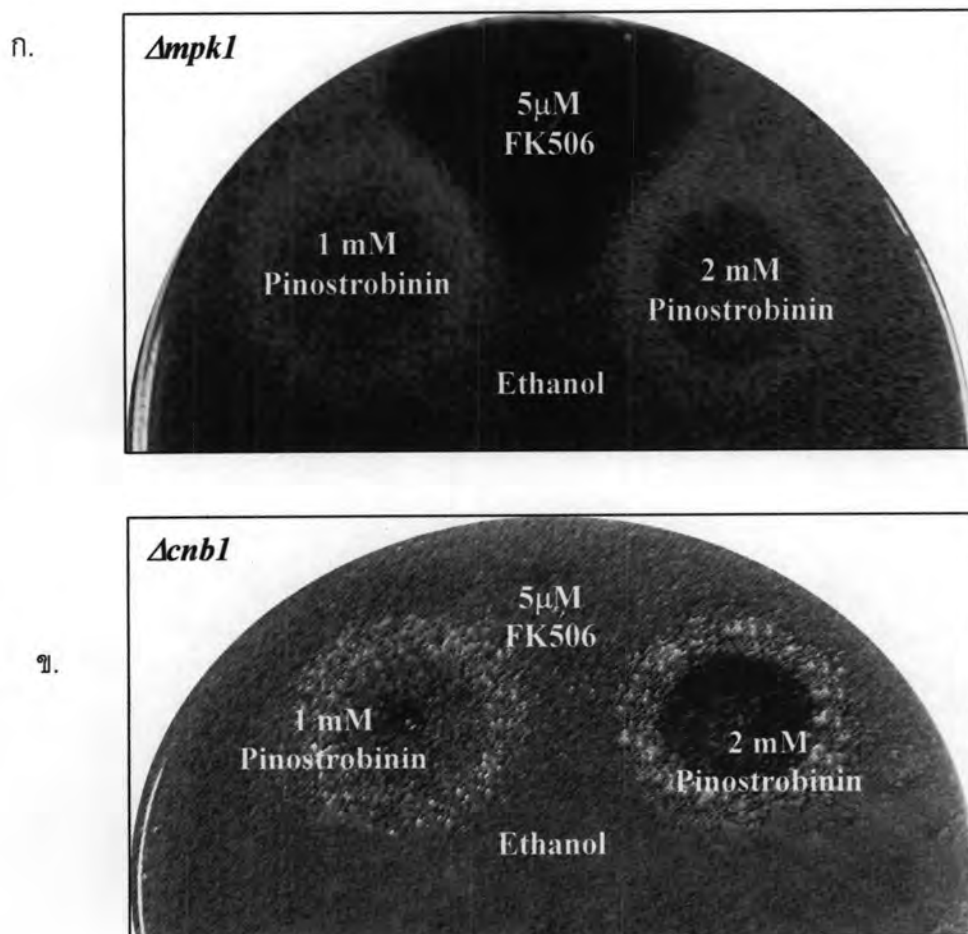
จากการตรวจสอบพบว่า pinostrobin ไม่มีผลต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์ (ตารางที่ 4.3) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาว่า pinostrobin มีผลยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์ โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Mpk1 หรือ Calcineurin หรือไม่ โดยอาศัยหลักการที่เมื่อ calcineurin หรือ mpk1 สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ เซลล์ยังสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะปกติ แต่การสูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ทั้งสองวิถี จะทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้ (lethal phenotype) สาเหตุหลักเกิดจากการบกพร่องของ cell wall integrity(Nakamura และคณะ , 1996)

การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน Mpk1 หรือ Calcineurin ทำโดยทดสอบสาร pinostrobin กับยีสต์สายพันธุ์ $\Delta cnb1$ และ $\Delta mpk1$ ตามลำดับ ถ้าสาร pinostrobin สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin ในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta cnb1$ และ $\Delta mpk1$ ตามลำดับ จะทำให้เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้เพราะสูญเสียการทำงานทั้งสองวิถีดังรูปที่ 4.11 ดังเช่นในชุดควบคุมผลบวก FK506 ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ Calcineurin ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์สามารถทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mpk1$ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จากผลการทดลองในรูปที่ 4.11 พบว่าบริเวณที่หยดสาร pinostrobin ไม่เกิดเป็น clear zone ทั้งสองสายพันธุ์ จากผลการทดลองนี้แสดงว่า pinostrobin ไม่ได้ยับยั้งการทำงานของทั้ง calcineurin และ mpk1



รูปที่ 4.11 หลักการของการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน Mpk1 หรือ Calcineurin โดยใช้หลักการเกิด synthetic lethality

หนึ่งในการทดลองนี้มีชุดควบคุมผลบวกที่ใช้ FK506 ในการทดลองที่ใช้สายพันธุ์ $\Delta mpk1$ เป็นเซลล์บ่งชี้การทดลองเดี่ยวเท่านั้น แต่ไม่มีชุดควบคุมผลบวกในชุดการทดลองที่ใช้สายพันธุ์ $\Delta cnb1$ ซึ่งต้องใช้สารยับยั้งโปรตีน Mpk1 เนื่องจากยังไม่สามารถหายยับยั้งโปรตีน Mpk1 ของยีสต์ได้ในปัจจุบัน



รูปที่ 4.12 ผลการทดสอบของ pinostrobin ที่มีต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย

ก. ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δmpk1*

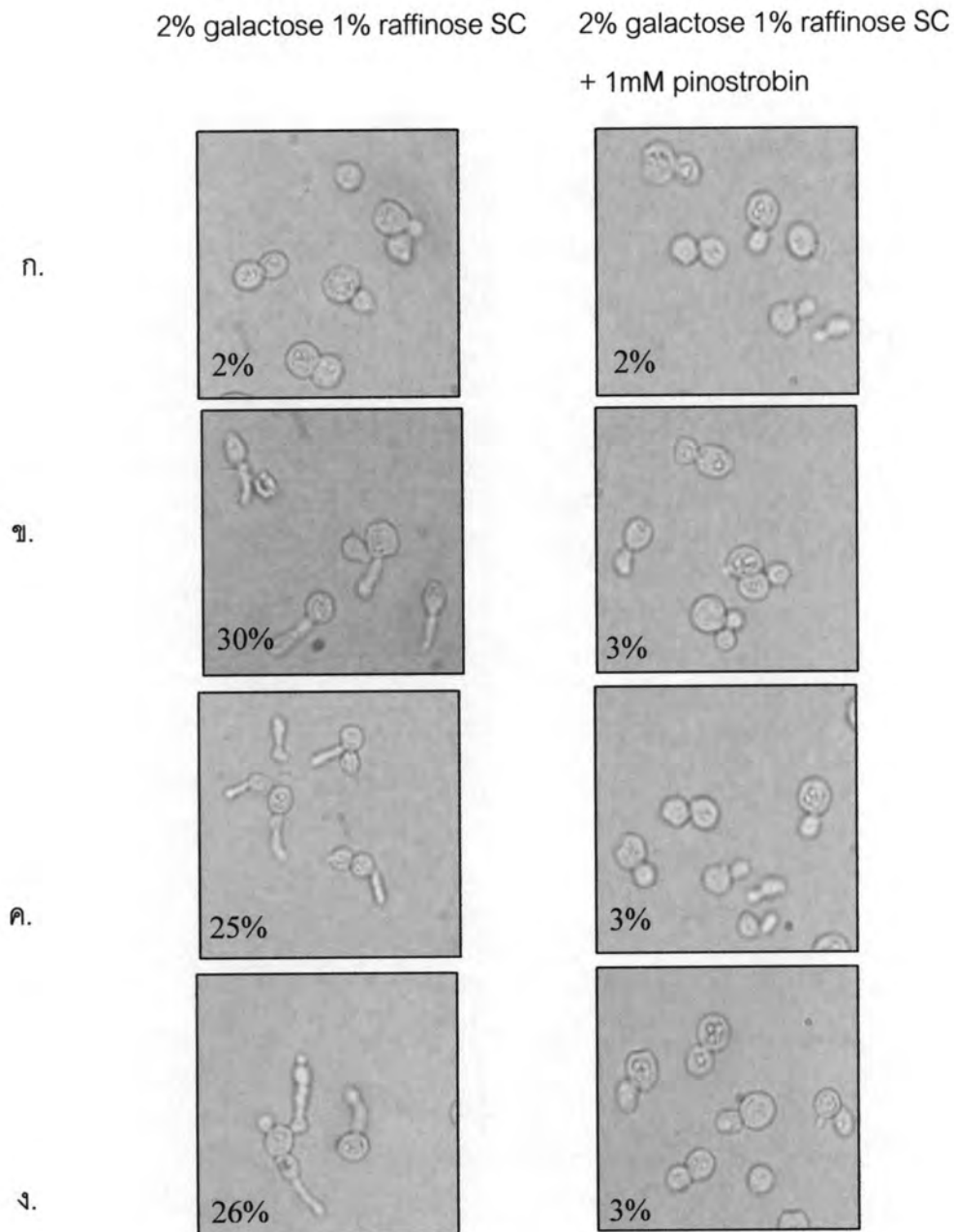
ข. ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δcnb1*

4.4.3 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในช่วง downstream จาก Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1

เนื่องจากการทดลองข้างต้นพบว่าการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของ pinostrobin ไม่ได้เป็นเพราะยับยั้งการทำงานของ calcineurin หรือ mpk1 (รูปที่ 4.12) รวมทั้งไม่ได้ควบคุมระดับหรือการทำงานของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์(ตารางที่ 4.3) ในการทดลองนี้ จึงทำการศึกษาถึงผลของสาร pinostrobin ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในช่วง downstream จาก Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1 เมื่อทำให้มีการแสดงออกมากเกินไป ของยีน *MPK1, MCK1* หรือ *CMPΔ2C* ภายใต้การควบคุมของ promoter ของยีน *GAL1* (ที่อยู่ในพลาสมิด pYES2) โดยทำการชักนำพลาสมิดต่างๆเหล่านี้ตามลำดับเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δ zds1*

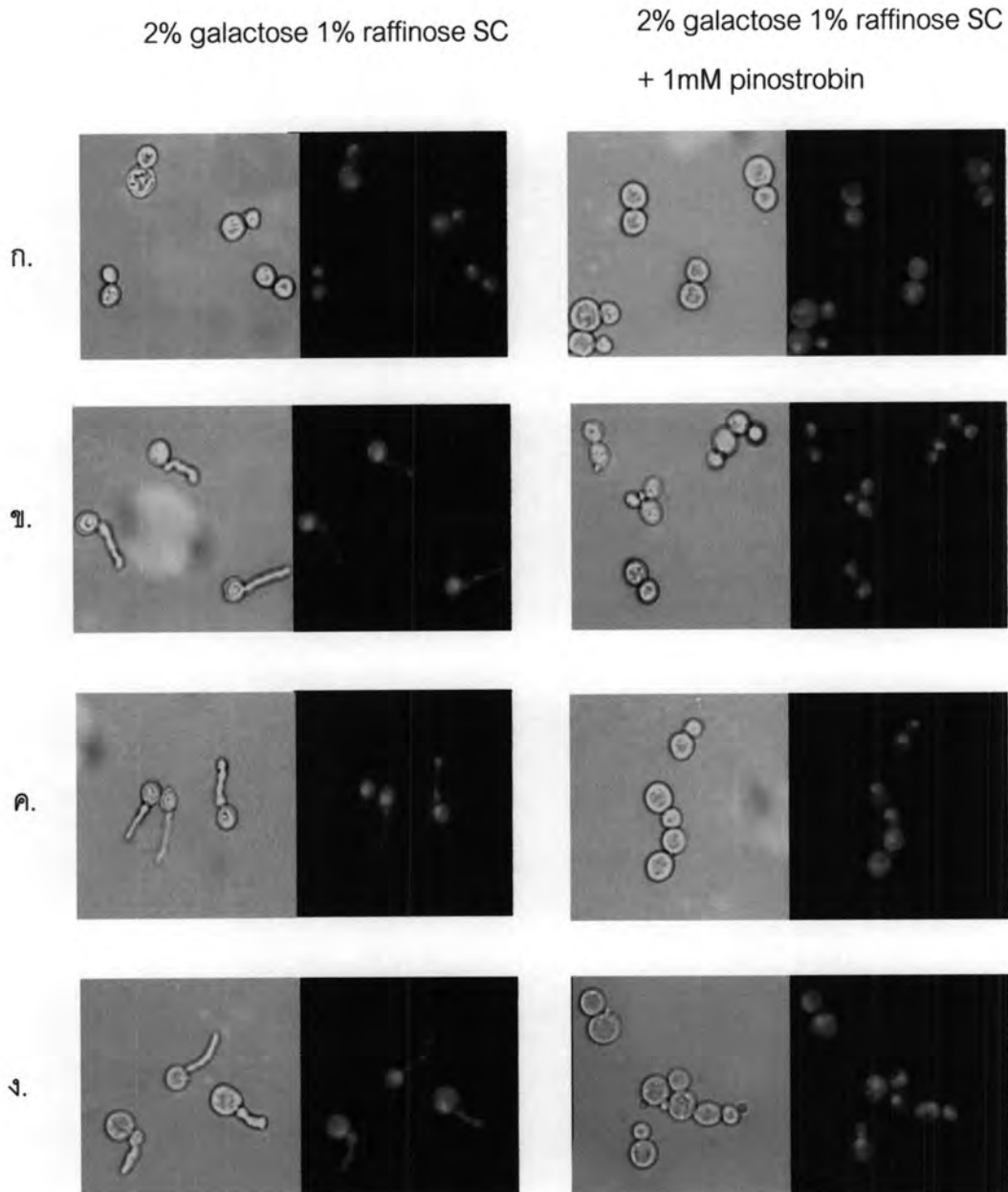
ถ้ามีการกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีนเป้าหมายจะทำให้เกิดลักษณะของการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่ผิดปกติ กล่าวคือการแตกหน่อมีลักษณะยืดยาวออกมา (elongated bud) ดังรูปที่ 4.13 (ข.ค.ง. แถวซ้าย) และเกิดการชะลอระยะการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 (G2 delay) โดยดูได้จากการย้อมดีเอ็นเอในนิวเคลียสด้วยสี Hoechst 33342 พบว่า ในยีสต์ที่มีการแตกหน่อส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ภายในเซลล์แม่ (mother cell) ดังรูป 4.14 (ข.ค.ง. แถวซ้าย) แต่ถ้ามีการขัดขวางการส่งสัญญาณที่เกิดจากการทำให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีนใดยีนหนึ่งในทั้งสามยีนนี้ จะทำให้สามารถป้องกันการเกิดแตกหน่อที่มีลักษณะยืดยาว รวมทั้งเกิดการชะลอระยะการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 ได้ดังเช่น จากการศึกษาของ Mizunuma และ คณะ (2001) พบว่าการทำให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีน $CMP\Delta 2C$ ในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ $mck1-1$ สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแตกหน่อที่ผิดปกติได้ แต่การแสดงออกมากเกินไปของยีน $MPK1$ ไม่สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแตกหน่อที่ผิดปกติได้ เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ $mck1-1$ นี้เป็นสายพันธุ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน $MCK1$ ทำให้โปรตีน Mck1 ไม่สามารถทำงานได้ โปรตีน Mck1 เป็นโปรตีนที่อยู่ downstream ของโปรตีน Mpk1 ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม จึงทำให้สัญญาณที่เกิดจากการแสดงออกมากเกินไปของยีน $MPK1$ ในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ $mck1-1$ ถูกขัดขวาง ทำให้ไม่เกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติและการชะลอระยะการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 โดยผลการทดลองของการเติม pinostrobin ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ในสภาวะที่มีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายแสดงดังรูปที่ 4.13 และรูป 4.14 (ข.ค.ง. แถวซ้าย)

จากผลการทดลองในชุดการทดลองทั้งสามชุดที่มีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ $GAL1p-MPK1$, $GAL1p-MCK1$ และ $GAL1p-CMP\Delta 2C$ พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติม pinostrobin ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถป้องกันการเกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติของเซลล์ที่มีพลาสมิดซึ่งถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีนประมวลรหัส calcineurin, Mpk1 และ Mck1 ได้ดังรูปที่ 4.13 (ข.ค.ง. แถวขวา) รวมทั้งสามารถป้องกันการชะลอระยะการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 ได้ และยังพบว่าในเซลล์ที่มีการแตกหน่อ นิวเคลียสของเซลล์ดังกล่าวในชุดการทดลองนี้ยังสามารถแบ่งได้ตามปกติกล่าวคือมีการแบ่งนิวเคลียสไปยังเซลล์ลูกด้วย ดังรูป 4.14 (ข.ค.ง. แถวขวา) จากผลการทดลองนี้แสดงว่า pinostrobin สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณจากทั้ง Calcineurin Mpk1 และ Mck1 ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ ดังนั้นเป้าหมายในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมไม่ได้อยู่ในช่วงวิถีที่อยู่ downstream จาก Mpk1, Mck1 และ Calcineurin ถึง Hsl1 และ Swe1 ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 ลักษณะสัณฐานของยีสต์สายพันธุ์ $\Delta zds1$ ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพลาสมิดซึ่งอยู่ในเซลล์ด้วย galactose เป็นเวลา 10 ชั่วโมงโดยที่รูปทางขวามีการเติม pinostobin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ตัวเลขด้านล่างซ้ายของภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อที่ผิดปกติ (Elongated bud)

- ก. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2
- ข. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2 ซึ่งแทรกด้วย $GAL1p-CMP\Delta 2C$
- ค. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2 ซึ่งแทรกด้วย $GAL1p-MPK1$
- ง. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2 ซึ่งแทรกด้วย $GAL1p-MCK1$



รูปที่ 4.14 ลักษณะการแบ่งนิวเคลียสภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ของยีสต์สายพันธุ์ $\Delta zds1$ ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพลาสมิดซึ่งอยู่ในเซลล์ด้วย galactose เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยที่รูปทางขวามีการเติม pinostrobin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์

- ก. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2
- ข. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2 ซึ่งแทรกด้วย $GAL1p-CMP\Delta 2C$
- ค. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2 ซึ่งแทรกด้วย $GAL1p-MPK1$
- ง. ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่มีพลาสมิด pYES2 ซึ่งแทรกด้วย $GAL1p-MCK1$