

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 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย

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	ผลการทดสอบโดย ระบบยีสต์
Caesalpiniaceae	CGA	<i>Cassia garrettiana</i>	-
	CSA	<i>Caesalpinia sappan</i> Linn.	-
Caesalpiniaceae	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>Vernonia cinerea</i> Less.	-
Cucurbitaceae	GIN	<i>Gymnopetalum integriforium</i> Kurz.	-
Cucurbitaceae	MCH	<i>Momordica charantia</i> L.	-
	MOCO	<i>Momordica cochinchensis</i> (Lour.) Spreng.	-
Dioscoreaceae	DHI	<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.	-

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย(ต่อ)

ชื่อวงศ์	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	ผลการทดสอบโดย ระบบยีสต์
Euphorbiaceae	BMO	<i>Baliospermum montanum</i>	-
Euphorbiaceae		Muell. Arg.	
	BOV	<i>Bridelia ovata</i> Decne	-
	COR	<i>Cladogynos orientalis</i> Zipp.ex Span.	-
	CTIG	<i>Croton tigilium</i> Linn.	-
	EHI	<i>Euphorbia hirta</i>	-
	ECO	<i>Excoecarice cochinueuse</i>	-
	GMU	<i>Gelonium multiflorum</i> A. Juss.	-
	COB	<i>Croton</i> <i>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	ผลการทดสอบโดย ระบบยีสต์
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	ผลการทดสอบโดย ระบบยีสต์
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 glabara</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	ผลการทดสอบโดย ระบบยีสต์
Sonneratiaceae	SOV	<i>Sonnertia ovata</i> Back.	-
Sterculiaceae	AAU	<i>Abroma augusta</i> Linn.f.	-
	SMA	<i>Scaphium macropodum</i> <i>Beaume</i>	-
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 kervanh</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) กระชายเหลืองป็นพืชที่พบได้ในครัวเรือนและเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณด้านอีกเสบที่สารสกัดอย่างหยาบจากฟ้าทลายโจร (*Andrographis paniculata*, APA) ฟ้าทลายโจรเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย

ฟ้าทลายโจรอยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Nees (รูปที่ 4.1) ฟ้าทลายโจรนับเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันมากในประเทศไทย จีน อินเดีย และ ชาวไทยมีสรรพคุณหลายหลายเช่น 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-dehydroandrographolide and 14-deoxy-11,14-didehydro-andrographolide (Honssain และคณะ, 2007)



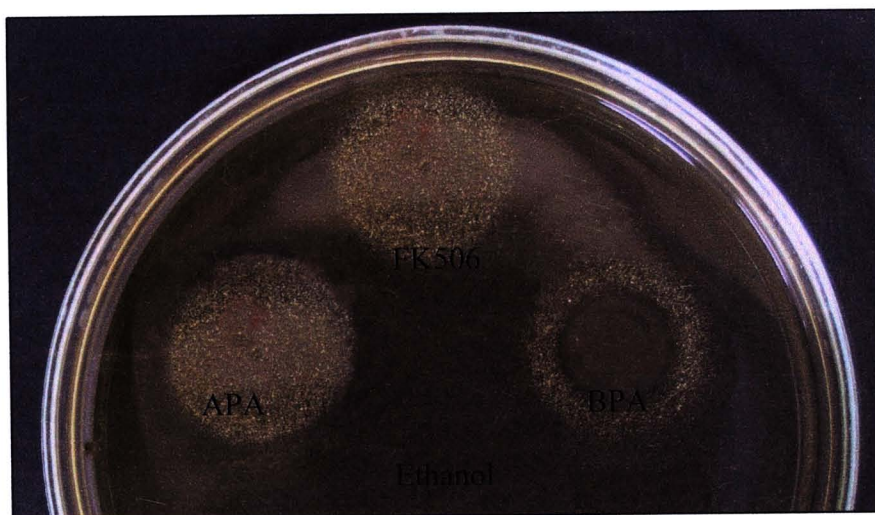
รูปที่ 4.1 ฟ้าทลายโจร *Andrographis paniculata*

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 (จาวร้อยละ 1-3) น้ำมันหอมระเหยของกระชายเหลืองประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด เช่น 1, 8-cineol, camphor, d-borneol และ methyl cinnamate น้ำมันหอมระเหยที่พบส่วนน้อย ได้แก่ d-pinene, zingiberene, zingiberone, curcumin และ zedoarin นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ได้แก่ กลุ่มไดไฮโดรซาลิโคน boesenbergin A กลุ่ม ฟลาโวน, ฟลาโวนิน และฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ alpinetin, pinostrobin) และ pinocembrin และกลุ่มซาลิโคน (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*

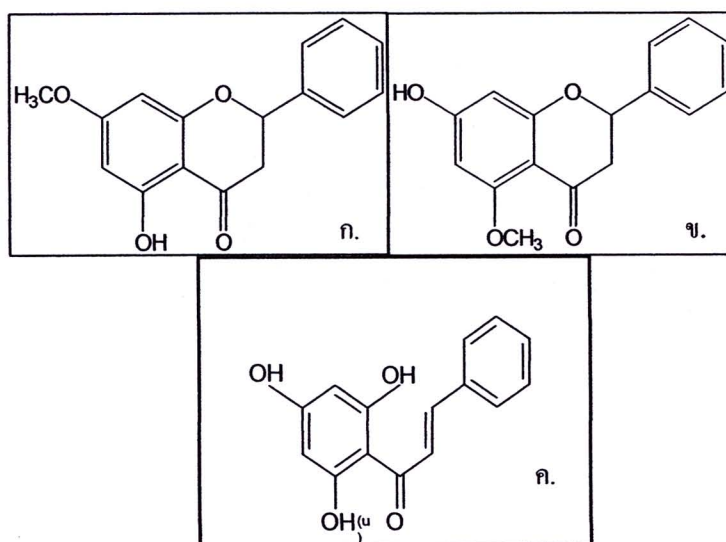
ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่ากระชายเหลือง มีสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีผลยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ใช้เป็นเซลล์บ่งชี้ในระบบคัดกรองนี้ และลักษณะของผลบวกที่ได้แสดงการเจริญแบบวงแหวน ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าอาจเกิดได้จากสองสาเหตุคือ มีสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อเซลล์ยีสต์มากกว่าหนึ่งชนิดและหนึ่งในนั้นเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และยังมีสารชนิดอื่นที่มีผลยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมทำให้เกิดการเจริญรอบนอก ส่วนอีกสาเหตุหนึ่งคือเนื่องสารออกฤทธิ์ที่ได้นั้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูง แต่ถ้าความเข้มข้นลดลงจะสามารถยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้เพราะการหยุดการทดสอบโดยตรงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะทำให้บริเวณตรงกลางของหยดมีความเข้มข้นสูงและเมื่อสารแพร่ออกจากจุดศูนย์กลางออกไปจะทำให้ความเข้มข้นของสารบริเวณรอบนอกลดลง เป็นผลให้เห็นการเจริญแบบวงแหวน และเพื่อยืนยันผลบวกทั้งสองที่ได้นี้จึงทำการทดสอบตัวอย่างสารสกัดอย่างหยาบช้าและหาวัตถุบิใหม่เพื่อมาสกัดสารสกัดอย่างหยาบและทดสอบโดยระบบยีสต์ข้างต้น



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

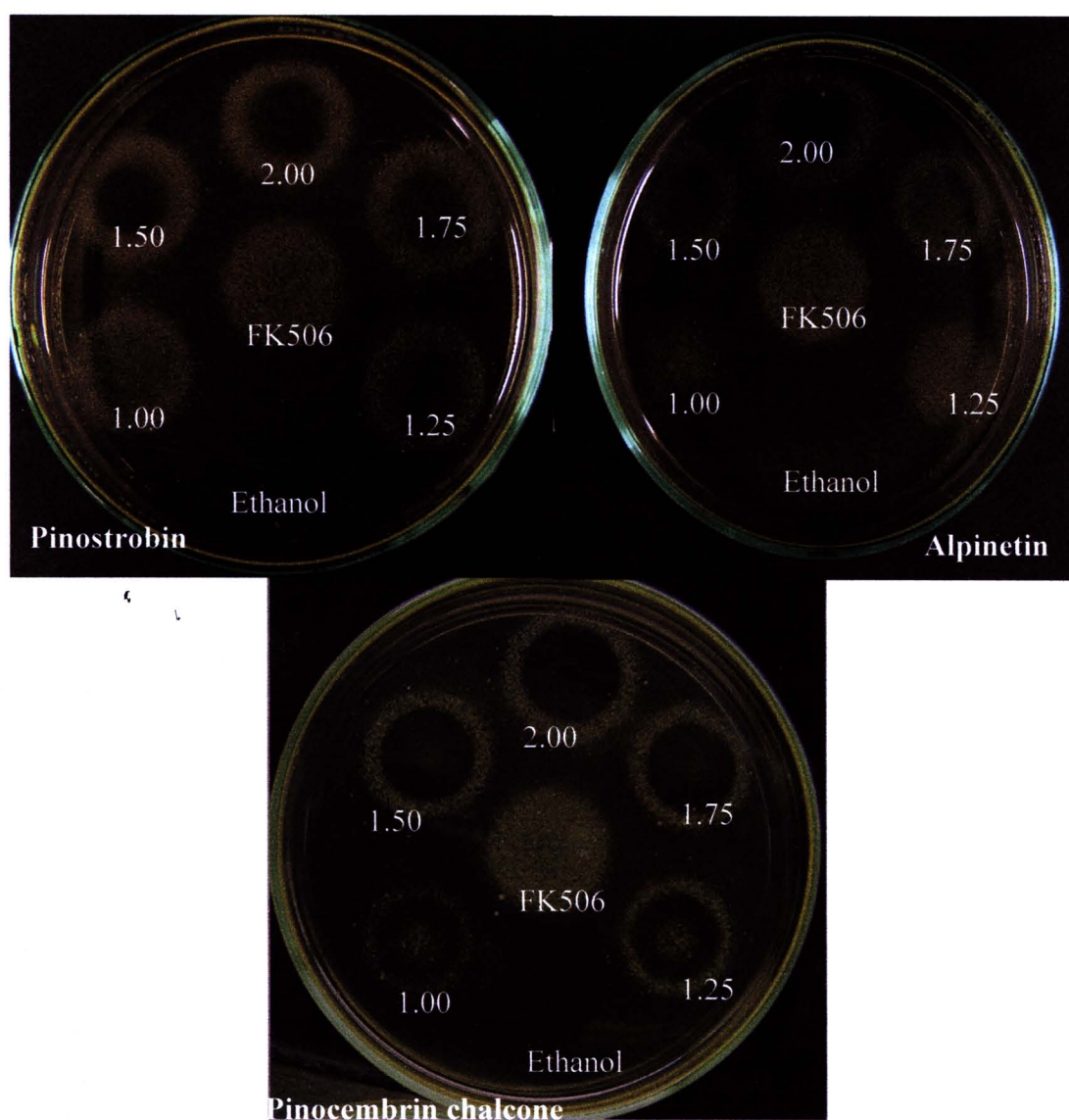
4.2 ทดสอบระดับแอคติวิตีของสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกโดยระบบยีสต์

จากงานวิจัยของ นางสาวสายพิน บุญเกิด(ยังไม่ได้ตีพิมพ์) พบว่าจากการแยกสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลืองให้เป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีและการตกผลึก รวมทั้งทำการติดตามฤทธิ์ของสารที่แยกได้แต่ละส่วนย่อยโดยใช้ระบบยีสต์ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกได้ 3 ชนิด โดยเมื่อนำไปหาโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่อง NMR ดังแสดงในรูป 4.4 และเปรียบเทียบสูตรโครงสร้างของสารที่ได้กับรายงานที่ผ่านมาของ 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 นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายเหลืองถูกนำมาหาระดับแอคติวิตีโดยระบบยีสต์ โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.5 จากผลการทดลองพบว่าสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกเรียงจากมากไปน้อย คือ pinostrobin, Alpinetin และ pinocembrin chalcone ตามลำดับ โดยผลจากการทดสอบในระบบยีสต์พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ให้ผลการเจริญในลักษณะวงแหวนที่ความเข้มข้นสูงและลักษณะการเจริญปกติที่ความเข้มข้นต่ำลงมา แสดงว่าสารเหล่านี้ที่ความเข้มข้นสูงๆจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์และที่ค่าความเข้มข้นน้อยๆจะยับยั้งวิถีแคลเซียม



รูปที่ 4.5 ผลของการทดสอบด้วยระบบยีสต์ของ pinostrobin, alpinetin, pinocembrin chalcone ที่คัดกรองได้จากกระชายเหลืองที่ค่าความเข้มข้นต่างๆในหน่วยมิลลิโมลาร์ โดยใช้ FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์และ ethanol เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ

4.3 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของสารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จากระบบยีสต์โดย Flow cytometry และลักษณะการแตกหน่อของยีสต์

เนื่องจากการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย *Azds1* มีผลทำให้เกิดการชะลอหรือหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G2 และเกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติ(ส่วนที่แตกหน่อออกมามีลักษณะยืดยาว)(Shitamukai และคณะ, 2000) สารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จาก

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

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์

ความเข้มข้น	ผลการทดสอบโดยระบบยีสต์		
	Pinostrobin	Alpinetin	Pinocembrin 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 +++

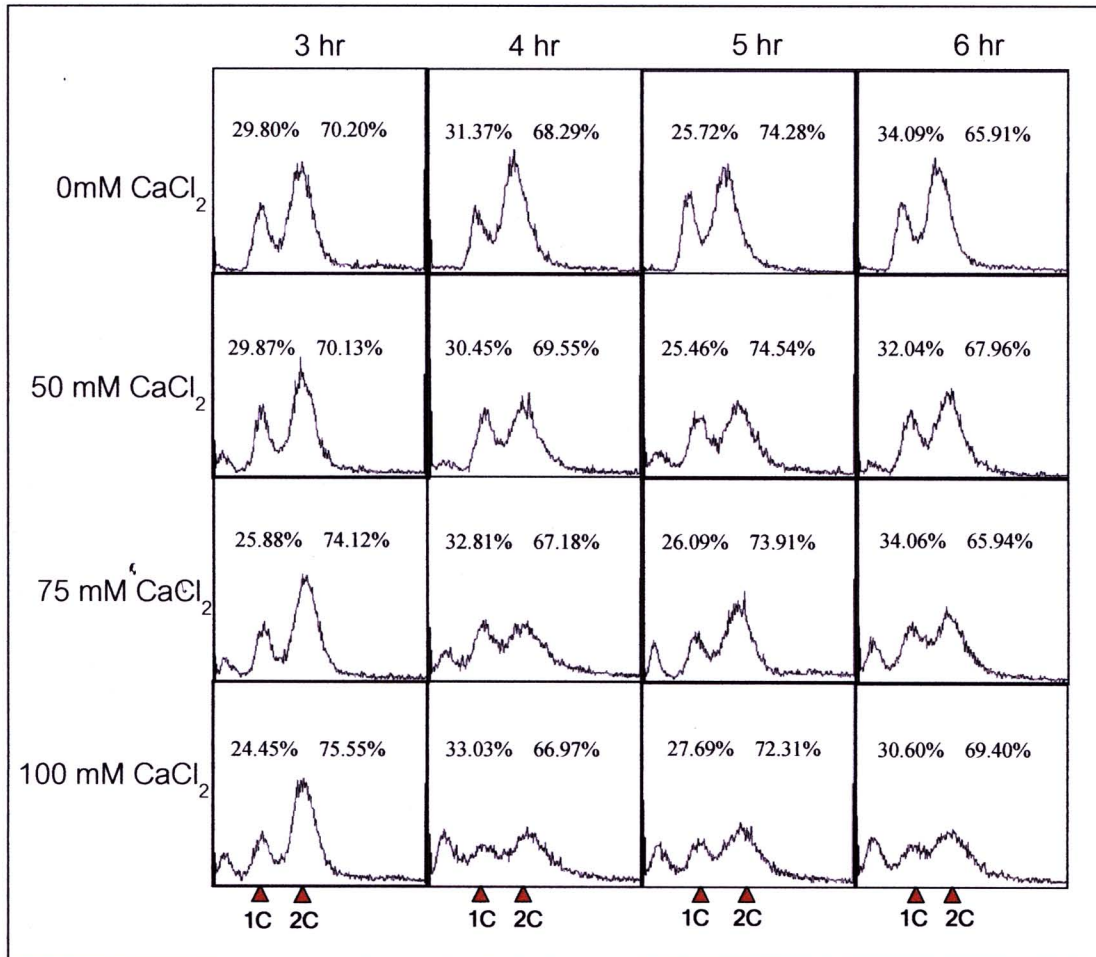
ระบบยีสต์นั้นสามารถยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* ได้ ดังนั้นสารออกฤทธิ์ที่ได้นี้ จะสามารถยับยั้งการเกิดการชะลอหรือหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะ G2 และยับยั้งการแตกหน่อที่ผิดปกติของยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* ได้ การตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์สามารถทำได้โดยการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ 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 *Δzds1* โดยเครื่อง Flow cytometry

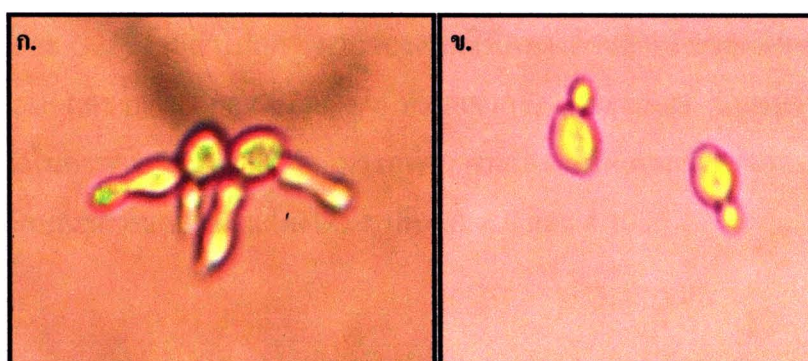
เพื่อตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* โดยการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์โดยเครื่อง Flow cytometry จึงได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยการแปรผันตัวแปรต่างๆ ได้แก่ ค่าความเข้มข้นของ CaCl_2 (50-100 มิลลิโมลาร์) และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มภายหลังการเติม CaCl_2 (3-6 ชั่วโมง) โดยเลือกจากลักษณะผลการทดลองดังนี้

- ก. ในสภาวะที่เติมแคลเซียมมีปริมาณเซลล์ที่มีดีเอ็นเอเป็นหนึ่งเท่า (พีค 1C) น้อยกว่าในสภาวะที่ไม่เติม CaCl_2
- ข. ในสภาวะที่เติมแคลเซียมการแตกหน่อของเซลล์จะมีลักษณะยืดยาวออกส่วนสภาวะที่ไม่มีการเติมแคลเซียมการแตกหน่อจะมีลักษณะปกติ (ทรงกลมหรือรีเล็กน้อย)

ผลของการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์โดย flow cytometry และลักษณะของการแตกหน่อ แสดงอยู่ในรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 Flow cytometry profile ของเซลล์ยีสต์ที่ถูกกระตุ้นวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมด้วย CaCl_2 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

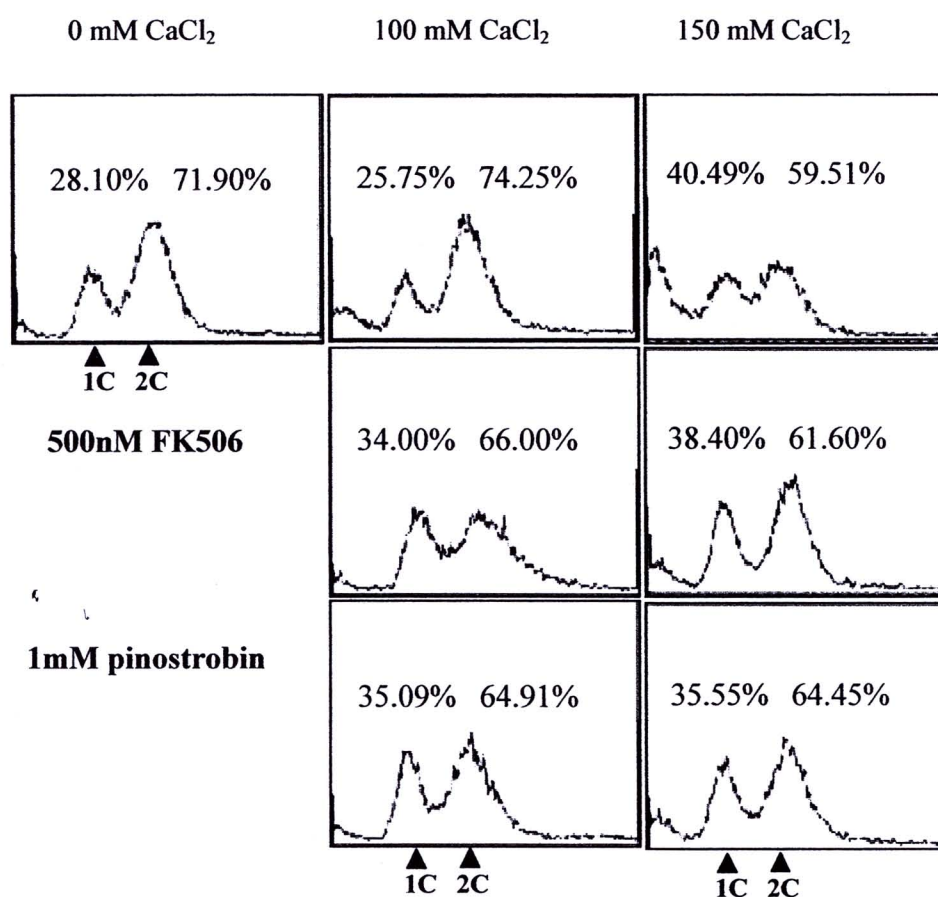
ก. แสดงลักษณะการแตกหน่อภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย CaCl_2 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ข. แสดงแสดงลักษณะการแตกหน่อในสภาวะปกติ(ไม่มีการเติม CaCl_2)

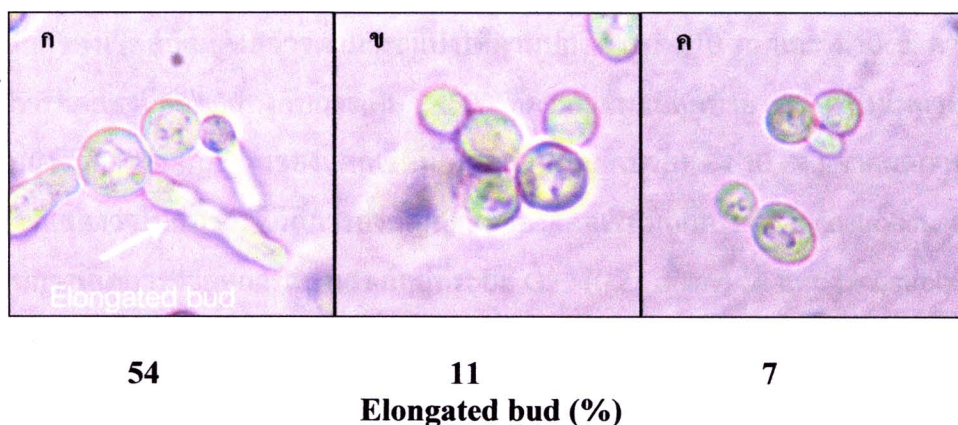
จาก Flow cytometry profile และสัญญาณวิทยาของการแปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 และเวลาที่กระตุ้นวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียม พบว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบระยะเวลาการแบ่งเซลล์โดยเครื่อง flow cytometry คือ CaCl_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์ และบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยพบว่าในสภาวะที่มีการกระตุ้นการส่งสัญญาณแคลเซียมด้วยคือ 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 *Δzds1*

การทดลองนี้ใช้ค่าที่เหมาะสมของความเข้มข้นของ CaCl_2 และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่หาได้จากการทดลองที่ 4.4.1 เพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมของ pinostrobin ที่แยกได้จากกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*) ซึ่งคัดกรองและติดตามโดยระบบยีสต์จากข้อ 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 CaCl_2 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ และมี FK506 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนโมลาร์เป็นตัวควบคุมผลบวก



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

ก แสดงลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแคลเซียมและไม่มีการเติมสารบริสุทธิ์ pinostrobin (ชุดควบคุมผลลบ)

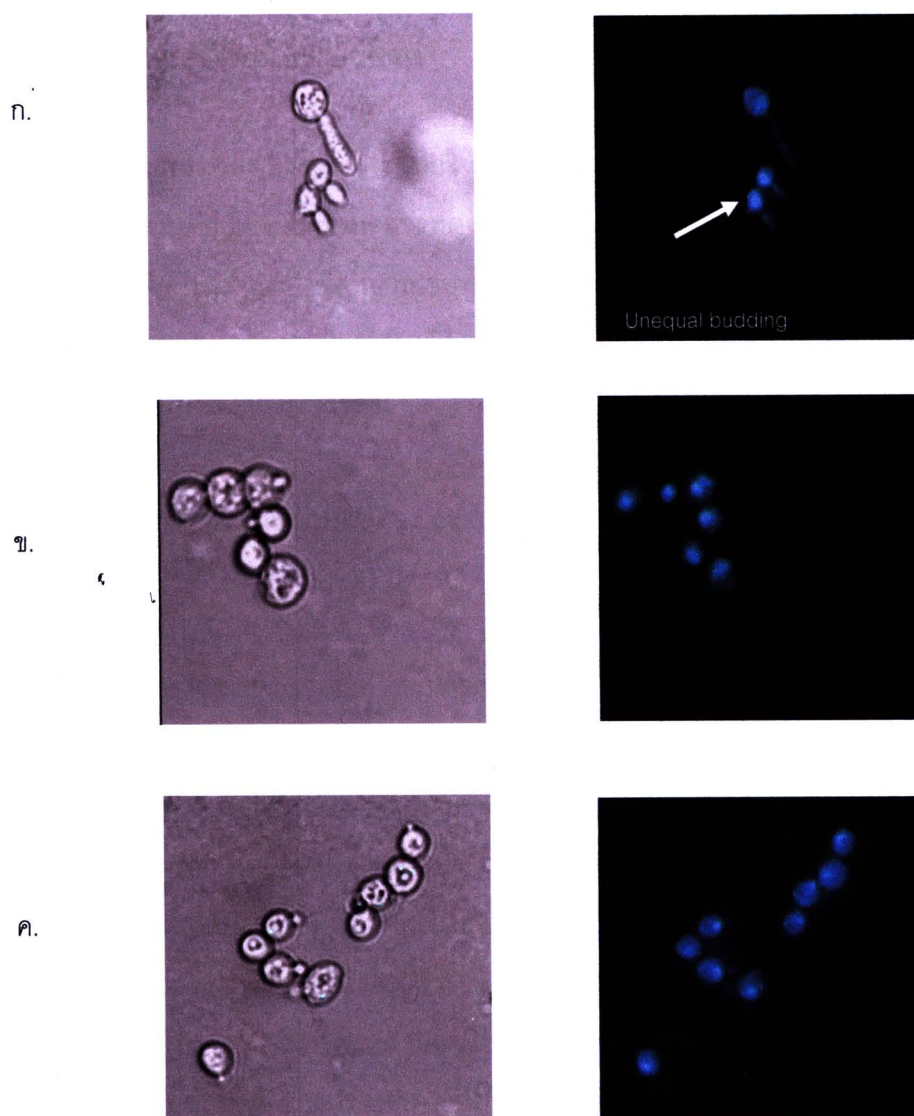
ข แสดงลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์เมื่อถูกกระตุ้นโดยแคลเซียมและมีการเติมสารบริสุทธิ์ pinostrobin ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์

ค แสดงลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์ที่มีการเติม FK506 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 นาโนโมลาร์ (ชุดควบคุมผลบวก)

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

จากผลการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ในยีสต์สายพันธุ์ถูกทำลาย $\Delta zds1$ และลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ภายใต้สภาวะที่วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมถูกกระตุ้น 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 การทดลองต่อไปจะทำการตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของ pinostrobin ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์โดยวิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์ เพื่อศึกษาถึงผลของ 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) การวัดระดับการแสดงออกของยีนรายงานผลทำได้โดยวัดแอกติวิตี้ของเอนไซม์ β -galactosidase ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4.3 พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวในสถานะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงนั้น ในชุดการทดลองที่มีการเติม pinostrobin พบว่าแอกติวิตี้ของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมผลลบ สำหรับชุดควบคุมผลลบที่ใช้ FK506 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง calcineurin ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์พบว่าแอกติวิตี้ของเอนไซม์อยู่ในระดับที่ต่ำจนไม่สามารถวัดได้โดยวิธีนี้ จากผลการทดลองนี้แสดงว่า pinostrobin ไม่มีผลต่อระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์

ตารางที่ 4.3 ผลของ pinostrobin ต่อระดับแคลเซียมในเซลล์โดยการวัดระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ β -Galactosidase

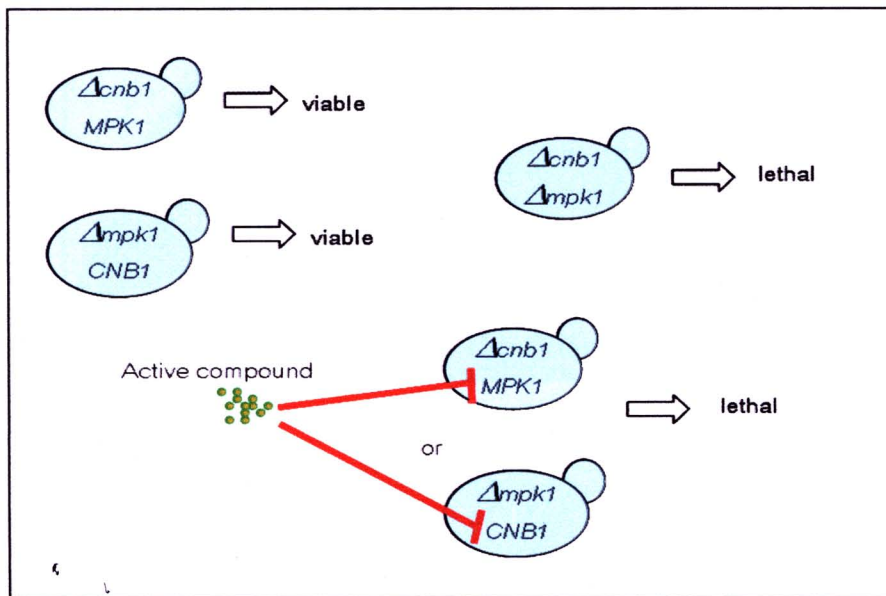
สภาวะในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงานผล	β -Galactosidase (U)
YPD	0.1
YPD+Ca ²⁺ (ชุดควบคุมผลลบ)	45.95 $\pm$ 0.46
YPD+Ca ²⁺ +500 nm FK506 (ชุดควบคุมผลบวก)	0.1
YPD+Ca ²⁺ + 2 mM pinostrobin	45.81 $\pm$ 0.21

หมายเหตุ ความไวของการตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ β -galactosidase โดยวิธีนี้อยู่ที่ 0.1 ยูนิต

4.4.2 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อ Mpk1 และ Calcineurin

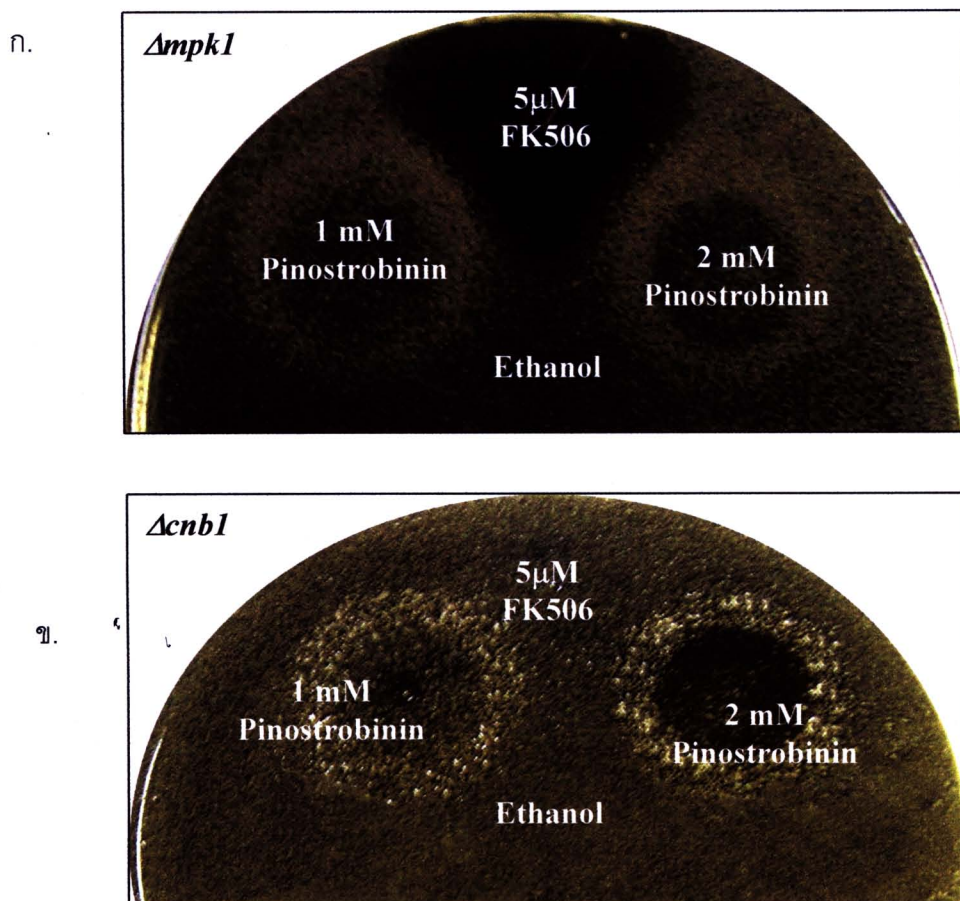
จากการตรวจสอบพบว่า pinostrobin ไม่มีผลต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์ (ตารางที่ 4.3) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาว่า pinostrobin มีผลยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Mpk1 หรือ Calcineurin หรือไม่ โดยอาศัยหลักการที่เมื่อ calcineurin หรือ mpk1 สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่เซลล์ยังสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะปกติ แต่การสูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ทั้งสองวิถีจะทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้ (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 จะทำให้เซลล์ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้เพราะสูญเสียการทำงานทั้งสองวิธิดังรูปที่ 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

อนึ่งในการทดลองนี้มีชุดควบคุมผลบวกที่ใช้ FK506 ในการทดลองที่ใช้สายพันธุ์ $\Delta mpk1$ เป็นเซลล์บ่งชี้การทดลองเดียวกัน แต่ไม่มีชุดควบคุมผลบวกในชุดการทดลองที่ใช้สายพันธุ์ $\Delta cnb1$ ซึ่งต้องใช้สารยับยั้งโปรตีน Mpk1 เนื่องจากยังไม่สามารถหายายับยั้งโปรตีน Mpk1 ของยีสต์ได้ในปัจจุบัน



รูปที่ 4.12 ผลการทดสอบของ pinostrobin ที่มีต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย

ก. ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δmpk1*

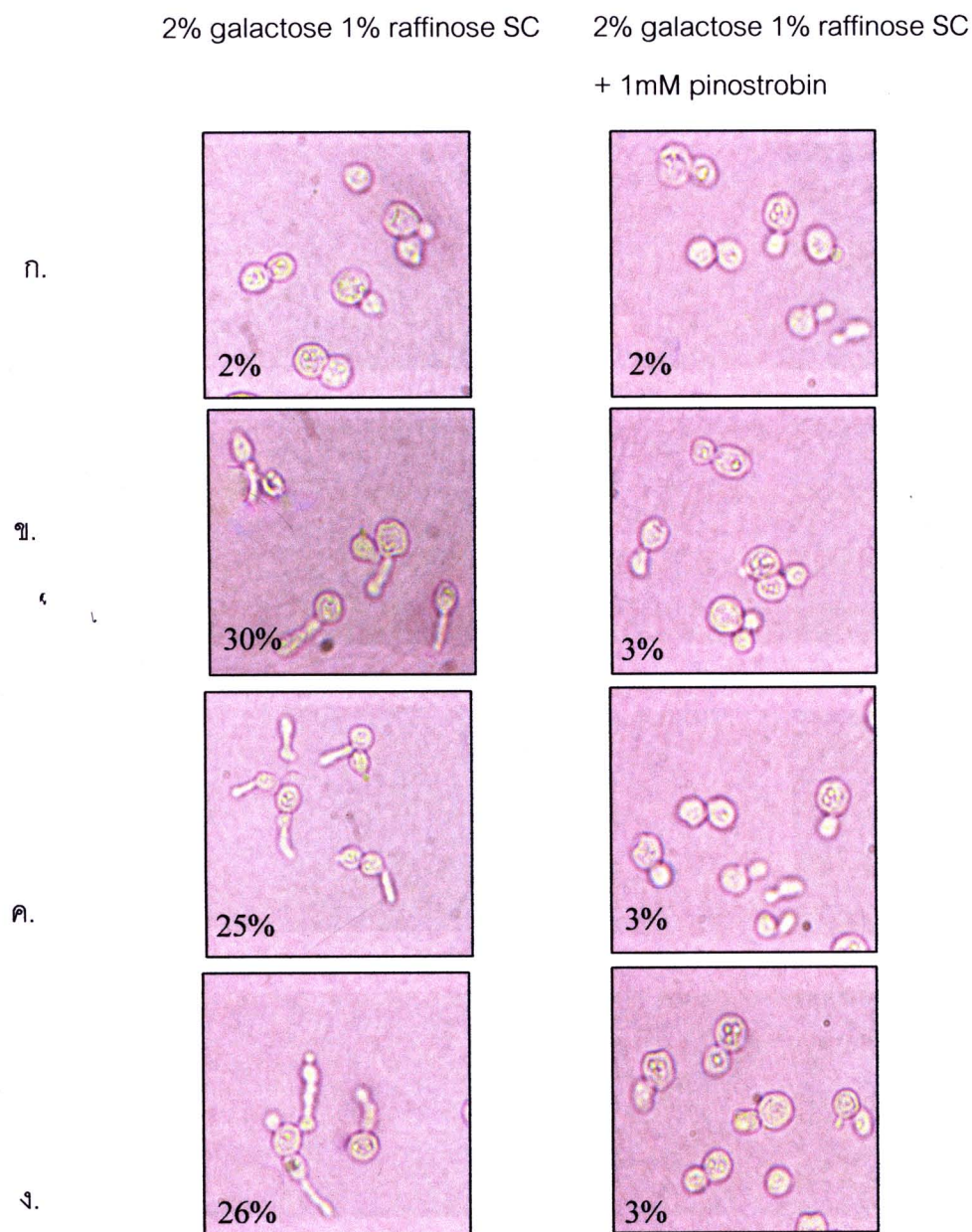
ข. ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δcnb1*

4.4.3 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในช่วง downstream จาก Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1

เนื่องจากการทดลองข้างต้นพบว่าการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของ pinostrobin ไม่ได้เป็นเพราะยับยั้ง การทำงานของ calcineurin หรือ mpk1 (รูปที่ 4.12) รวมทั้ง ไม่ได้ควบคุมระดับหรือการทำงานของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์(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 *Δzds1*

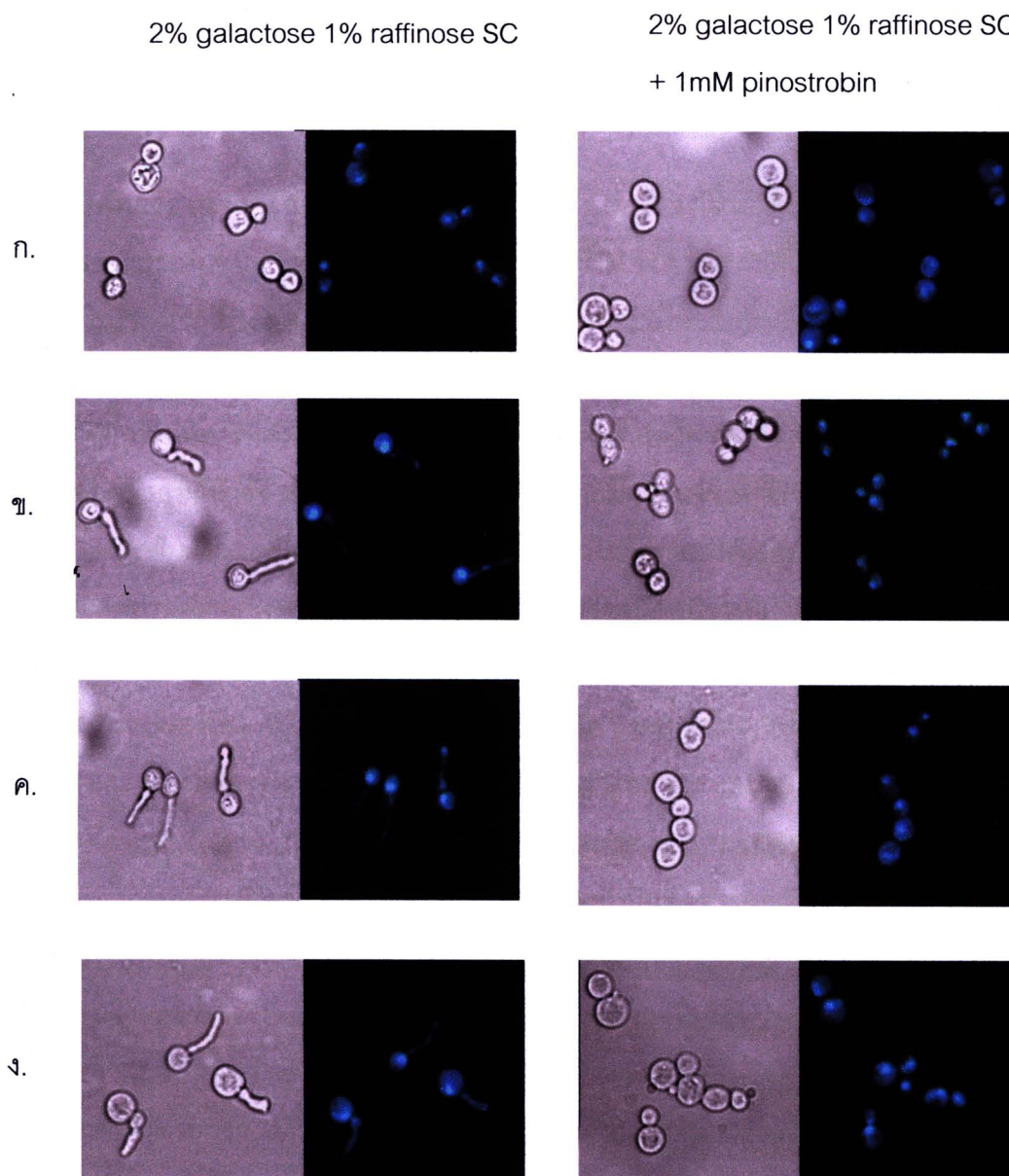
ถ้ามีการกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากเกินไปของยีนเป้าหมายจะทำให้เกิดลักษณะของการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่ผิดปกติ กล่าวคือการแตกหน่อมีลักษณะยืดยาวออกมา (elongated bud) ดังรูปที่ 4.13 (ข.ค.ง. แถวซ้าย) และเกิดการชะลอระยะการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 (G2 delay) โดยดูได้จากการย้อมดีเอ็นเอในนิวเคลียสด้วยสี Hoechst 33342 พบว่าในยีสต์ที่มีการแตกหน่อส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ภายในเซลล์แม่ (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 $GAL1p-CMP\Delta2C$
- 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 pinostobin 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 $GAL1p-MCK1$