



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการสร้างระบบยีสต์ทูไฮบริดสำหรับศึกษาไฟโตเอสโตรเจนในพืชสมุนไพรไทย

Construction of Yeast two hybrid system to study phytoestrogen of Thai medicinal plants

โดย ผศ.ดร. สนิทนาถ ศิริ และคณะ

กรกฎาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการสร้างระบบยีสต์ทูไฮบริดสำหรับศึกษาไฟโตเอสโตรเจนในพืชสมุนไพรไทย

Construction of Yeast two hybrid system to study phytoestrogen of Thai medicinal plants

ผศ.ดร. สีนินาฏ สิริ (นักวิจัย) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร. สมเดช กนกเมธากุล (นักวิจัยพี่เลี้ยง) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง “การสร้างระบบยีสต์ทูลไฮบริดสำหรับศึกษาโฟโตเอสโตรเจนในพืชสมุนไพรไทย” ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (MRG5080179) ตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2550 (2 กรกฎาคม 2550 – 1 กรกฎาคม 2552) ซึ่งผู้วิจัยต้องขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ ตลอดจนขอขอบคุณนักวิจัยพี่เลี้ยง (รศ.ดร. สมเดช กนกเมธากุล) ที่ให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยนี้

ผู้วิจัย

ผศ.ดร. สีนินาฏ ศิริ

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	ฉ
คำสำคัญ	ช
บทที่ 1 หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เอสโตรเจน	3
2.2 ไฟโตเอสโตรเจน	5
2.3 พืชที่มีไฟโตเอสโตรเจนหรือสรรพคุณที่เกี่ยวข้อง	8
2.4 การตรวจวัดสารที่มีเอสโตรเจน	11
2.5 ยีสต์ทูไฮบริด	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย	17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	
4.1 การสกัด RNA จากเซลล์ MCF7	21
4.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR	22
4.3 การสร้างพลาสมิดลูกผสม	25
4.4 การเตรียมเซลล์ยีสต์ทูไฮบริด (พลาสมิด pGBKT7-ER α และ pGADT7-SRC1)	31
4.5 การทดสอบการตรวจวัดเอสโตรเจนของโคลนยีสต์ที่ได้	33
4.6 การเปรียบเทียบการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของ 17 β -estradiol ด้วย ยีสต์ทูไฮบริดและการวัดการเจริญของเซลล์ MCF-7	35
4.7 การเปรียบเทียบการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดรากสามสิบ และวุ้นหมามาเมดด้วยยีสต์ทูไฮบริดและการวัดการเจริญของเซลล์ MCF-7	37
4.8 การใช้ระบบยีสต์ทูไฮบริดที่ได้ในการทดสอบการวัดเอสโตรเจนแอก	45

	คดีวิบัติของสมุนไพรมีจำหน่ายบางชนิด	
Output ที่ได้จากโครงการ		72
เอกสารอ้างอิง		73

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 4.1	Total RNA บน 0.8% อะกาโรสเจลหลังเชื่อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์	21
รูปที่ 4.2	ผลการทำ RT-PCR โดยใช้ oligo dT (dT) และ random primers (RP) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนจีเอ็มเอของ ER α (1057 bp) ER β (868 bp) TIF2 (2010 bp) และ SRC1 (2614 bp)	24
รูปที่ 4.3	ผลการสกัดพลาสมิดจีเอ็มเอจากแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Kanamycin	26
รูปที่ 4.4	ผลของ PCR โดยใช้พลาสมิดจากแบคทีเรียเป็นจีเอ็มเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ER α และ ER β	26
รูปที่ 4.5	จีเอ็มเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pAT-ER β , pAT-SRC1 และ pAT-TIF2 สำหรับการ subclone เข้า pGBKT7 หรือ pGADT7	30
รูปที่ 4.6	การตรวจสอบพลาสมิด pGADT7-TIF2 (lane 1) และ pGADT7-SRC1 (lane 2) ด้วย plasmid specific primers	30
รูปที่ 4.7	การเพิ่มปริมาณจีเอ็มเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ T7 sequencing primer (forward primer) – ER α primer (reverse primer)	32
รูปที่ 4.8	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^{-4} M โดยใช้ระบบยีสต์ทูไฮบริด	34
รูปที่ 4.9	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-12} – 10^{-4} M โดยวัดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ที่บ่มกับสารมาตรฐาน 17 β -estradiol เป็นเวลา 2 วัน	36
รูปที่ 4.10	ส่วน rhizomes ของต้นรากสามสิบ	38
รูปที่ 4.11	ส่วนหัวของว่านมหามง	38
รูปที่ 4.12	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากรากสามสิบที่ความเข้มข้น 10^{-8} – 10^{-3} g/ml โดยวัดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ที่บ่มกับสารสกัดหยาบจากรากสามสิบเป็นเวลา 2 วัน	40
รูปที่ 4.13	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากรากสามสิบที่ความ	41

	เข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	
รูปที่ 4.14	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-3}$ g/ml โดยวัดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ที่บ่มกับสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆเป็นเวลา 2 วัน	43
รูปที่ 4.15	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	44
รูปที่ 4.16	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากโกฐสอที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	54
รูปที่ 4.17	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากโกฐเขมาที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	56
รูปที่ 4.18	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากโกฐหัวบัวที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	58
รูปที่ 4.19	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากดอกคำฝอยที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	60
รูปที่ 4.20	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากหัวไชเท้าที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	62
รูปที่ 4.21	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของยาสมุนไพรรูปอูซึ่งที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	64
รูปที่ 4.22	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของยาสมุนไพรรูปอูซึ่งที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	66
รูปที่ 4.23	การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของยาสมุนไพรรักพิที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	68
รูปที่ 4.24	เปรียบเทียบเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบรากสามสิบ ว่านมหาเมฆ โกฐสอ โกฐเขมา โกฐหัวบัว และดอกคำฝอย ที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	70
รูปที่ 4.25	เปรียบเทียบเอสโตรเจนแอกติวิตีของยาสมุนไพรรูปอูซึ่ง ยาสมุนไพรรูปราบชมพูทวีป และยาสมุนไพรรักพิที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทุไฮบริด	71

บทคัดย่อ

ยีสต์ทูไฮบริดที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นเซลล์ยีสต์ Y187 ที่มีพลาสมิด 2 ชนิด คือ pGAD-SRC1 และ pGBK-ER α ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนสายผสม AD-SRC1 และ BD-ER α และมียีนรายงานคือ β -galactosidase gene โดยยีสต์ทูไฮบริดสามารถตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบได้ หากตัวอย่างดังกล่าวสามารถจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ (โปรตีน BD-ER α) ซึ่งมีผลให้โปรตีน AD-SRC1 สามารถเข้าจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ได้และทำให้เกิดการแสดงออกของยีน β -galactosidase ซึ่งสามารถวัดได้ผลผลิตที่เกิดจากการเปลี่ยนสารตั้งต้น ONPG เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองที่วัดค่าได้จากการดูดกลืนแสงที่ 420 nm จากการตรวจสอบยีสต์ทูไฮบริดที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol พบว่าสามารถตรวจวัดได้ในช่วงความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ M เมื่อใช้ยีสต์ทูไฮบริดในการตรวจวัด เอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของสมุนไพร 6 ชนิด คือ รากสามสิบ ว่านมหาเมฆ โกฐหัวบัว โกฐเขมา โกฐสอ และดอกคำฝอย นอกจากนี้ยังได้ตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีในยาดำรับ/ผลิตภัณฑ์ 3 ชนิด ได้แก่ ยาเม็ดสตรีปอเซีย ยาราบชมพูทวีป และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกวาวเครือศักดิ์พิศ ซึ่งพืชและยาดำรับดังกล่าวมีสรรพคุณที่สันนิษฐานว่าอาจมีส่วนประกอบของสารไฟโตเอสโตรเจนซึ่งมีเอสโตรเจนแอกติวิตี นอกจากนี้ยังได้ทดสอบกับสารสกัดหยาบของหัวไชเท้าเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมแบบลบ พบว่าพืชสมุนไพรที่ทดสอบทั้ง 6 ชนิดมีเอสโตรเจนแอกติวิตีจากมากไปน้อยคือ โกฐสอ > โกฐหัวบัว > รากสามสิบ > โกฐเขมา > ดอกคำฝอย > ว่านมหาเมฆ สำหรับยาดำรับ/ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด คือ ปอเซีย[®] ราบชมพูทวีป[®] และคัพดี[®] พบว่ามีเอสโตรเจนแอกติวิตีใกล้เคียงกัน สำหรับสารสกัดหยาบจากหัวไชเท้าซึ่งใช้เป็นตัวอย่างควบคุมพบว่าไม่มีเอสโตรเจนแอกติวิตี

Abstract

Constructed yeast two hybrid system in this work is based on yeast Y187 cells containing pGAD-SRC1 and pGBK-ER α which can produce AD-SRC1 and BD-ER α fusion proteins, and β -galactosidase reporter gene. Estrogenic activity of samples can be evaluated by the yeast two hybrid system if the samples can bind to estrogenic receptor protein (BD-ER α), which then induce AD-SRC1 protein binding and initiate expression of β -galactosidase reporter gene. Activity of β -galactosidase can be measured from the product of ONPG at the absorption of 420 nm. The constructed yeast two hybrid system was tested by measuring estrogenic activity of the standard 17 β -estradiol. The result showed that the system could measure estrogenic activity of 17 β -estradiol in a range of $10^{-10} - 10^{-4}$ M. In addition, the yeast two hybrid was used to determine estrogenic activity of six crude extracts of medicinal plants. The results showed that all plant extracts exhibited estrogenic activity; *Angelica sylvestris* > *Conioselinum univittatum* > *Asparagus racemosus* > *Atractylodes lancea* > *Carthamus tinctorius* > *Curcuma aeruginosa*. In addition, the yeast two hybrid system was used to evaluate estrogenic activity of three commercial medicinal/food supplement products (Pochiang[®], Prabchompootawee[®] and CupD[®]). All three commercial products exhibited similar levels of estrogenic activity. White radish (*Raphanus sativus*), a negative control, exhibited no estrogenic activity.

คำสำคัญ

ยีสต์ทูไฮบริด, เอสโตรเจนแอกติวิตี, สมุนไพร

Yeast two hybrid, estrogenic activity, medicinal plant

บทที่ 1

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1.1 ชื่อโครงการ

การสร้างระบบยีสต์ทูไฮบริดสำหรับศึกษาไฟโตเอสโตรเจนในพืชสมุนไพรไทย

Construction of Yeast two hybrid system to study phytoestrogen of Thai medicinal plants

1.2 ชื่อหัวหน้าโครงการ สินีนาฏ ศิริ

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 043-342911, 089-7119112 โทรสาร 043-342911 e-mail ssinee@kku.ac.th

1.3 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและองค์ความรู้ด้านสมุนไพรไทยซึ่งเป็นจุดเด่นที่สามารถนำไปสู่การวิจัยเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ เพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับตลาดต่างประเทศ สารธรรมชาติจากพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งซึ่งได้รับความสนใจอย่างมากคือ สารไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) เนื่องจากพบว่ามีผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น ความหนาแน่นของกระดูก ระบบหลอดเลือดหัวใจ การลดโอกาสเสี่ยงต่อโรคมะเร็ง ความสามารถในการจดจำ และลดอาการต่างๆ ที่พบในหญิงวัยหมดประจำเดือน ดังนั้นการใช้สารไฟโตเอสโตรเจนเป็นส่วนประกอบในยา อาหารเสริม และเครื่องสำอาง จึงกำลังได้รับความสนใจจากผู้บริโภค การศึกษาสำรวจและศึกษาสารไฟโตเอสโตรเจนในพืชโดยเฉพาะในสมุนไพรไทยจึงมีความน่าสนใจและเป็นองค์ความรู้ที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติได้

ไฟโตเอสโตรเจนเป็นสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อป้องกันตนจากการรุกรานของจุลินทรีย์ แต่พบว่ามีสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ได้ในคนและสัตว์ โดยอาจมีโครงสร้างคล้ายหรือแตกต่างจากฮอร์โมนเอสโตรเจนก็ได้ สารไฟโตเอสโตรเจนเหล่านี้สามารถจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ จึงมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนเอสโตรเจนในคนและสัตว์คล้ายกับการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน สารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในปัจจุบันมีมากมายหลายชนิด ซึ่งสามารถเป็น 4 กลุ่มหลัก คือ Isoflavonoids, Stibens, Lignans และ Coumestans โดยส่วนใหญ่พบในพืช 3 กลุ่ม คือ Legume, Cereal และ Grasses เช่น ถั่วเหลือง กระเทียม แดง น้ำเต้า ข้าวฟ่าง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารไฟโตเอสโตรเจนในพืชสมุนไพรไทย ได้แก่ กวาวเครือขาว ว่านชักมดลูก เป็นต้น จากตำรายาสมุนไพรไทยพบว่ามีพืชสมุนไพรหรือตำรับสมุนไพรจำนวนมากในแต่ละภูมิภาคที่มีสรรพคุณเกี่ยวข้องกับประจำเดือน มดลูก และ

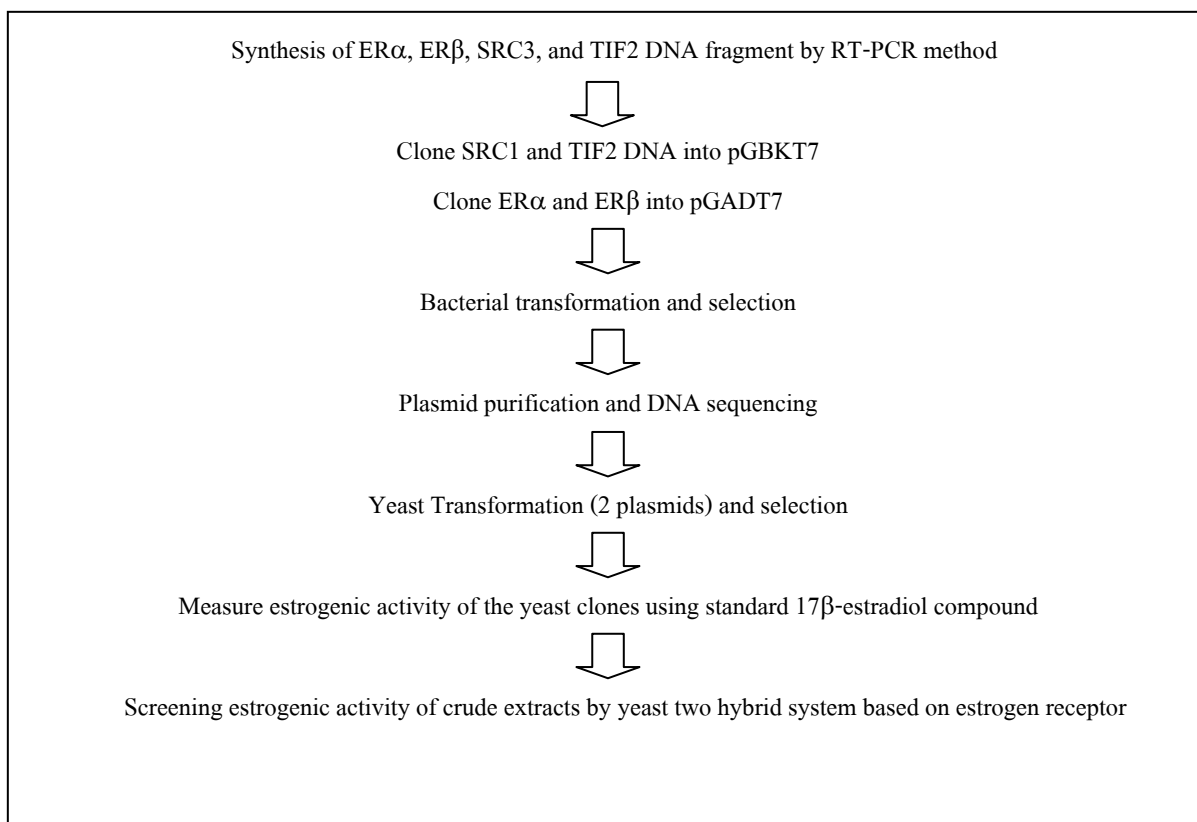
การรักษาอาการผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง ทำให้สันนิษฐานว่าพืชสมุนไพรเหล่านี้ น่าจะมีสารไฟโตเอสโตรเจนในปริมาณสูงแต่มีการศึกษาในเรื่องนี้ค่อนข้างน้อย

อุปสรรคหนึ่งที่ทำให้การสำรวจชนิดของพืชสมุนไพรไทยที่มีสารไฟโตเอสโตรเจนเป็นไปได้ช้าคือ วิธีการตรวจวัดสารไฟโตเอสโตรเจนในสารสกัดจากพืช แม้ว่าจะสามารถใช้เทคนิค HPLC (High performance liquid chromatography) และ GC (Gas chromatography) ในการตรวจวัดสารไฟโตเอสโตรเจนได้ แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดเนื่องจากสารไฟโตเอสโตรเจนมีมากมายหลายชนิดทำให้ไม่มีสารมาตรฐานที่สามารถใช้ในการเปรียบเทียบได้ทั้งหมดและไม่สามารถทราบผลหากเป็นสารไฟโตเอสโตรเจนชนิดใหม่ นอกจากนี้วิธีทางเคมีแล้วยังมีวิธีการตรวจวัดแบบ *in vivo* คือ Uterotrophic bioassay ซึ่งแม้ว่าจะได้รับความนิยม แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่เหมาะต่อการตรวจวัดตัวอย่างจำนวนมาก มีราคาสูง และมีความไวต่ำ ทำให้วิธีการตรวจวัดแบบ *in vitro* เช่น การใช้เซลล์มะเร็ง MCF-7 และการใช้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมได้รับความสนใจมากกว่า ทั้งนี้หากเปรียบเทียบความไวของวิธีที่ใช้ตรวจวัดพบว่าวิธีที่ใช้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมมีความไวสูงกว่าวิธีที่ใช้เซลล์มะเร็ง MCF-7 และวิธี Uterotrophic bioassay ถึง 10^2 และ 10^5 เท่าตามลำดับ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะสร้างยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมแบบทูลไฮบริดเพื่อใช้ในการสำรวจและศึกษาพืชสมุนไพรไทยที่มีสารไฟโตเอสโตรเจน โดยวิธีดังกล่าวอาศัยหลักการที่เกี่ยวข้องกับการจับกันระหว่างสารไฟโตเอสโตรเจนกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์และโปรตีนกระตุ้นร่วม โดยยีสต์ทูลไฮบริดที่ได้น่าจะสามารใช้ในการตรวจวัดสารไฟโตเอสโตรเจนได้ง่าย สะดวก ทดสอบสารจำนวนมากได้ มีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบต่ำ ซึ่งเหมาะต่อการนำมาใช้ในการศึกษาสารไฟโตเอสโตรเจนในพืชจำนวนมากที่ยังไม่มีการศึกษาในประเทศ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสนใจที่จะเปรียบเทียบระบบยีสต์ทูลไฮบริดที่ใช้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ในการศึกษาสารไฟโตเอสโตรเจนจากพืชแต่ละชนิดอีกด้วย ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในเชิงลึกต่อไป เช่น กลไกการทำงานและโครงสร้างของสาร นอกจากนี้ยีสต์ทูลไฮบริดที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยด้านสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การตรวจวัดสารซิงโนเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

1.4 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อสร้างยีสต์ทูลไฮบริดแบบที่ใช้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์
- 2) สำรวจชนิดของพืชสมุนไพรไทยที่มีสารไฟโตเอสโตรเจนอย่างน้อย 10 ชนิดและเปรียบเทียบผลที่ได้จากการใช้ยีสต์ทูลไฮบริด

1.5 แผนผังการวิจัย



บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอสโตรเจน

2.1.1 สอร์โมนเอสโตรเจน

เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนที่ถูกผลิตขึ้นภายใต้การควบคุมของการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ได้แก่ Follicle stimulating hormone (FSH) และ Luteinizing hormone (LH) กระตุ้นให้รังไข่เจริญและสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญ พัฒนาการของเซลล์และอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะในระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง มีบทบาทต่อระบบประสาทอัตโนมัติให้ทำงานได้อย่างปกติ (Doty and Cameron, 2009) เอสโตรเจนที่มีสำคัญในผู้หญิงคือ 17 เบต้า-เอสตราไดออล (17β -Estradiol ; E2) รองลงมาคือ เอสโตรน (Estrone ; E1) และเอสโตรออล (Estriol ; E3) (ภาพที่ 2.1)

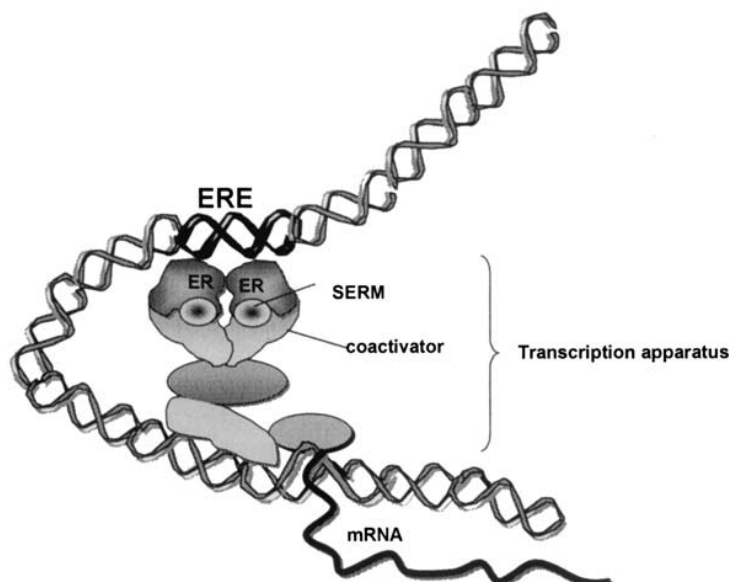
ภาวะการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เกิดในสตรีวัยหมดประจำเดือน ทำให้เกิดอาการผิดปกติทั้งทางร่างกายและอารมณ์ เช่น ทำให้เนื้อเยื่อของผนังช่องคลอดบางลง ขาดความความยืดหยุ่น และความหล่อลื่น มีระยะการตกไข่ที่ไม่แน่นอน ทำให้มีโอกาสตั้งครรภ์น้อยลง การผลิตสารคอลลาเจนลดลง ทำให้ผิวหนังขาดความยืดหยุ่น และความชุ่มชื้น ผู้หญิงในวัยนี้จึงมีผิวหนังที่เหี่ยวแห้งมากขึ้น นอนไม่หลับ มีอารมณ์แปรปรวนเกิดอาการซึมเศร้าและหงุดหงิดได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีผลที่อาจเกิดขึ้นในระยะยาว และส่งผลต่อร่างกายอย่างรุนแรง เช่น ปัญหาเกี่ยวกับทางเดินปัสสาวะ เพราะเนื้อเยื่อบริเวณเยื่อบุท่อปัสสาวะบางลง และความแข็งแรงของกระดูกเพาะปัสสาวะลดลง เกิดอาการปัสสาวะแสบ ปัญหากล้ามเนื้อกระดูกอ่อนแบบลงพุง (Metabolic syndrome) ส่งผลต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจากเอสโตรเจนมีส่วนช่วยในการเพิ่ม High-density lipoprotein (HDL) ซึ่งเป็นไขมันคอเลสเตอรอลชนิดดี และช่วยลด Low-density lipoprotein (LDL) ซึ่งเป็นไขมันชนิดเลว ปัญหาภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis) เนื่องจากเอสโตรเจนมีส่วนช่วยในกระบวนการสร้างกระดูกโดยช่วยให้ร่างกายดูดซึมแคลเซียมได้ดีขึ้น เมื่อระดับเอสโตรเจนลดลงทำให้กระบวนการสร้างกระดูกใหม่ทดแทนกระดูกเก่าที่สลายต่อไปช้าลง ดังนั้นแนวทางในการป้องกันและรักษาอาการผิดปกติข้างต้น ก็คือ การให้ฮอร์โมน (Hormone Replacement therapy , HRT) ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบของยาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และการรักษาด้วยยาดังกล่าวพบว่าทำให้อาการที่กล่าวข้างต้นนั้นดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังมีความเสี่ยงต่อภาวะเกิดมะเร็งของเยื่อบุมดลูก มะเร็งเต้านม บวม เต้านมโตผิดปกติ ปวดศีรษะ โรคถุงน้ำดีและเลือดคั่งแข็งตัว เมื่อรับประทานฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นระยะเวลานาน (ชุมศักดิ์, 2543)



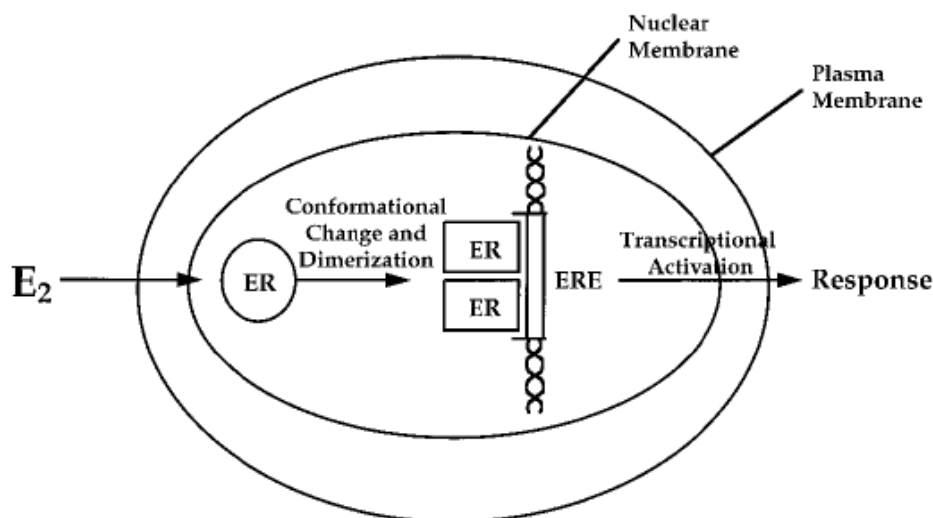
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของฮอร์โมนเอสโตรเจน เอสโตรน (Estrone; E1), เอสตราไดออล (Estradiol; E2) และเอสไตรออล (Estriol; E3) (ที่มา: en.citizendium.org/wiki/Estrogen)

2.1.2 กลไกการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน

เมื่อฮอร์โมนเอสโตรเจนถูกสร้างขึ้นและส่งไปตามกระแสเลือดไปยังอวัยวะเป้าหมาย ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะแพร่ (Diffuse) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และจับอย่างจำเพาะกับเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ (Estrogen receptor ; ER) ในไซโตพลาสซึม จากนั้นเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ที่จับกับฮอร์โมนเอสโตรเจนจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสและทำหน้าที่เป็น Transcription factor โดยฟอร์มตัวกันในรูปไดเมอร์ (Dimer) โครงรูปดังกล่าวสามารถจับกับตำแหน่งควบคุมจำเพาะ คือ Estrogen response element (ERE) บนโปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน ส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของยีนและการสังเคราะห์โปรตีนจำเพาะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ พัฒนาการของเซลล์และอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะในระบบสืบพันธุ์เพศหญิง ดังแสดงในภาพที่ 2.2 และ 2.3 (Macgregor and Jordan, 1998)



ภาพที่ 2.2 แสดงการจับของเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ในรูปไดเมอร์ และ Coactivator บนตำแหน่ง ERE (Diel, 2002)



ภาพที่ 2.3 แสดงกลไกการทำงานระดับโมเลกุลของเอสตราไดออล (Estradiol ; E₂) ที่ทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ (Macgregor and Jordan, 1998)

2.2 ไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen)

ไฟโตเอสโตรเจนเป็นสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการป้องกันการบุกรุกของแบคทีเรีย สารไฟโตเอสโตรเจนสามารถจับกับเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ได้ทั้งชนิดแอลฟาและเบต้า (Estrogen receptor alpha and beta ; ER α and ER β) จึงมีกลไกการทำงานและออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogenic properties) และยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Antiestrogenic properties) (Tham et al., 1998)

2.2.1 ชนิดและโครงสร้างของไฟโตเอสโตรเจน

ไฟโตเอสโตรเจน แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามโครงสร้าง ดังนี้

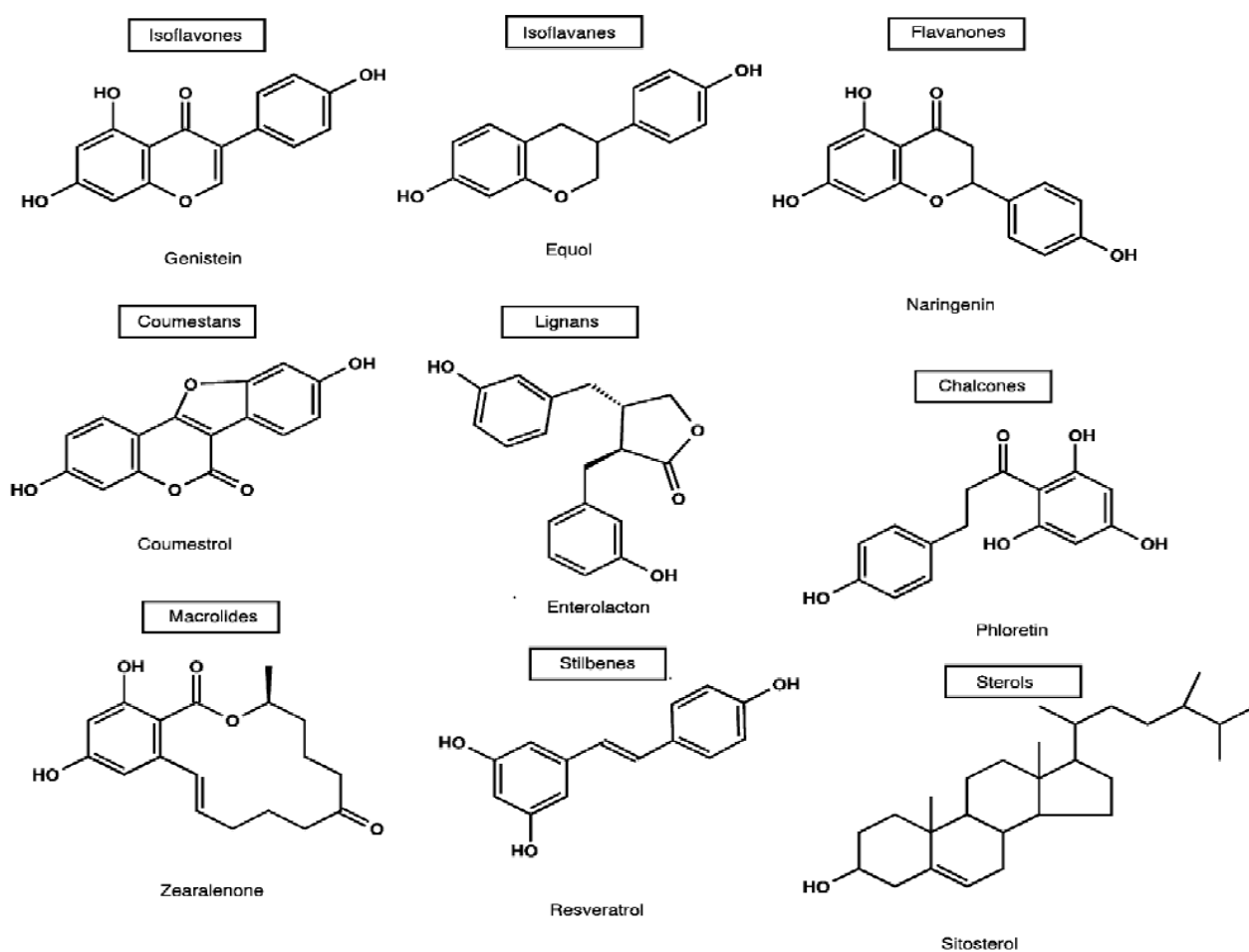
1) ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids) เป็นสารไฟโตเอสโตรเจนกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด สารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ในพืชถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ อะซิเตต (Phenyl-propanoid-acetate pathway) สารไอโซฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างแตกต่างจากสารฟลาโวนอยด์ที่วงแหวนฟีนอลตัวหนึ่งถูกย้ายจากตำแหน่ง C-3 ไปยัง C-2 สารไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีการศึกษามากที่สุด ได้แก่ เจนิสทิน (Genistein) และ ไดดซีน (Daidzein) โดยพบว่าเจนิสทินมีฤทธิ์ถึงหนึ่งในสามเท่าของเอสตราไดออล (Estradiol) โดยเข้าจับกับเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ชนิดเบต้า และมีกลไกการทำงานคล้ายเอสตราไดออลในเนื้อเยื่อและเซลล์เต้านมรังไข่ หลอดเลือดและกระดูกของสัตว์ สารไอโซฟลาโวนอยด์พบมากในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะในตระกูล *Leguminosae/Fabaceae*

2) สไทลเบิน (Stilbenes) สารในกลุ่มสไทลเบินในพืชถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ อะซิเตต (Phenyl-propanoid-acetate pathway) สารในกลุ่มนี้ที่ได้รับการศึกษามากที่สุดคือ เรเวอราทรอล

(Reveratrol) ซึ่งเฉพาะทรานเรเวอร์ราทรอล (*Trans-reveratrol*) เท่านั้นที่ออกฤทธิ์คล้ายกับเอสตราไดออล ทรานเรเวอร์ราทรอลพบในเปลือกองุ่น ดังนั้นจึงพบว่าเครื่องดื่มที่ทำจากองุ่น เช่น ไวน์ขาว ไวน์แดง มีทรานเรเวอร์ราทรอลด้วย

3) ลิกแนน (Lignans) สารในกลุ่มลิกแนนเป็นสารที่มีโครงสร้างของฟีนิลโพรพานอยด์ที่อยู่ในรูป ไดเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ ตัวอย่างของสารในกลุ่มลิกแนน ได้แก่ เซโคไอโซลาริซิเรซินอล (Secoisolariciresinol) และมาไทเรซินอล (Matairesinol) สารทั้งสองโดยตัวของมันเองไม่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ แหล่งของลิกแนนในพืช ได้แก่ เมล็ดป่าน เมล็ดธัญพืช ผัก และชา ส่วนในผลไม้พบลิกแนนในปริมาณต่ำ ยกเว้น ในสตรอเบอรี่ และแครนเบอร์รี่ (Cornwell et al., 2004)

4) คูเมสแทน (Coumestans) สารในกลุ่มคูเมสแทนที่ได้รับการศึกษามาก ได้แก่ คูเมสทรอล (Coumestrol) และ 4'-เมธอกซีคูเมสทรอล (4'-Methoxycoumestrol) แหล่งของคูเมสทรอลในพืช ได้แก่ ถั่วอก ผักโขม เป็นต้น (สินีนากู, 2549)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารไฟโตเอสโตรเจนบางชนิด (ที่มา : Mueller, 2002)

2.2.2 ผลของไฟโตเอสโตรเจนต่อสิ่งมีชีวิต

ปัจจุบันมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับสารไฟโตเอสโตรเจน เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถจับกับเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ได้จึงออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Agonistic และ Antagonistic effects) จึงมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่เกี่ยวกับสุขภาพผิว (Skin health) และยาที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันเบื้องต้นของการเกิดมะเร็งเต้านม (Breast cancer) โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular system) และภาวะกระดูกพรุนซึ่งมักเกิดกับผู้หญิงในวัยหมดประจำเดือน

ไฟโตเอสโตรเจนกับมะเร็งเต้านม (Phytoestrogens and breast cancer)

สารไฟโตเอสโตรเจนนอกจากจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferative effect) แล้ว พบว่าสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Antiproliferative effect) ของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ เมื่อทดสอบสารดังกล่าวที่ได้จากพืชที่มีการพิสูจน์แล้วว่ามีส่วนไฟโตเอสโตรเจน เช่น ถั่ว กวาวเครือขาว ในหนูทดลองที่เป็นมะเร็งเต้านมพบว่าการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมลดลง

ไฟโตเอสโตรเจนกับระบบกระดูก (Phytoestrogens and the skeletal system)

พบว่าสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ช่วยให้ร่างกายมีการสังเคราะห์วิตามินดีเพิ่มขึ้น ช่วยรักษาสมดุลของอัตราการสร้างและสลายกระดูก เมื่อให้โปรตีนจากถั่วแก่หนูทดลองพบว่าหนูมีมวลของกระดูกเพิ่มขึ้น

ไฟโตเอสโตรเจนกับระบบหัวใจและหลอดเลือด (Phytoestrogens and the cardiovascular system)

ไฟโตเอสโตรเจนมีส่วนช่วยในการเพิ่ม High-density lipoprotein (HDL) ซึ่งเป็นไขมันคอเลสเตอรอลชนิดดี และช่วยลด Low-density lipoprotein (LDL) ซึ่งเป็นไขมันชนิดเลวซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

ไฟโตเอสโตรเจนกับสุขภาพผิว (Phytoestrogens and skin health)

สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และ Anti-inflammatory จึงช่วยปกป้องผิวจากอนุมูลอิสระและช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือด (Tempfer et al., 2007)

2.3 พืชที่มีไฟโตเอสโตรเจนหรือสรรพคุณที่เกี่ยวข้อง

ตัวอย่างของพืชที่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอสโตรเจนแอคติวิตีและพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีสรรพคุณที่อาจเป็นผลจากสารออกฤทธิ์เอสโตรเจนแอคติวิตีแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมุนไพรและพืชที่เป็นอาหารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogenic effect)

ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	การออกฤทธิ์	วิธีตรวจสอบ	เอกสารอ้างอิง
แห้วหมู (ราก)	<i>Cyperus rotundus</i> Linn.	มีผล estrogenic effect	ให้หนูกินสารสกัดรากแห้วหมู	(Indra., 1956)
สมุนไพร (เมล็ด)	<i>Jatropha Curcas</i> Linn.	ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง	ทดสอบสารสกัดกับเซลล์มะเร็ง ตรวจวัดการเพิ่มจำนวนและการเป็นพิษต่อเซลล์	http://mulinet8.li.mahidol.ac.th/e-thesis/4336162.pdf
ระหุ่ง (เมล็ด)	<i>Ricinus communis</i> var.	น้ำมันจากเมล็ดทำให้มดลูกฝ่อในหนูในกระต่าย ทำให้ท่อไข่ตีบตัน ขนาดมดลูกเล็กลง ใช้ในคนที่ท้องจะทำให้แท้งได้	ใช้สารสกัดจากเมล็ด ทดสอบกับหนูและกระต่าย เพศเมีย	(Okwuasaba, 1991)
ลูกใต้ใบ (ทั้งต้น)	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้จำนวนสเปิร์มลดลง ทำให้คุมกำเนิดในหนูตัวผู้ได้		http://www.rain-tree.com/chanca.htm
กุน (ผล)	<i>Cassia fistula</i> Linn.	เนื้อในฝักของกุนมีผลลดการฝังตัวของไข่ที่ผสมแล้ว	uterine bioassay test	(Yadav and Jain, 1999)

		โดยทดลองในหนู Albino ตัวเมีย		
มะกล่ำตาหนู (เมล็ด)	<i>Abrus precatorius</i> Linn.	ช่วยให้หนูแท้ง เพราะเกิดการบีบ ตัวของมดลูกอย่าง รุนแรง ลดการฝัง ตัวของไข่ที่ผสม แล้วในหนู	ให้หนูกินสารสกัด จากเมล็ด	(Okwuasaba, 1991)
กวาวเครือขาว (ราก)	<i>Pueraria mirifica</i> <i>Airy Shaw et</i> Suvatab.	พบ Miroestrol ออกฤทธิ์เป็น estrogenic effect	MCF-7 proliferation assay	(Cherdshewasart et al., 2007)
ว่านชักมดลูก (เหง้า)	<i>Curcuma</i> <i>Zanthorrhiza</i> Roxb.	มี estrogenic activity	ยีสต์ทูไฮบริด	(Siri, 2008)
กระเทียม	<i>Eleocharis</i> <i>geniculata</i> L.	ลดความเสี่ยงต่อการ เกิดโรคหัวใจและ มะเร็ง	ให้หนูกินสารสกัด จากกระเทียม และ ทดสอบสารกับ เซลล์มะเร็ง	(Jung Park and Pezzuto, 2002)
มะละกอ (เมล็ด)	<i>Carica papaya</i> L.	สารสกัดในชั้น แอลกอฮอล์ใน หนูพบว่าสามารถ คุมกำเนิดได้ แบบ Irreversible	ให้หนูกินสารสกัด ไฟโตเอสโตรเจน จากมะละกอ	(Anuar et al., 2008)
กะหล่ำดอก	<i>Brassica oleracea</i>	ให้ผล Estrogenic effect ป้องกันการเกิด โรคมะเร็ง	ใช้สารสกัด ทดสอบกับ เซลล์มะเร็ง	(Brandi et al., 2005)
มะนาว (เปลือก, ผล)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	มี Rutin และ Naringin ใช้บีบ มดลูกทำให้แท้ง แก้ปวด	ใช้สารสกัด ทดสอบกับ เซลล์มะเร็ง	(Jung Park and Pezzuto, 2002)

		ประจำเดือนทำให้ มดลูกหดตัว ลด ความเสี่ยงต่อการ เกิดโรคมะเร็ง		
มะกรูด (เปลือก, ผล)	<i>Citrus hystrix</i> DC.	มี Rutin และ Naringin ทำให้ มดลูกบีบตัว ทำให้ แท้งในหนู มี สรรพคุณแก้ปวด ประจำเดือน	ทดสอบโดยให้หนู กินสารสกัด	(Jung Park and Pezzuto, 2002)
บัวบก	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	พบสาร Asiaticoside พบว่า มีฤทธิ์คล้าย ฮอร์โมน Estrogen	HPLC	(Barbosa et al., 2008)
ขมิ้น	<i>Curcuma longa</i> Linn.	มีฤทธิ์คล้ายเอสโตร เจนคือเป็นสาร ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการถูก ทำลายของเซลล์ ประสาทโดยสาร ออกซิเดชั่น ป้องกันโรคกระดูก พรุน	วัดจำนวนเซลล์ ประสาทที่รอดชีวิต	(Kim et al., 2001)
ถั่วเหลือง	<i>Glycine javanica</i> L.	พบสารกลุ่ม Isoflavone ออก ฤทธิ์เป็น Estrogenic effect พบสารกลุ่ม Isoflavone ออก ฤทธิ์เป็น Estrogenic effect	แยกสารไฟโตเอส โตรเจนโดยใช้ affinity column chromatography และ HPLC	(Riu et al., 2008)

โกโก้	<i>Theobroma cacao</i> L.	น้ำมันจากเมล็ด ออกฤทธิ์เป็น Estrogenic effect ยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งเต้านม	Cell Proliferation	(Ramljak et al., 2005)
อินทผลัม	<i>Phoenix dactylifera</i> L.	มีผลต่อฮอร์โมนที่ เกี่ยวข้องกับระบบ สืบพันธุ์ของหนู เพศผู้และเมียลดลง มีผลขัดขวางการ ปฏิสนธิ	Hormonal assay โดยใช้ testosterone and oestradiol test kits	(Aldhaheri et al., 2004)

2.4 การตรวจวัดสารที่มีเอสโตรเจน (Estrogenic activity)

การตรวจวัดปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในพืชทำได้หลายวิธีซึ่งอาจแบ่งเป็น 2 วิธีหลักคือการใช้วิธีเคมีวิเคราะห์และการวิเคราะห์เชิงชีวภาพ สำหรับเครื่องมือเคมีวิเคราะห์ที่ใช้ได้แก่ HPLC (High performance liquid chromatography), gas chromatography (GC), UV/IR spectroscopy เป็นต้น โดยเครื่องมือวิเคราะห์ที่นิยมใช้คือ HPLC เนื่องจากมีความไวในการตรวจวัดสูง (fmole หรือ pmole) สามารถทราบชนิดของสารไฟโตเอสโตรเจนโดยการเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างมาตรฐาน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือต้องมีเครื่องมือ HPLC ในการวิเคราะห์ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ยังมีวิธีวิเคราะห์ที่ยูกยาก ใช้เวลานานในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก และอาจทำให้ไม่สามารถพบสารไฟโตเอสโตรเจนชนิดใหม่เนื่องจากการวิเคราะห์ต้องเทียบกับสารตัวอย่างมาตรฐาน (Wang et al., 2002) สำหรับการวิเคราะห์เชิงชีวภาพนั้นเป็นการวิเคราะห์ที่อาศัยเซลล์ในการวัดไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตี ซึ่งแม้จะมีความไวในการตรวจวัดต่ำกว่าการใช้ HPLC และไม่สามารถทราบถึงชนิดของสารไฟโตเอสโตรเจน แต่มีจุดเด่นที่สามารถทดสอบตัวอย่างจำนวนมาก ใช้เวลาวิเคราะห์สั้น เสียค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่ต้องใช้เครื่องมือจำเพาะที่หาได้ยากหรือมีราคาแพง และสามารถยืนยันว่าตัวอย่างที่ทดสอบมีไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตีในเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตจริง ดังนั้นวิธีวิเคราะห์เชิงชีวภาพจึงเหมาะต่อการสำรวจพืชจำนวนมากที่มีสารไฟโตเอสโตรเจนและทราบระดับของไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตีในพืชนั้นโดยเปรียบเทียบกับแอ็กติวิตีของสารเอสโตรเจนมาตรฐาน สำหรับวิธีวิเคราะห์เชิงชีวภาพที่มีการศึกษาได้แก่

1) E-screen เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen โดยทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อสารเอสโตรเจน แล้ววัดการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferation of cells) ซึ่งสาร Estrogen จะกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ในขณะที่สาร Antiestrogen จะยับยั้งการเพิ่ม

จำนวนของเซลล์ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวจะระบุไม่ได้ว่าสารเอสโตรเจนนั้นทำให้มีการแสดงออกของเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ชนิดใด

2) Ligand-binding เป็นเทคนิคที่อาศัยการจับอย่างจำเพาะระหว่างลิแกนด์กับรีเซปเตอร์ชนิดแอลฟาหรือเบต้า ($ER\alpha$ หรือ $ER\beta$) ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นวิธีที่ง่ายและทดสอบกับสารตัวอย่างปริมาณมากได้ แต่เทคนิคนี้จะไม่สามารถวัดการกระตุ้นของสารต่อเอสโตรเจนรีเซปเตอร์

3) ER-binding to ERE เป็นเทคนิคที่อาศัยการจับอย่างจำเพาะของ $ER\alpha$ หรือ $ER\beta$ กับ Estrogen response element (ERE) ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นเทคนิคที่ง่ายและทดสอบกับสารตัวอย่างปริมาณมากได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ ERE ที่หลากหลาย แต่ข้อเสียคือไม่สามารถวัดการกระตุ้นของสารต่อเอสโตรเจนรีเซปเตอร์และมีความไวต่ำ

4) Glutathione S-transferase (GST) pull-down เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen ซึ่งอาศัยการจับของลิแกนด์ที่จับกับ $ER\alpha$ หรือ $ER\beta$ บนตำแหน่ง ERE กับ Co-activators โดยการวัด Glutathione S-transferase (GST) ที่ลดลง เมื่อทดสอบกับสารเอสโตรเจน แต่ข้อเสียคือทดสอบกับระบบที่ไม่มีอยู่จริงในสิ่งมีชีวิตและต้องใช้เครื่องมือในการตรวจวัดปริมาณของสารเรืองแสง นอกจากนี้ยังทดสอบสารได้ในปริมาณที่น้อย

5) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen โดยอาศัยหลักการ Protein-protein interaction ในเซลล์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมและตรวจวัดปริมาณของโปรตีนเรืองแสงที่เซลล์ผลิตขึ้น สาร Estrogen จะกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตโปรตีนเรืองแสงเพิ่มขึ้น ในขณะที่สาร Antiestrogen มีการแสดงออกในทางตรงกันข้าม ข้อดีของวิธีการนี้คือวิเคราะห์ปฏิกิริยาของโมเลกุล สามารถระบุชนิดของเอสโตรเจนรีเซปเตอร์หรือ Co-activator ที่เกิดขึ้นได้ แต่ข้อเสียคือทดสอบกับระบบที่ไม่มีอยู่จริงในสิ่งมีชีวิตและต้องใช้เครื่องมือในการตรวจวัดปริมาณของสารเรืองแสง นอกจากนี้ยังทดสอบสารได้ในปริมาณที่น้อย

6) Two-hybrid assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen โดยอาศัยหลักการ Protein-protein interaction ในระบบยีสต์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม ข้อดีของวิธีการนี้คือวิเคราะห์ปฏิกิริยาของโมเลกุล สามารถระบุชนิดของเอสโตรเจนรีเซปเตอร์หรือ Co-activator ที่เกิดขึ้นได้ แต่ข้อเสียคือทดสอบกับระบบที่ไม่มีอยู่จริงในสิ่งมีชีวิต ไม่สามารถวัดการกระตุ้นของสารต่อเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ และทดสอบสารได้ในปริมาณที่น้อย

7) Transactivation assay เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen โดยผ่าน $ER\alpha$ หรือ $ER\beta$ ต่อการแสดงออกของ Reporter gene ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร Estrogens และถูกยับยั้งด้วยสาร Antiestrogens ในยีสต์หรือเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม ข้อดีของเทคนิคนี้คือเป็นวิธีที่ง่ายและสามารถทดสอบกับสารตัวอย่างปริมาณมากได้ อย่างไรก็ตามระบบที่ใช้ในการทดสอบเป็นระบบที่ไม่ได้เกิดขึ้นจริงในสิ่งมีชีวิต

8) Analysis of gene และ Protein expression เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen โดยทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อสารเอสโตรเจน โดยวัดการแสดงออกของยีนและโปรตีน ข้อดีของวิธีการนี้คือวิเคราะห์การตอบสนองทางกายภาพและตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen แต่ข้อเสียคือทำการทดสอบกับระบบที่ไม่ได้เกิดขึ้นจริงในสิ่งมีชีวิต

9) Analysis of enzyme activity และ Steroid biosynthesis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Estrogen และ Antiestrogen เซลล์ที่มีการสร้าง Steroid hormone ซึ่งสาร Estrogen จะกระตุ้นให้เซลล์สร้าง Steroid hormone ในขณะที่สาร Antiestrogen จะยับยั้งการสร้าง Steroid hormone ของเซลล์ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวต้องทดสอบได้กับเซลล์ที่มีการผลิตสารสเตียรอยด์เท่านั้น (Mueller, 2002)

2.5 ยีสต์ทูไฮบริด

ในการศึกษาแบบ *in vitro* เซลล์ที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงชีวภาพนั้นอาจเป็นเซลล์ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมหรือเซลล์มะเร็ง ซึ่งการใช้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมมีข้อได้เปรียบต่อการใช้เซลล์มะเร็งเนื่องจากสามารถเลี้ยงและดูแลได้ง่าย เสียค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่มีปัญหาการขัดขวางการตรวจวัดไฟโตเอสโตรเจนที่เกิดจากเอสโตรเจนภายในเซลล์ มีความไวสูงกว่า และอาหารเลี้ยงเซลล์ยีสต์ไม่มีส่วนประกอบของสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่รบกวนผลการวัดไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตี การใช้เซลล์ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อวัดไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตีนี้อาศัย 2 หลักการคือ

1) การที่สารไฟโตเอสโตรเจนสามารถเข้าจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์และชักนำให้รีเซพเตอร์จับกับโปรตีนกระตุ้นร่วมได้ (Vogel et al, 1996; Heery et al, 1997)

2) หลักการของ Yeast two hybrid system ที่อาศัย interaction ระหว่างส่วน Activation domain และ DNA binding domain ของโปรตีน Transcription factor ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Miller and Stagljar, 2004)

งานวิจัยนี้จึงต้องการดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์ยีสต์เพื่อให้สามารถวัดไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตีโดยอาศัยหลักการข้างต้น โดยจะสร้าง Recombinant plasmid 2 ชนิด คือ

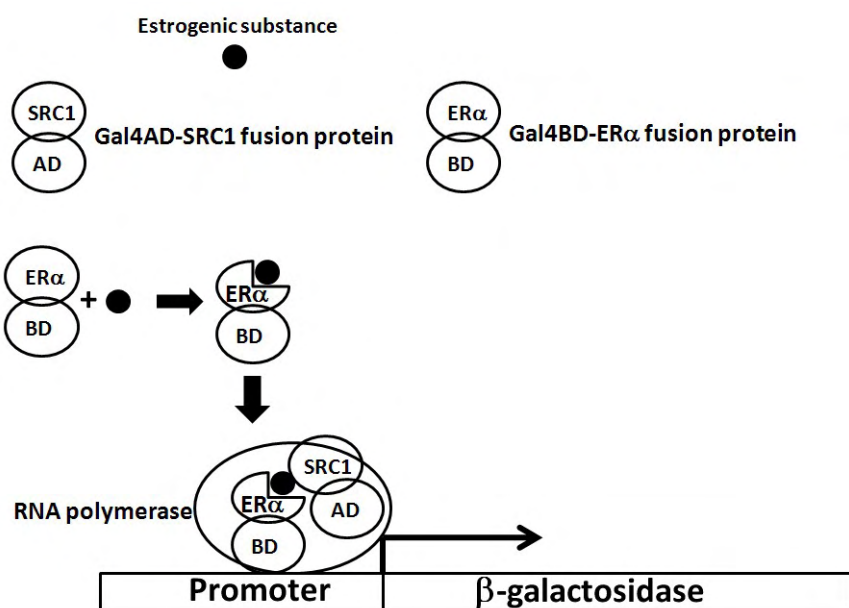
1) Recombinant plasmid ที่ผลิตโปรตีนลูกผสมที่ประกอบด้วยโปรตีน Gal 4 ในส่วน DNA binding domain เชื่อมกับโปรตีนกระตุ้นร่วมในส่วน Receptor interaction domain

2) Recombinant plasmid ที่ผลิตโปรตีนลูกผสมที่ประกอบด้วยโปรตีน Gal4 ในส่วน Activation domain เชื่อมกับโปรตีนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ในส่วน Ligand binding domain

โดย Recombinant plasmid ทั้งสองชนิดจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ยีสต์ที่มี Reporter gene เป็น β -galactosidase ดังนั้นหากตัวอย่างที่ทดสอบมีไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตี สารไฟโตเอสโตรเจนในตัวอย่างจะจับกับ Ligand binding domain ของโปรตีนลูกผสม และทำให้โปรตีนลูกผสม+ไฟโตเอสโตรเจนนี้สามารถเข้าจับกับ Receptor interaction domain ของโปรตีนลูกผสมอีกชนิดที่มีส่วนของ DNA binding

domain ดังนั้นจึงทำให้เกิดโปรตีนคอมเพล็กซ์ของโปรตีนถูกผสมทั้งสองชนิดและไฟโตเอสโตรเจนที่สามารถกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ β -galactosidase จาก Reporter gene ที่ Integrate ในโครโมโซมของยีสต์ เอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (เช่น ONPG) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี ดังนั้นจึงการวัดความเข้มสีของผลิตภัณฑ์จึงสะท้อนถึงค่าไฟโตเอสโตรเจนแอ็กติวิตีของตัวอย่างที่ถูกทดสอบ (รูปที่ 2.5)

การสร้างระบบยีสต์ไฮบริดเพื่อใช้ตรวจวัดเอสโตรเจนแอ็กติวิตีมีรายงานครั้งแรกในปี 1999 โดย Nishikawa และคณะ (Nishikawa et al., 1999) ซึ่งใช้ Ligand binding domain ของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ($ER\alpha$) และใช้ Receptor interaction domain ของโปรตีนกระตุ้นร่วม Transcriptional intermediary factor 2 (TIF2) โดยสามารถวัดเอสโตรเจนแอ็กติวิตีของสารเอสตราไดโอลมาตรฐาน (Standard estradiol) ในช่วง $10^{-10} - 10^{-5}$ M นอกจาก TIF2 แล้วยังมีโปรตีนกระตุ้นร่วมชนิดอื่นที่สามารถจับกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ได้ ได้แก่ SRC1, RIP140, TIF2, p300 และ CBP จากนั้นได้มีรายงานการสร้างระบบยีสต์ไฮบริดเพื่อใช้ตรวจวัดเอสโตรเจนแอ็กติวิตีอีกจำนวนหนึ่ง ซึ่งยังคงใช้หลักการเดียวกันคือใช้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาและโปรตีนกระตุ้นร่วม TIF2 (Nomiyama et al., 2007; Kovalchuk et al., 2006; Kamiya et al., 2005; Morohoshi et al., 2005) โดยระบบยีสต์ไฮบริดนี้ประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไฟโตเอสโตรเจนจากสารสกัดของพืช จากผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และตรวจวัดสารซีโนเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำและอากาศ ข้อมูลหนึ่งที่น่าสนใจเกี่ยวกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตคือ เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ในสิ่งมีชีวิตมีสองประเภทคือชนิดแอลฟาและชนิดเบต้า ซึ่งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน เนื่องจากเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาพบในต่อมน้ำนมและมดลูก ในขณะที่เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดเบต้าพบในท่อนำไข่ ระบบหลอดเลือดหัวใจ ระบบประสาทส่วนกลาง และสมอง (Enmark and Gustafsson, 1999) โดยเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดมีความคล้ายกันเพียง 59% ในส่วนของ Ligand-binding domain ทำให้คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่ายีสต์ไฮบริดที่ใช้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาและเบต้าอาจจะจับกับไฟโตเอสโตรเจนแต่ละชนิดได้ดีแตกต่างกัน ซึ่งองค์ความรู้นี้จะนำไปสู่ความเข้าใจของการทำงานของไฟโตเอสโตรเจนที่แตกต่างกันตามการจับกับชนิดของรีเซพเตอร์ได้ ทั้งนี้จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่พบการทำยีสต์ไฮบริดแบบเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดเบต้า สำหรับโปรตีนกระตุ้นร่วมที่จะใช้งานวิจัยนี้จะทดลองเปรียบเทียบการใช้ TIF2 และ SRC3 NRI เนื่องจากมีรายงานว่าเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ชนิดเบต้าจับกับโปรตีนกระตุ้นร่วม SRC3 NRI ได้ดีที่สุด (Bramlett et al., 2001)



รูปที่ 2.5 หลักการทำงานของโปรตีน Gal4AD-SRC1 และโปรตีน Gal4BD-ERα ในการจับกับสารไฟโตเอสโตรเจนและกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ Reporter gene

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเลี้ยงเซลล์

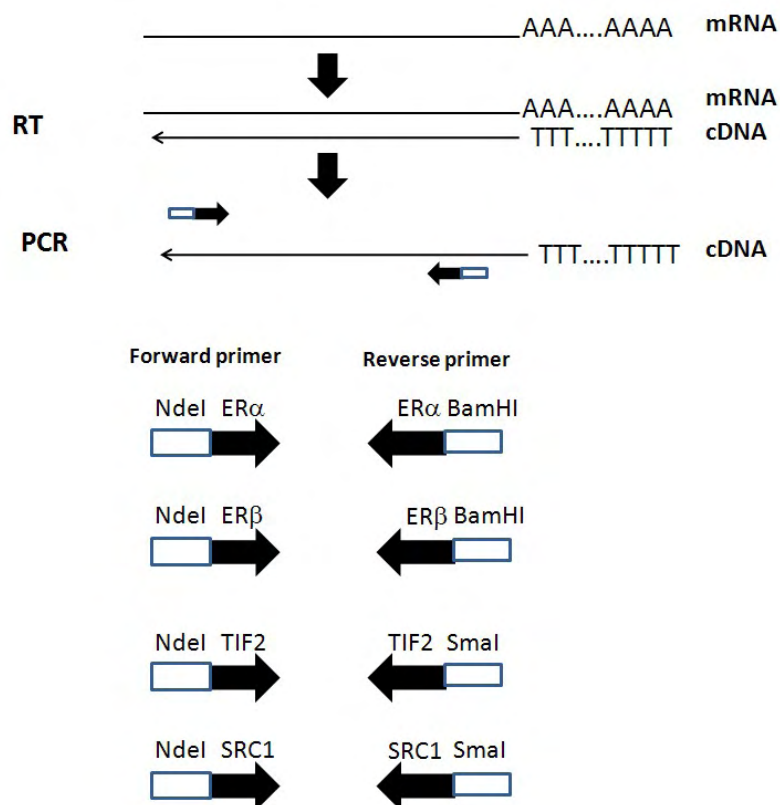
เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12 (DMEM/F12; Gibco, USA) ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA) และ 0.01 mg/ml Insulin (Sigma, USA) ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C มี 5% CO₂ และความชื้น 80%

3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ MCF-7 ทำโดยใช้ 1 ml Tri reagent (Sigma, USA) ต่อเซลล์ที่โตในพื้นที่มีประมาณ 100 cm² หลังจากการปิเปตให้เซลล์แตกในสารละลาย tri reagent เติมนิโคโรฟอร์ม 0.2 ml ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บอาร์เอ็นเอที่ละลายในชั้นบนของสารละลาย ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 0.1 volume ของ 3M NaOAc, pH 5.2 และ 2 volume ของเอทิลแอลกอฮอล์ ปั่นเหวี่ยงที่ 15,000xg ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% เอทิลแอลกอฮอล์ ปั่นเหวี่ยงที่ 15,000xg ที่ 4 °C ทั้งตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้ในบัฟเฟอร์ TE วัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ได้โดยคำนวณจากค่า OD260 นอกจากนี้ทำการตรวจความสมบูรณ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้บนอะกาโรสเจล และเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -70 °C จนกว่าจะใช้

3.3 การสังเคราะห์บางส่วนของยีนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์และยีนของโปรตีนกระตุ้นร่วม

การสังเคราะห์ยีนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาและเบต้า (ในส่วนของ ligand binding domain) และยีนของโปรตีนกระตุ้นร่วม SRC1 และ TIF2 (ในส่วนของ receptor inactivation domain) ด้วยวิธี Reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase และใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์บางส่วนของยีนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์และยีนของโปรตีนกระตุ้นร่วม โดยใช้ PCR reaction ที่มีไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนนั้นเชื่อมกับ Adaptor ที่สามารถตัดได้ด้วย Restriction enzyme โดยไพรเมอร์คู่ที่ใช้สังเคราะห์บางส่วนของยีนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์มี adaptor ที่จำเพาะกับเอนไซม์ NdeI และ BamHI ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ใช้สังเคราะห์บางส่วนของยีนของโปรตีนกระตุ้นร่วมมี Adaptor ที่จำเพาะกับเอนไซม์ NdeI และ SmaI (ภาพที่ 3-1)



รูปที่ 3-1. การทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ERα ERβ TIF2 และ SRC1 โดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวมีการออกแบบให้มีตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.4 การสร้างพลาสมิดลูกผสมและการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ทำการโคลนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จาก RT-PCR reaction เข้าพลาสมิด pGADT7 และ pGBKT7 โดยใช้เอนไซม์ NdeI และ BamHI สำหรับตัดดีเอ็นเอที่โคลนเข้า pGADT7 และใช้เอนไซม์ NdeI และ SmaI ในการตัดดีเอ็นเอที่โคลนเข้า pGBKT7 ทำการเชื่อมดีเอ็นเอและพลาสมิดที่ได้ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase และทำ Bacterial transformation ซึ่งใช้ *E. coli* XL1-Blue โคโลนีของแบคทีเรียที่โตใน LB plate ที่มียาปฏิชีวนะจะถูกนำมาทดสอบว่าได้รับ Recombinant plasmid หรือไม่โดยใช้ PCR reaction ที่มีไพรเมอร์จำเพาะต่อส่วน Insert DNA โคโลนีที่มี Recombinant plasmid จะถูกนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณและการเตรียมพลาสมิดบริสุทธิ์ จากนั้นพลาสมิดส่วนหนึ่งจะส่งไปหาลำดับเบสที่ศูนย์ Biotechnology โดยการทำ DNA sequencing เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้ถูกต้องและอยู่ใน Open reading frame ที่ถูกต้อง

3.5 การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ยีสต์

หลักจากที่ตรวจสอบลำดับเบสของ Recombinant plasmid ว่าถูกต้อง พลาสมิดดีเอ็นเอจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ยีสต์ โดยทำการเตรียม Yeast competent cells โดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน YPD medium ที่ 30 °ซ จนได้ค่า OD₆₀₀ ที่ 0.5 ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 1,000xg เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย 1x TE/LiAc

ในการทำ Yeast transformation โดยใช้พลาสมิด 100 ng ต่อ Yeast competent 100 ul และสารละลาย PEG/LiAc 600 ul ทำการ heat shock ที่ 42 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ใช้ 100 µl ในการ spread เซลล์บน SD medium ที่เหมาะสมในการคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิด

3.6 การทดสอบยีสต์ที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอคทีวิตี

การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคทีวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ใช้ตามวิธีของบริษัท Clontech (Clontech, USA) เซลล์ยีสต์ถูกเลี้ยงในอาหาร Synthetic minimal medium (SD medium) ที่พร่องกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ ทริปโทเฟนและลิวซีน เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาเลี้ยงต่อในอาหาร YPD ในอัตราส่วน เซลล์ยีสต์ 2 ml และ YPD 8 ml จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เมื่อค่า OD₆₀₀ ที่อยู่ในช่วงประมาณ 0.5-0.8 (บันทึกค่า OD₆₀₀) จึงนำไปเลี้ยงในหลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1.5 ml เติมน้ำที่ใช้ในการทดสอบปริมาตร 19 µl โดยสารที่ใช้ในการทดสอบคือ 17 β -estradiol ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 10⁻¹⁰ M - 10⁻⁴ M (ใช้ DMSO ในชุดควบคุม) บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความเร็วรอบ 250 rpm แล้วจึงนำเซลล์ยีสต์ดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที หลังจากที่ได้ตะกอนเซลล์แล้วจึงละลายกลับด้วย Z-buffer ปริมาตร 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 14,000x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจึงละลายตะกอนกลับด้วย Z-buffer ปริมาตร 0.3 ml นำสารละลายตะกอนเซลล์ปริมาตร 100 µl นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว 30-60 วินาทีสลับกับการแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ ทำซ้ำ 4 ครั้งเพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นเติม Z-buffer ที่มี β -mercaptoethanol ปริมาตร 0.7 ml และ ONPG (4 mg/ml) ปริมาตร 160 µl เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ สังเกตสีเหลืองของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เติมน้ำ 1 M Na₂CO₃ ปริมาตร 0.4 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase units (U) ดังสูตร

$$\beta\text{-galactosidase units (U)} = 1,000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

เมื่อ t = เวลาในการบ่ม

$$V = 0.1 \text{ ml} \times \text{concentration factor (1.5/0.3)}$$

$$\text{OD}_{600} = \text{ค่าดูดกลืนแสงเมื่อวัดที่ } 600 \text{ nm}$$

$$\text{OD}_{420} = \text{ค่าดูดกลืนแสงเมื่อวัดที่ } 420 \text{ nm}$$

3.7 การวัดเอสโตรเจนแอ็กติวิตีของสารสมุนไพร

ในการใช้เซลล์ยีสต์คัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอ็กติวิตีของสารสมุนไพรทำโดยใช้วิธีการตรวจสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.6 แต่เพิ่มสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ (ซึ่งละลายใน DMSO) นอกจากนี้ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีชุดควบคุมแบบบวกคือ 17 β -estradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-10} M - 10^{-4} M และชุดควบคุมแบบลบ คือ DMSO

3.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

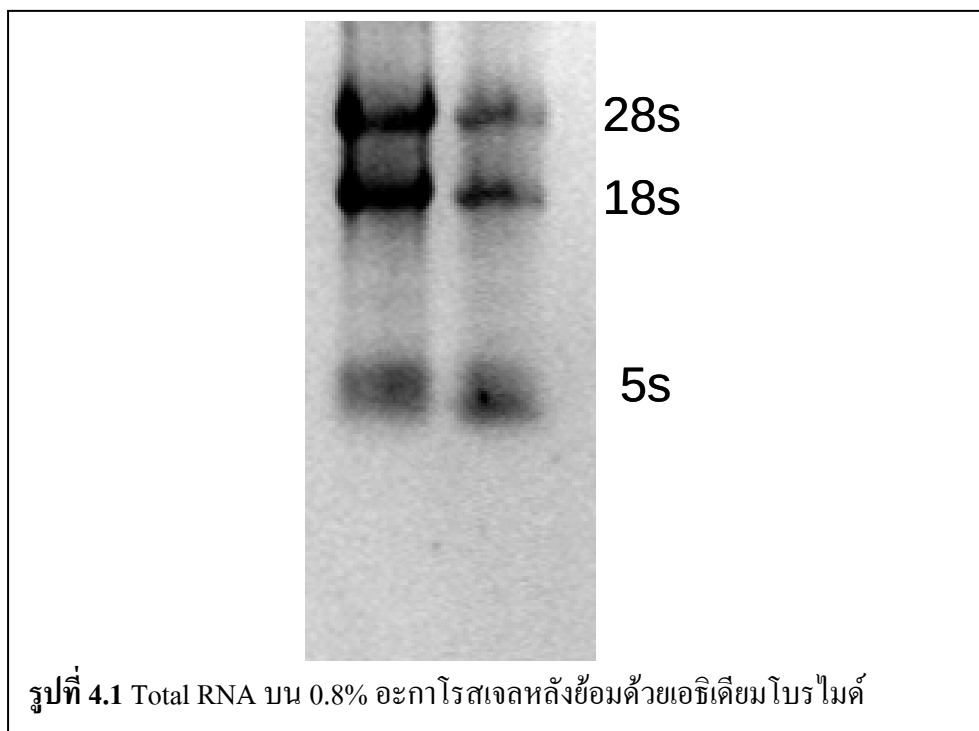
ในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ใช้โปรแกรม SPSS for windows version 11.5 ด้วยวิธี One-Way ANOVA โดยเปรียบเทียบที่ค่า p-value < 0.05 ในทุกการทดลอง ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 4 ซ้ำ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 การสกัด RNA จากเซลล์ MCF7

เซลล์ MCF7 มีรายงานว่ามีการแสดงออกของ estrogen receptor และมีการตอบสนองต่อ estrogen (คาดว่ามีการแสดงออกของโปรตีนกระตุ้นร่วมชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ estrogen response) จึงได้กระตุ้นเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี insulin เพื่อสกัด RNA สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ผลการสกัด RNA แสดงในรูปที่ 4.1 โดย total RNA ที่ได้ประกอบด้วย 3 แถบคือ 28s 18s และ 5s ซึ่งมีลักษณะที่ intact จึงใช้ total RNA ดังกล่าวในการสังเคราะห์ cDNA ในขั้นตอนต่อไป

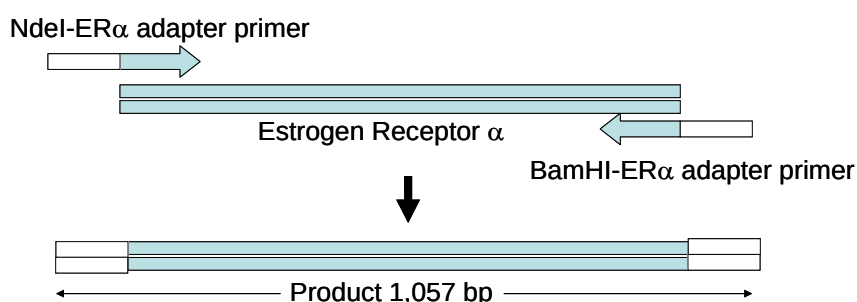


4.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR

ในการศึกษานี้ต้องการสังเคราะห์บางส่วนของยีน ER α ER β TIF2 และ SRC1 ได้ออกแบบไพรเมอร์โดยมีรายละเอียดดังนี้

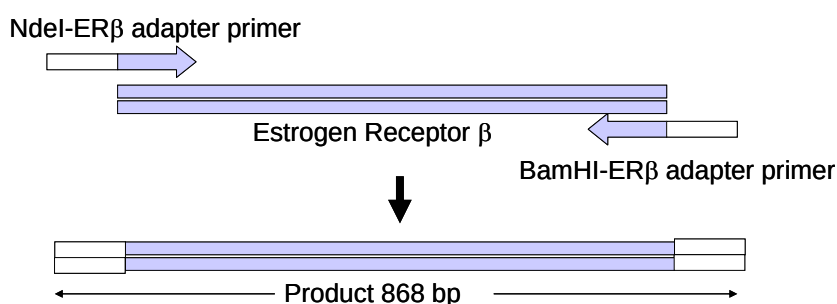
Estrogen receptor α (ER α)

ใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนตั้งแต่ 252-596 residues (ในช่วง Ligand binding domain, LBD ซึ่งเป็นโดเมนของเปปไทด์ที่สามารถจับกับโปรตีน TIF2 ในตำแหน่ง receptor interaction domain, RID ได้) โดยลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวคือลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1114 ถึง 2148 (Genebank database, ACCESSION NM_000125) ทั้งนี้เพื่อให้สามารถโคลนเข้า pGBKT7 ในทิศทางที่ต้องการจึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่เพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ NdeI (NdeI-ER α adapter primer) และ BamHI (BamHI-ER α adapter primer) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่มีตำแหน่งตัดภายในลำดับเบสของ ER α ที่ต้องการ โดยขนาดของ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR จะมีขนาด 1057 bp (รวมไพรเมอร์)



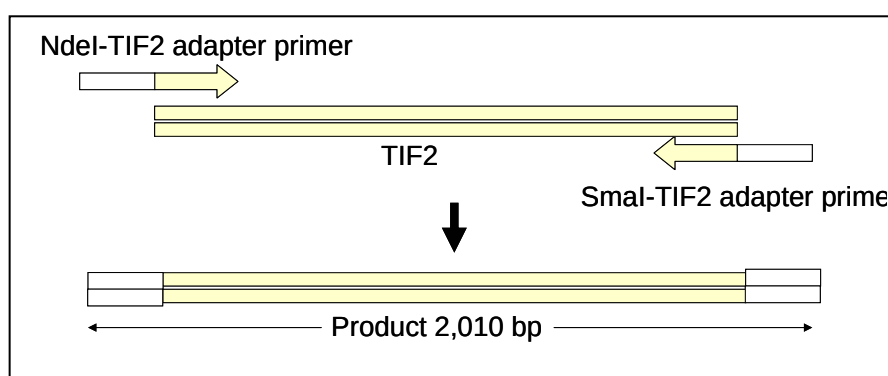
Estrogen receptor β (ER β)

ใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนตั้งแต่ 213-494 residues (ในช่วง ligand binding domain, LBD ซึ่งเป็นโดเมนของเปปไทด์ที่สามารถจับกับโปรตีน SRC1 ในตำแหน่ง receptor interaction domain, RID ได้) โดยลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวคือลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1105 ถึง 1950 (Genebank database, ACCESSION Q92731) ทั้งนี้เพื่อให้สามารถโคลนเข้า pGBKT7 (Clontech) ในทิศทางที่ต้องการจึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่เพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ NdeI (NdeI-ER β adapter primer) และ BamHI (BamHI-ER β adapter primer) โดยขนาดของ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR จะมีขนาด 868 bp (รวมไพรเมอร์)



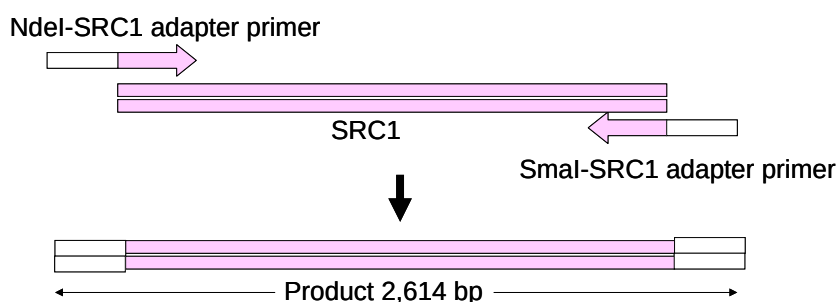
Transcriptional intermediary factor 2 (TIF2)

ใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนตั้งแต่ 624-1287 residues (ในช่วง receptor interaction domain, RID ซึ่งเป็นโดเมนของเปปไทด์ที่สามารถจับกับโปรตีน ER α ในตำแหน่ง ligand binding domain, LBD ได้) โดยลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวคือลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 2032 ถึง 4023 (Genebank database, ACCESSION Q15596) ทั้งนี้เพื่อให้สามารถโคลนเข้า pGADT7 ในทิศทางที่ต้องการจึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่เพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ NdeI (NdeI-TIF2 adapter primer) และ SmaI (SmaI-TIF2 adapter primer) โดยขนาดของ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR จะมีขนาด 2,010 bp (รวมไพรเมอร์)

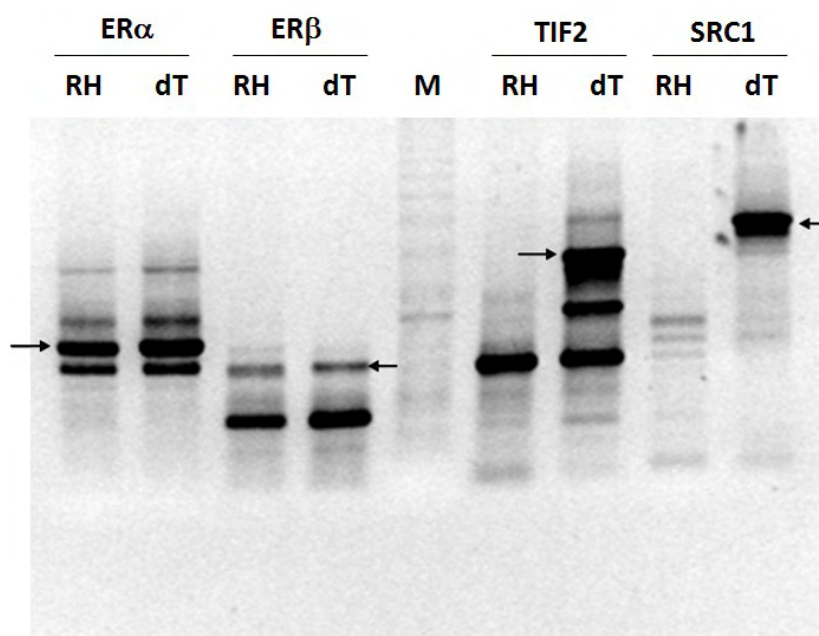


Steroid receptor coactivator 1 (SRC1)

ใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนตั้งแต่ 231-1094 residues (ในช่วง receptor interaction domain, RID ซึ่งเป็นโดเมนของเปปไทด์ที่สามารถจับกับโปรตีน ER β ในตำแหน่ง ligand binding domain, LBD ได้) โดยลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวคือลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 949 ถึง 3540 (Genebank database, ACCESSION NM_003743) ทั้งนี้เพื่อให้สามารถโคลนเข้า pGADT7 ในทิศทางที่ต้องการจึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่เพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ NdeI (NdeI-SRC1 adapter primer) และ SmaI (SmaI-SRC1 adapter primer) โดยขนาดของ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR จะมีขนาด 2,614 bp (รวมไพรเมอร์)



ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้ง 4 ชนิด โดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ oligo dT และ random primers ในการสังเคราะห์ first stranded cDNA และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย แสดงดังในภาพที่ 4.2 จากรูปพบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RT-PCR จะมี product มากกว่า 1 ชนิด แต่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับที่คาดคะเนไว้ จึงใช้วิธีการตัดแถบดีเอ็นเอและแยกจากเจลโดยใช้ gel extraction kit และใช้ดีเอ็นเอที่ได้ในการโคลนเข้าพลาสมิดที่ต้องการ



รูปที่ 4.2 ผลการทำ RT-PCR โดยใช้ oligo dT (dT) และ random primers (RP) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ ERα (1057 bp) ERβ (868 bp) TIF2 (2010 bp) และ SRC1 (2614 bp) โดยถูกสรรระบุดำแหน่งของดีเอ็นเอที่ต้องการ

4.3 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

ในการสร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อใช้ในการสร้างยีสต์ทูไฮบริด จะโคลน ER α (1057 bp) และ ER β (868 bp) เข้าพลาสมิด pGBKT7 (มีตำแหน่ง Gal4 DNA binding domain) ส่วน TIF2 และ SRC1 จะโคลนเข้า pGADT7 (มีตำแหน่ง Gal activation domain) สำหรับในการทดลองส่วนแรกเป็นการโคลน ER α (1057 bp) และ ER β (868 bp) เข้าพลาสมิด pGBKT7 โดยมีขั้นตอนโดยย่อคือ

- ตัดดีเอ็นเอ (ER α ER β และ pGBKT7) ด้วยเอนไซม์ NdeI และ BamHI และดูผลการตัดอย่างสมบูรณ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล

- ตกตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย NH₄OAc หลังจากนั้นได้กระจายดีเอ็นเอในน้ำกลั่น

- วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้

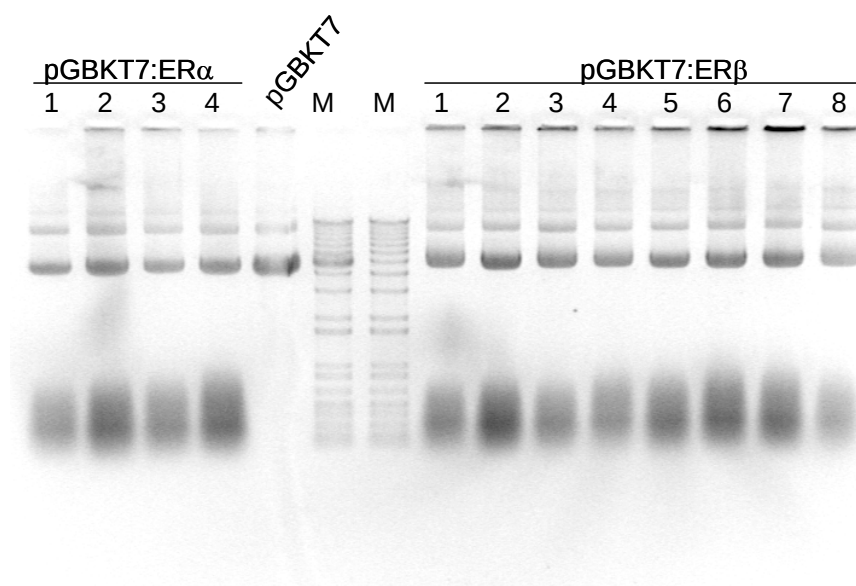
- เชื่อม digested-insert DNA (ER α หรือ ER β) เข้ากับ digested-pGBKT7 โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งได้ใช้อัตราส่วนเป็น Molar ratio 1:6 (plasmid : insert DNA)

-Transformation โดยใช้ *E. coli* DH5 α และ ligation reaction จากขั้นตอนข้างต้น ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดด้วย LB agar medium + 50 ug/ml Kanamycin (pGBKT7 มี Kanamycin resistant gene)

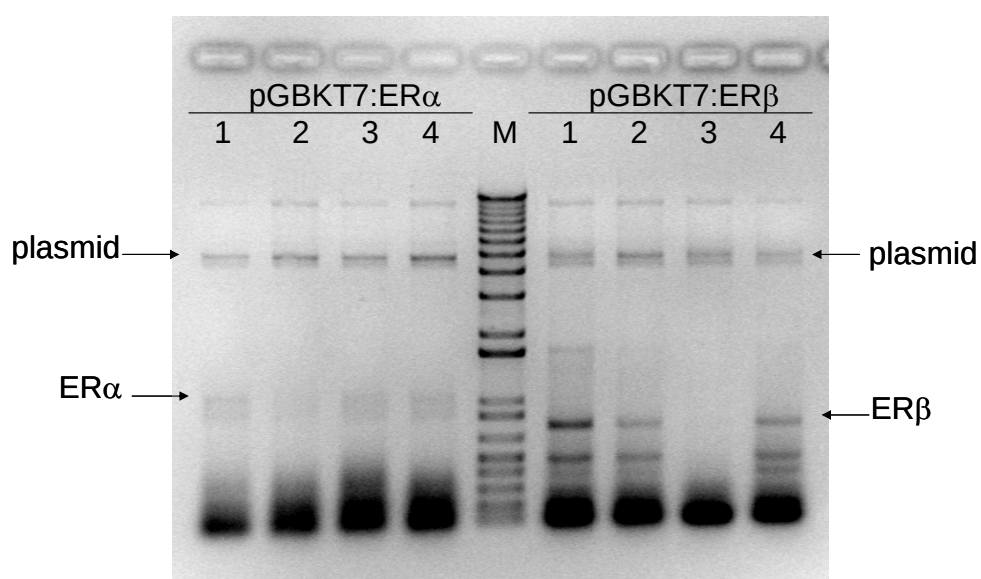
-แบคทีเรียที่เจริญบน LB agar medium + 50 ug/ml Kanamycin จะถูกนำมาเลี้ยงข้ามคืนใน LB broth + 50 ug/ml Kanamycin และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเพื่อแยกขนาดบน 0.8% อะกาโรสเจล (เพื่อแสดงว่ามีพลาสมิดจากแบคทีเรีย) และใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับ polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ER α และ ER β (เพื่อแสดงว่าพลาสมิดที่ได้มี insert DNA ที่ต้องการ) โดยพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อม pGBKT7 กับ ER α และพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการเชื่อม pGBKT7 กับ ER β ให้ชื่อเป็น pGBKT7-ER α และ pGBKT7-ER β ตามลำดับ

ผลการทำ bacterial transformation โดยใช้ pGBKT7:ER α (1:6 molar ratio) ligation reaction และ *E. coli* DH5 α ได้แบคทีเรียจำนวน 4 โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Kanamycin ส่วนการใช้ pGBKT7:ER β (1:6 molar ratio) ligation reaction และ *E. coli* DH5 α พบว่าได้แบคทีเรียจำนวน 19 โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Kanamycin ทั้งนี้ได้เลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวและทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งผลแสดงดังในภาพที่ 4.3 จากรูปแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีพลาสมิดดีเอ็นเอ

เมื่อนำพลาสมิดดังกล่าวมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ER α และ ER β (ไพรเมอร์เดียวกับที่ใช้ใน RT-PCR) พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ ER α และ ER β (รูปที่ 4.4) จึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ได้มีพลาสมิดลูกผสม pGBKT7-ER α และ pGBKT7-ER β อย่างไรก็ตามจะได้ทำการยืนยันลำดับเบสของพลาสมิดที่ได้โดยการทำ DNA sequencing ในลำดับต่อไป



รูปที่ 4.3 ผลการสกัดพลาสมิดที่เอนจากแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Kanamycin



รูปที่ 4.4 ผลของ PCR โดยใช้พลาสมิดจากแบคทีเรียเป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ERα และ ERβ

แต่เมื่อได้ใช้ plasmid specific primers ในการตรวจสอบก่อนนำไปทำ DNA sequencing พบว่าไม่เกิด PCR product ทำให้สันนิษฐานว่าผลที่ได้ข้างต้นเป็น false positive ซึ่งจากประสบการณ์ที่เคยพบมาก่อนว่าในการทำ cloning บางครั้งการใช้ gene specific primer ในการตรวจสอบ bacterial clone อาจให้ผล false positive ได้เนื่องจากการ carry over ของ insert DNA มากับ plasmid DNA ดังนั้นจึงได้ทำการโคลนใหม่ด้วยวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง โดยได้เปลี่ยนอัตราส่วน molar ratio ของ plasmid : insert DNA แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ เมื่อพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ พบว่า transformation efficiency ของ competent cells มีค่าสูง และในส่วนของ plasmid DNA ก็มีการตัดโดยสมบูรณ์ ทำให้สันนิษฐานว่า PCR product อาจไม่ถูกตัดโดยสมบูรณ์ จึงทำให้ไม่เกิดการ ligation และไม่ได้ recombinant plasmid

ดังนั้นจึงได้ใช้วิธีโคลน PCR product เข้าพลาสมิด pAT ด้วยเทคนิค TA-cloning พบว่าได้ recombinant plasmid pAT- ER α , pAT- ER β , pAT-SRC1 และ pAT-TIF2 ในขั้นต้นได้ตัดชิ้นดีเอ็นเอจาก pAT-SRC1 และ pAT-TIF2 (รูปที่ 4.5) ด้วยเอนไซม์ NdeI และ SmaI และ purify ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเจล จากนั้นทำการ subclone เข้า pGADT7 พบว่าได้โคลนของแบคทีเรียบน LB agar + Ampicillin เมื่อทำการยืนยันการได้ recombinant plasmid pGADT7-SRC1 และ pGADT7-TIF2 ด้วยการทำ plasmid specific primers พบว่าได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณชิ้น insert DNA (รูปที่ 4.6) ทำให้สรุปได้ว่า สามารถโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้า plasmid vector ได้ ผลการทำ DNA sequencing จากโคลนทั้งสอง สำหรับ pGADT7-SRC1 และ pGADT7-TIF2 พบว่า pGADT7-SRC1 ที่ได้มีลำดับเบสตรงกับชิ้น Insert DNA (SRC1) แต่พบว่า pGADT7-TIF2 ไม่ได้ลำดับเบสตรงกับชิ้น Insert DNA (TIF2) ดังนั้นจึงได้เฉพาะ pGADT7-SRC1

สำหรับ pAT- ER α และ pAT- ER β ได้ตัดชิ้น Insert DNA โดยใช้เอนไซม์ NdeI และ BamHI และ purify ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเจล จากนั้นทำการ subclone เข้า pGBKT7 พบว่าได้โคลนของแบคทีเรียบน LB agar + Kanamycin เมื่อส่ง recombinant plasmid pGBKT7-ER α และ pGBKT7-ER β ทำ DNA sequencing พบว่า pGBKT7-ER α มีลำดับเบสตรงกับชิ้น Insert DNA (ER α) แต่พบว่า pGBKT7-ER β ไม่ได้ลำดับเบสตรงกับชิ้น Insert DNA (ER β) ดังนั้นจึงได้นำพลาสมิดทั้งสองชนิดเข้าเซลล์ยีสต์ AH 109 (Clontech, USA) เพื่อให้ได้ระบบยีสต์ไฮบริด ดังนั้นจึงได้เฉพาะ pGBKT7-ER α

ผลการเปรียบเทียบลำดับจีโนมของ pGADT7-SRC1 กับ *Homo sapiens* nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1 หรือ SRC1) ด้วยโปรแกรม Blast2seq

>ref|NM_003743.4| Homo sapiens nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1), transcript variant 1, mRNA

Length=6895

GENE ID: 8648 NCOA1 | nuclear receptor coactivator 1 [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 1256 bits (680), Expect = 0.0

Identities = 680/680 (100%), Gaps = 0/680 (0%)

Strand=Plus/Minus

Query 1 GCCTGATCTCATATTGATGCCAACAGGAGCAGTTGCTGCAAACGGTTTAAGATAGCTTG 60
Sbjct 3537 GCCTGATCTCATATTGATGCCAACAGGAGCAGTTGCTGCAAACGGTTTAAGATAGCTTG 3478

Query 61 CCGATTTTGGTGTATCAACTGCTGTTGTCCCTGTAATCGCTGCTGTAGTTGAAGTCGAAG 120
Sbjct 3477 CCGATTTTGGTGTATCAACTGCTGTTGTCCCTGTAATCGCTGCTGTAGTTGAAGTCGAAG 3418

Query 121 CTGGTTAGGTGCAGCCGGAGGTCTGTTTAGAGTTTGCCTGGGCTGCATGCCCATGCCAGG 180
Sbjct 3417 CTGGTTAGGTGCAGCCGGAGGTCTGTTTAGAGTTTGCCTGGGCTGCATGCCCATGCCAGG 3358

Query 181 TGAAAAAGCACCTCGGGGAGGTGTTACTTGAACAGGCATCGTCCCCAGTGAAGGTTTTTG 240
Sbjct 3357 TGAAAAAGCACCTCGGGGAGGTGTTACTTGAACAGGCATCGTCCCCAGTGAAGGTTTTTG 3298

Query 241 CCTGACCATGCCTTGAAAGGGCTAGGGAGATTGGCAGTAGGAGAAGGAGAAGAGTAAGG 300
Sbjct 3297 CCTGACCATGCCTTGAAAGGGCTAGGGAGATTGGCAGTAGGAGAAGGAGAAGAGTAAGG 3238

Query 301 CTGGGAATAAAGGTTGGGTCTTTCTTCATGATCAAAGGTGGCGTTGCTTGTGTGGTGG 360
Sbjct 3237 CTGGGAATAAAGGTTGGGTCTTTCTTCATGATCAAAGGTGGCGTTGCTTGTGTGGTGG 3178

Query 361 AAATCTCTCTGATAATACATCTAATCCACCCCCCTGAACAAGTTTGTCAATTCCAGAGC 420
Sbjct 3177 AAATCTCTCTGATAATACATCTAATCCACCCCCCTGAACAAGTTTGTCAATTCCAGAGC 3118

Query 421 TCTGTCTAGTTCAGCTAGCTCAGTTTCATCTTTGCCACTAAGGAAGGATACCAGCTGTTC 480
Sbjct 3117 TCTGTCTAGTTCAGCTAGCTCAGTTTCATCTTTGCCACTAAGGAAGGATACCAGCTGTTC 3058

Query 481 AAGAAGAGCCTTCTCATCATTTCTCCCTTCTACTGTTGTGGGTGGACAGAGAAGCTCATC 540
Sbjct 3057 AAGAAGAGCCTTCTCATCATTTCTCCCTTCTACTGTTGTGGGTGGACAGAGAAGCTCATC 2998

Query 541 TAATTGTGAGCTAATACTACTGGTCTTCTGATTTACTCTGATTTATAGCTGTCACTGTATT 600
Sbjct 2997 TAATTGTGAGCTAATACTACTGGTCTTCTGATTTACTCTGATTTATAGCTGTCACTGTATT 2938

Query 601 ATTTGTCCATGGAATCTGATCGCCTGTTCTGGTTGTCCAAATTGGTTATCAATTGCTTC 660
Sbjct 2937 ATTTGTCCATGGAATCTGATCGCCTGTTCTGGTTGTCCAAATTGGTTATCAATTGCTTC 2878

Query 661 CAATTCCAGCTCAGGTAATC 680
Sbjct 2877 CAATTCCAGCTCAGGTAATC 2858

ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของ pGBKT7-ER α กับ *Homo sapiens* nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1 หรือ SRC1) ด้วยโปรแกรม Blast2seq

>ref|NM_000125.3| Homo sapiens estrogen receptor 1 (ESR1), transcript variant 1, mRNA

Length=6330

GENE ID: 2099 ESR1 | estrogen receptor 1 [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 924 bits (500), Expect = 0.0

Identities = 502/504 (99%), Gaps = 0/504 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 135 ATGAAAGGTGGGATACGAAAAGACCGAAGAGGAGGGAGAATGTTGAAACACAAGCGCCAG 194
Sbjct 985 ATGAAAGGTGGGATACGAAAAGACCGAAGAGGAGGGAGAATGTTGAAACACAAGCGCCAG 1044

Query 195 AGAGATGATGGGGAGGGCAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAAC 254
Sbjct 1045 AGAGATGATGGGGAGGGCAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAAC 1104

Query 255 CTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTG 314
Sbjct 1105 CTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTG 1164

Query 315 ACGGCCGACCAGATGGTCAGTGCCTTGTTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAG 374
Sbjct 1165 ACGGCCGACCAGATGGTCAGTGCCTTGTTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAG 1224

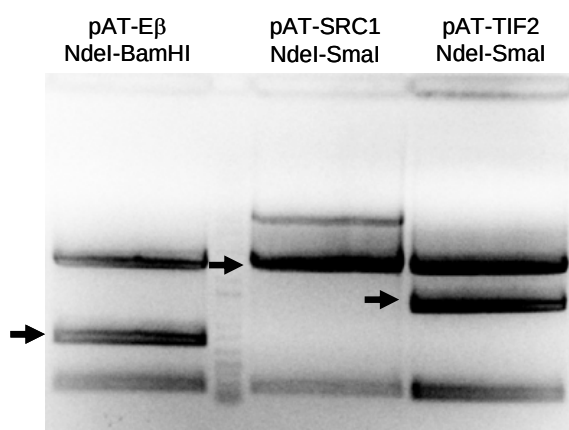
Query 375 TATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCA 434
Sbjct 1225 TATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCA 1284

Query 435 GACAGGGAGCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTG 494
Sbjct 1285 GACAGGGAGCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTG 1344

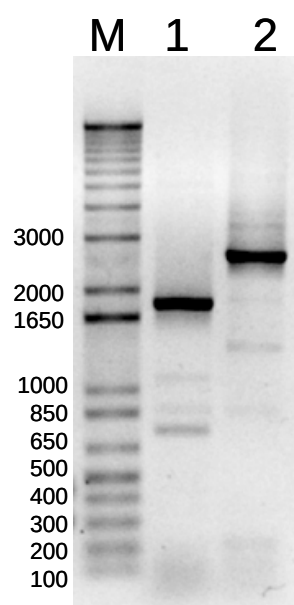
Query 495 ACCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGT 554
Sbjct 1345 ACCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGT 1404

Query 555 CTCGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGGGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTNGCTCTTG 614
Sbjct 1405 CTCGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGGGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTTGCTCTTG 1464

Query 615 GACANGAACCAGGGAAAAATGTGTA 638
Sbjct 1465 GACAGGAACCAGGGAAAAATGTGTA 1488



รูปที่ 4.5 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pAT-E β , pAT-SRC1 และ pAT-TIF2 สำหรับการ subclone เข้า pGBKT7 หรือ pGADT7

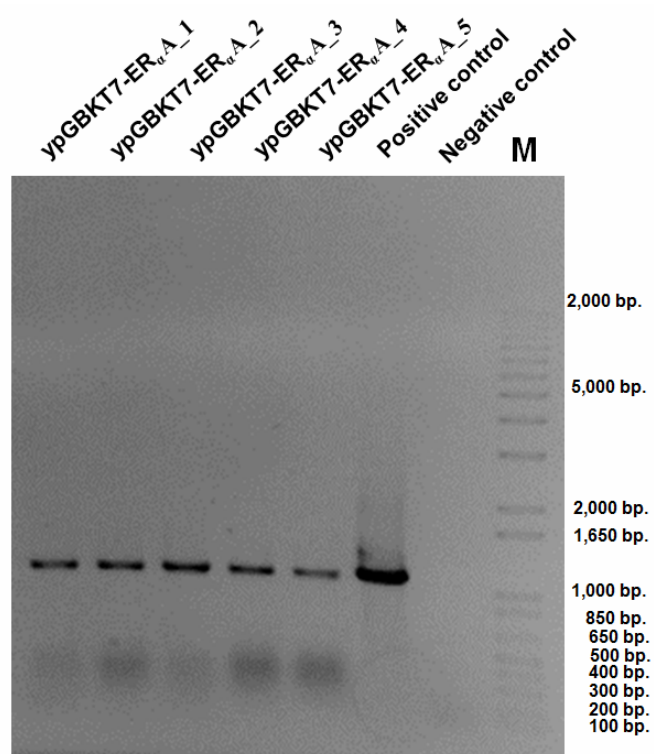


รูปที่ 4.6 การตรวจสอบพลาสมิด pGADT7-TIF2 (lane 1) และ pGADT7-SRC1 (lane 2) ด้วย plasmid specific primers ซึ่ง PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 2000 bp และ 2500 bp ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับขนาดที่คาดคะเนไว้

4.4 การเตรียมเซลล์ยีสต์ไฮบริด (พลาสมิด pGBKT7-ER α และ pGADT7-SRC1)

ในการนำพลาสมิด pGBKT7-ER α และ pGADT7-SRC1 เข้าเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ AH 109 ด้วยวิธี LiAc-mediated yeast transformation โดยนำพลาสมิด pGBKT7-ER α เข้าในยีสต์เซลล์ก่อนและคัดเลือกยีสต์ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อาหาร Synthetic minimal medium ที่พร่องกรดอะมิโนทริปโตเฟน ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดเลือกยีสต์เซลล์บนอาหารที่พร่องกรดอะมิโนทริปโตเฟนได้ 5 โคโลนี จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดจากยีสต์เซลล์โดยวิธี Yeast boiling DNA miniprep (Robzyk and Kassir, 1992) จากนั้นจึงตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิด pGBKT7-ER α ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ คือ T7 sequencing primer (forward primer) – ER α primer (reverse primer) ซึ่งหากเป็นโคลนที่ถูกต้องจะได้ขนาดของ PCR product เท่ากับ 1,116 bp จากการตรวจสอบทั้ง 5 โคลน พบว่าทุกโคลนได้ขนาด PCR product ประมาณ 1,160 bp (ดังแสดงในรูปที่ 4-7 lane ที่ 1- 5) แสดงว่าทั้ง 5 โคลนได้รับพลาสมิด pGBKT7-ER α

จากนั้นยีสต์โคลนที่ 1 มาใช้ในการทำ Yeast transformation โดยใช้พลาสมิดชนิดที่ 2 คือ pGADT7-SRC1 ด้วยวิธี LiAc-mediated yeast transformation และคัดเลือกยีสต์โคลนที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อาหาร Synthetic minimal medium ที่พร่องกรดอะมิโนทริปโตเฟนและลิซีน แล้วตรวจสอบโคลนที่ได้รับทั้ง 2 พลาสมิด คือ pGBKT7-ER α และ pGADT7-SRC1 ด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ คือ T7 sequencing primer (forward primer) – ER α primer (reverse primer) และ T7 sequencing primer (forward primer) – SRC1 primer (reverse primer) ยีสต์โคลนที่ได้รับทั้งสองพลาสมิดจะถูกใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol (E2) ในการทดลองต่อไป

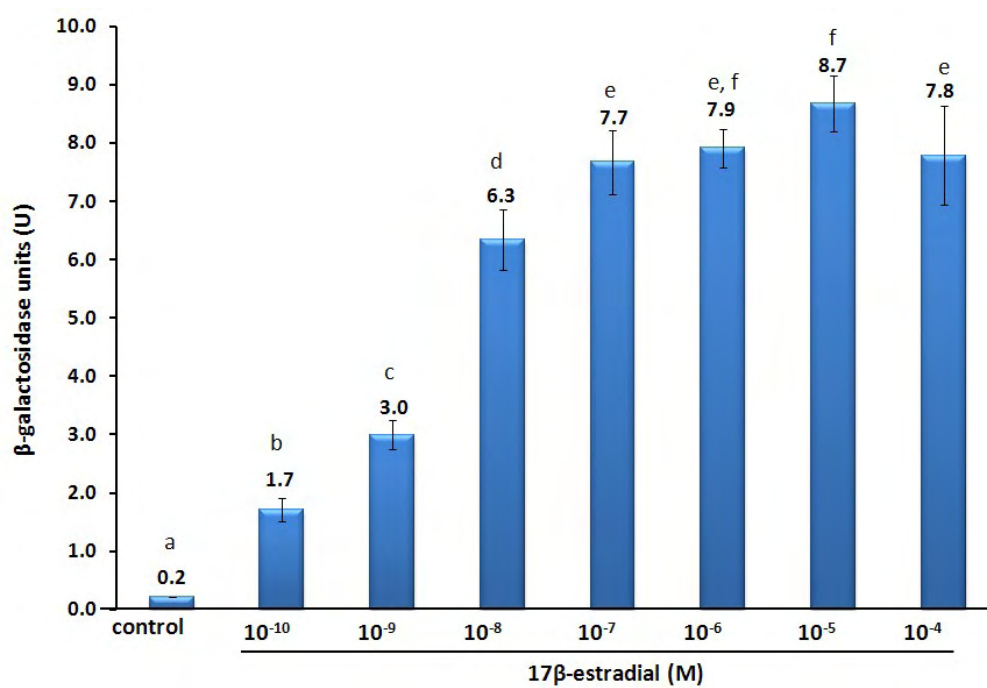


รูปที่ 4-7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ T7 sequencing primer (forward primer) – ER α primer (reverse primer)

4.5 การทดสอบการตรวจวัดเอสโตรเจนของโคลนยีสต์ที่ได้

ในระบบยีสต์ไฮบริด การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีสามารถวัดได้จากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ซึ่งสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น ONPG (ไม่มีสี) เป็นสารสีเหลือง ที่วัดค่าความเข้มแสงได้ที่ความยาวคลื่น 420 nm ดังนั้นหากสารที่ทดสอบสามารถจับกับ ER α -Gal4BD fusion protein ได้ จะมีผลให้เกิดการจับกับ SRC1-Gal4AD fusion protein ซึ่งทำให้เกิดการแสดงออกของยีน β -galactosidase ดังนั้นค่าความเข้มที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 420 nm แปรผันตรงกับเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารทดสอบนั้นๆ

ผลการศึกษาพบว่าโคลนยีสต์ที่ทดสอบสามารถตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol (E2) ที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^{-4} M ได้ โดยมีค่า β -galactosidase units (U) เป็น 0.89 ± 0.45 , 0.96 ± 0.17 , 2.43 ± 0.97 , 4.12 ± 0.78 , 4.68 ± 1.05 , 4.87 ± 0.90 และ 4.26 ± 1.04 ตามลำดับ (รูปที่ 4-8) ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) นอกจากนี้พบว่าค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ 17 β -estradiol เฉพาะในช่วง 10^{-10} M – 10^{-5} M (dose dependent response) แต่หากความเข้มข้นของ 17 β -estradiol เท่ากับ 10^{-4} M พบว่าค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้มีค่าลดลง ซึ่งเกิดจากความเข้มข้นที่สูงเกินไปของ 17 β -estradiol มีความเป็นพิษต่อโคลนยีสต์ (Nishikawa et al., 1999; Jung et al., 2004; Hayashi et al., 2006) โคลนยีสต์ที่ได้นี้สามารถวัดค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol (E2) ได้ต่ำสุดถึง 10^{-10} M ในขณะที่รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้สามารถวัดค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญได้ต่ำสุดที่ 10^{-9} M (Nishikawa et al., 1999; Jung et al., 2004; Hayashi et al., 2006) แสดงถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่าของโคลนยีสต์ที่ได้จากการศึกษานี้ในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตี

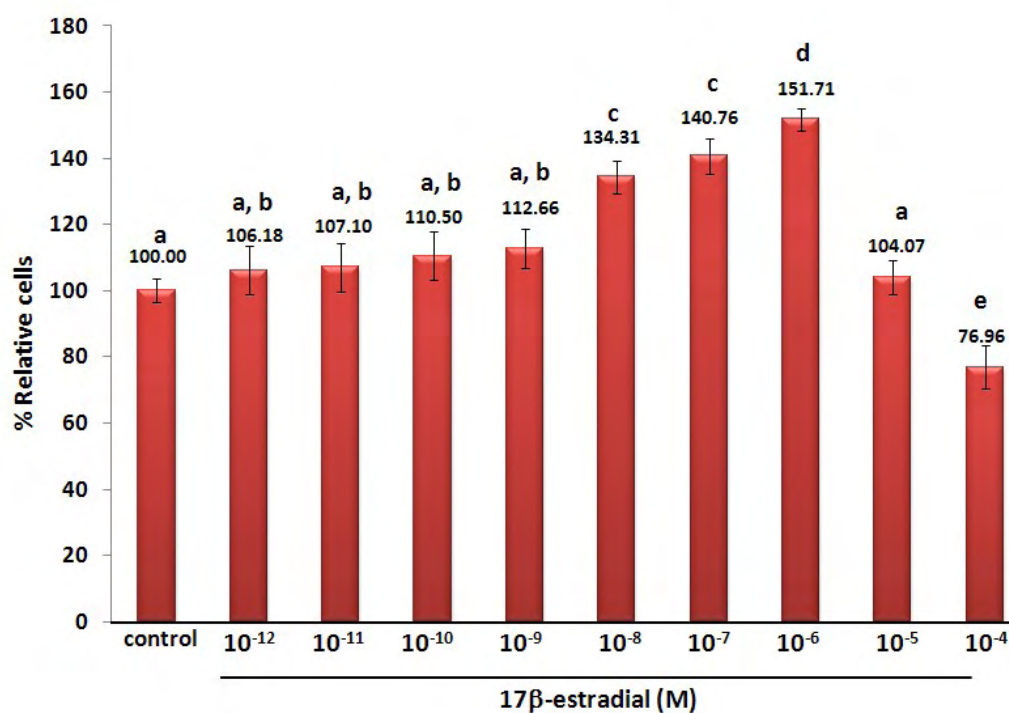


รูปที่ 4-8. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารมาตรฐาน 17β-estradiol ที่ความเข้มข้น 10⁻¹⁰ – 10⁻⁴ M โดยใช้ระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=6, p<0.05)

4.6 การเปรียบเทียบการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของ 17 β -estradiol ด้วยยีสต์ฟูโอบริดและการวัดการเจริญของเซลล์ MCF-7

วิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีจากสารทดสอบเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย คือ การวัดการเจริญของเซลล์ MCF-7 ที่บ่มกับสารทดสอบ โดยหากสารทดสอบสามารถจับกับ ER ที่ผิวเซลล์ของ MCF-7 และสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญของเซลล์ MCF-7 ได้ แสดงถึงเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารทดสอบดังกล่าว อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ความไวในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีไม่สูง (โดยเฉพาะเมื่อบ่มสารกับเซลล์เป็นเวลาเพียง 2 วัน) การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่าใช้จ่ายมากกว่าการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ และระยะเวลาในการทดสอบต้องใช้เวลา 2-6 วันในการวัดการเจริญของเซลล์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทดลองเปรียบเทียบการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารทดสอบสารมาตรฐาน 17 β -estradiol นอกจากนี้ยังได้ทดสอบกับสารสกัดหยาบ (crude extract) จากพืชสมุนไพรที่คาดว่าอาจมีสารไฟโตเอสโตรเจน คือ รากสามสิบและว่านมหาเมฆ

ผลการศึกษาการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol จากการวัดการเจริญของเซลล์ MCF-7 แสดงในรูปที่ 4-9 โดยในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์ MCF-7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (ชุดควบคุม) และอาหารที่มีองค์ประกอบของ 17 β -estradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-12} – 10^{-9} M เป็นเวลา 2 วัน พบว่าสามารถวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของ 17 β -estradiol ได้ในช่วง 10^{-8} – 10^{-6} M โดยวัดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ที่สูงกว่าเซลล์ในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 134.31%, 140.76% และ 151.71% ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้นของ 17 β -estradiol ที่ 10^{-5} – 10^{-4} M พบว่ามีผลการเจริญของเซลล์ โดยมีปริมาณเซลล์ 104.07% และ 76.96% ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวของ 17 β -estradiol มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ผลจากการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Sookvanichsilp และคณะ (2008) ที่รายงานถึงการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของ 17 β -estradiol ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 10^{-8} M 17 β -estradiol จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่ใช้ยีสต์ฟูโอบริดในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 10^{-10} M 17 β -estradiol แสดงให้เห็นว่ายีสต์ฟูโอบริดมีความไวในการตรวจสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีดีกว่า



รูปที่ 4-9. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17β-estradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-12} – 10^{-4} M โดยวัดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ที่บ่มกับสารมาตรฐาน 17β-estradiol เป็นเวลา 2 วัน (n=4, p<0.05)

4.7 การเปรียบเทียบการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดรากสามสิบและว่านมหาเมฆด้วยยีสต์ทูไฮบริด และการวัดการเจริญของเซลล์ MCF-7

สารสกัดหยาบของรากสามสิบและว่านมหาเมฆที่สกัดด้วยเอทานอลถูกนำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีด้วยยีสต์ทูไฮบริดและการวัดการเจริญของเซลล์ MCF-7 ซึ่งข้อมูลของพืชสมุนไพรทั้งสองชนิดมีดังนี้

รากสามสิบ (*Asparagus racemosus* Willd.) มีชื่อท้องถิ่นคือ สาวร้อยฝั้ว ดอกสามสิบ, ต้นสามสิบ, ใบสามสิบ, ผลสามสิบ, รากสามสิบ, ผักหนาม, เตอสีเบาะ, ผักชีช้าง, พอกวายเมะ, สามร้อยราก, จ้วงเครือ, เตอสีเบาะ, ผักชีช้าง, ผักหนาม, สามร้อยราก, สามสิบ มีสรรพคุณบรรเทาอาการภาวะประจำเดือนไม่ปกติ ปวดประจำเดือน ภาวะมีบุตรยาก ตกขาว ภาวะหมดอารมณ์ทางเพศ ภาวะหมดประจำเดือน บำรุงน้ำนม บำรุงครรภ์ และป้องกันการแท้ง (รูปที่ 4-10)

ว่านมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa* Roxb) มีชื่อท้องถิ่นคือ อวแดง, กระเจียวแดง และขมิ้นดำ จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชตระกูลเดียวกับขิง-ข่า มีหัวหรือเหง้าอยู่ใต้ดิน หัวมีกลิ่นคล้ายขิง-ข่า มีสรรพคุณตามตำรับยาสมุนไพรไทยคือ ช่วยระดมดลูก กระชับช่องคลอด สมานแผลหลังผ่าตัดคลอดดลูก ปรับสภาพมดลูกให้มีโอกาสตั้งครรภ์ บำรุงเต้านมให้เต่งตึง แก้ปวดมดลูก แก้มดลูกอักเสบ ขับระดูขาว แก้ฟ่อน้ำดำ ขับน้ำคาวปลาแทนการอยู่ไฟ เพิ่มน้ำนมสำหรับเลี้ยงทารก และบำรุงผิวพรรณให้เปล่งปลั่ง (รูปที่ 4-11)



รูปที่ 4-10 ส่วน rhizomes ของต้นรากสามสิบ

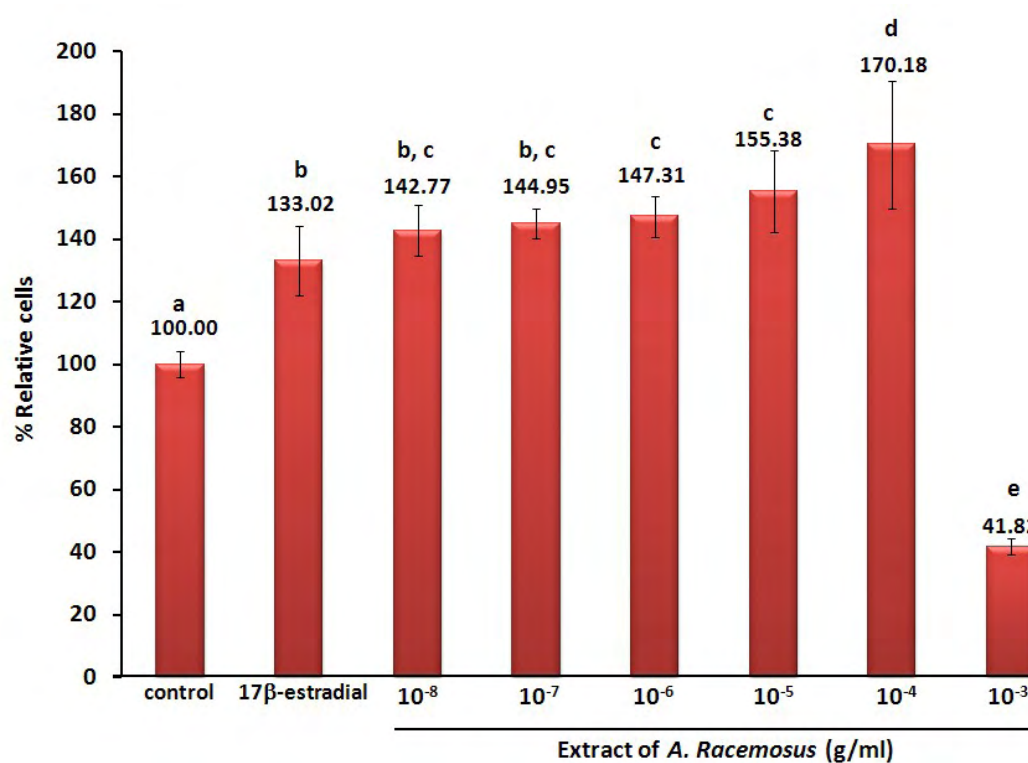


รูปที่ 4-11 ส่วนหัวของว่านมหาเมฆ

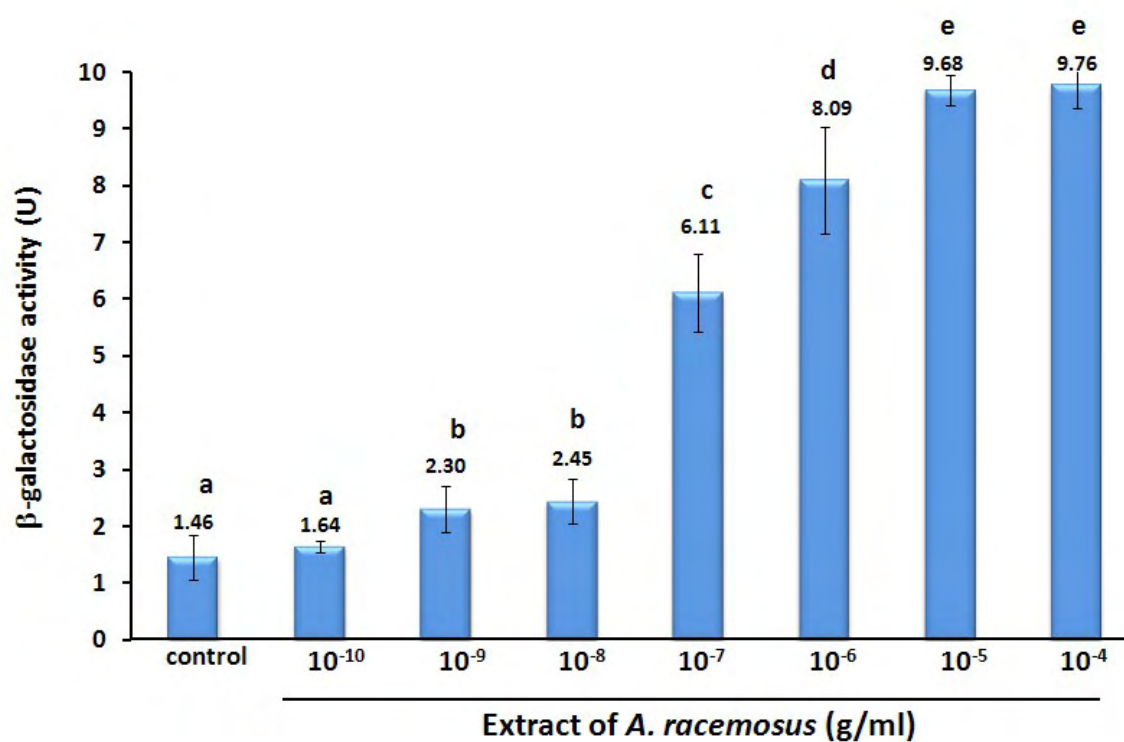
สารสกัดหยาบรากสามสิบได้จากการนำส่วน Rhizome ของต้นรากสามสิบมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °ซ จนแห้ง นำบดให้ละเอียดและนำไปสกัดด้วย 80% เอทานอล นำสารสกัดดังกล่าวไประเหยเอทานอล และทำให้แห้งโดยการ lyophilization สารสกัดหยาบที่ได้จะละลายใน DMSO เมื่อต้องการใช้

ผลการศึกษการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากรากสามสิบด้วยการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 แสดงดังรูปที่ 4-12 พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากรากสามสิบเป็นเวลา 2 วัน สารสกัดหยาบรากสามสิบที่ความเข้มข้น $10^{-8} - 10^{-4}$ g/ml มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MCF-7 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีสารสกัด) โดยสารสกัดหยาบรากสามสิบที่ความเข้มข้น 10^{-4} g/ml มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงที่สุด คือ 170.18 % แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 10^{-3} g/ml พบว่ามีผลปริมาณเซลล์ลดลงเหลือ 41.82 % เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งคาดว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวสารสกัดหยาบรากสามสิบมีความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากรากสามสิบโดยใช้ระบบยีสต์ยูไฮบริดแสดงในรูปที่ 4-13 ในการทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของรากสามสิบที่ความเข้มข้นดังนี้ $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในสารสกัดหยาบรากสามสิบมีค่า β -galactosidase activity (U) เป็น 1.64 ± 0.15 , 2.30 ± 0.36 , 2.45 ± 0.36 , 6.11 ± 0.69 , 8.09 ± 0.95 , 9.68 ± 0.27 และ 9.76 ± 0.39 ตามลำดับ (รูปที่ 4-13) ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเมื่อใช้สารสกัดหยาบรากสามสิบในช่วง $10^{-9} - 10^{-4}$ g/ml โดยค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบรากสามสิบ (dose dependent response) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงถึงความไวของยีสต์ยูไฮบริดที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดรากสามสิบ เท่ากับ 1×10^{-9} g/ml



รูปที่ 4-12. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบจากรากสามสิบที่ความเข้มข้น $10^{-8} - 10^{-3}$ g/ml โดยวัดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ที่บ่มกับสารสกัดหยาบจากรากสามสิบเป็นเวลา 2 วัน ($n=4$, $p<0.05$)

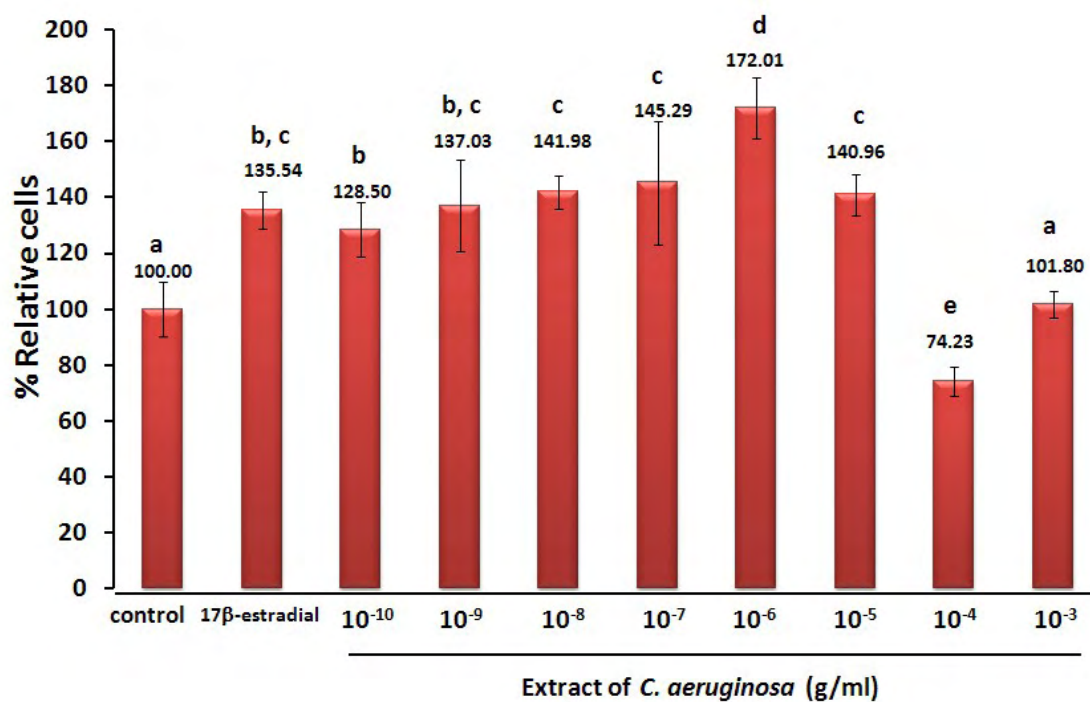


รูปที่ 4-13. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบจากรากสามสิบที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^4 g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=4, p<0.05)

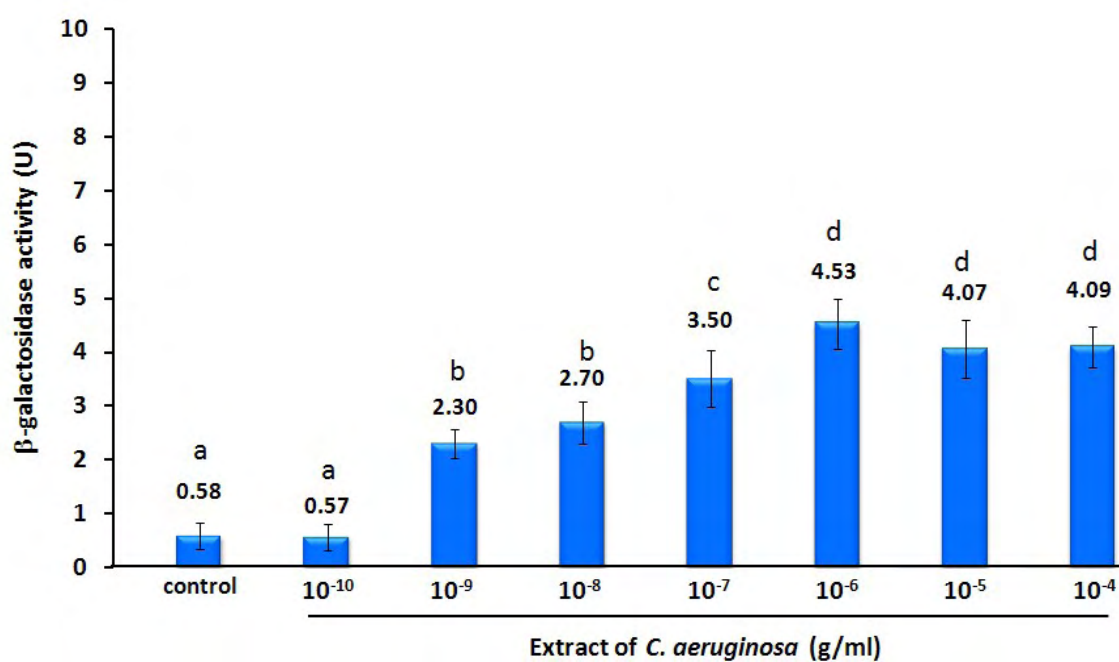
สำหรับสารสกัดหยาบว่านมหาเมฆ ได้จากการนำส่วน Rhizome ของว่านมหาเมฆมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °ซ จนแห้ง นำบดให้ละเอียดและนำไปสกัดด้วย 80% เอทานอล นำสารสกัดดังกล่าวไประเหยเอทานอล และทำให้แห้งโดยการ lyophilization สารสกัดหยาบที่ได้จะละลายใน DMSO เมื่อต้องการใช้

ผลการศึกษาการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆด้วยการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 แสดงดังรูปที่ 4-14 พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากว่านมหาเมฆเป็นเวลา 2 วัน สารสกัดหยาบว่านมหาเมฆที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-6}$ g/ml มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MCF-7 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีสารสกัด) โดยสารสกัดหยาบว่านมหาเมฆที่ความเข้มข้น 10^{-6} g/ml มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงที่สุด คือ 172.01 % แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น $10^{-5} - 10^{-3}$ g/ml พบว่ามีผลลดปริมาณเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งคาดว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวสารสกัดหยาบว่านมหาเมฆมีความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆโดยใช้ระบบยีสต์ยูไฮบริดแสดงในรูปที่ 4-15 ในการทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของว่านมหาเมฆที่ความเข้มข้นดังนี้ $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในสารสกัดหยาบว่านมหาเมฆมีค่า β -galactosidase activity (U) เป็น $0.57 \pm 0.30, 2.30 \pm 0.26, 2.70 \pm 0.39, 3.50 \pm 0.52, 4.53 \pm 0.46, 4.07 \pm 0.54$ และ 4.09 ± 0.39 ตามลำดับ (รูปที่ 4-15) ซึ่งเมื่อใช้สารสกัดหยาบว่านมหาเมฆในช่วง $10^{-9} - 10^{-6}$ g/ml ค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม แต่ที่ความเข้มข้น 10^{-10} g/ml ค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้ค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบว่านมหาเมฆในช่วง $10^{-9} - 10^{-6}$ g/ml (dose dependent response) แต่ที่ $10^{-5} - 10^{-4}$ g/ml พบว่ามีเอสโตรเจนแอกติวิตีลดลงซึ่งน่าจะเกิดจากความเป็นพิษของสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงถึงความไวของยีสต์ยูไฮบริดที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดว่านมหาเมฆเท่ากับ 1×10^{-9} g/ml



รูปที่ 4-14. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^{-3} g/ml โดยวัดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ที่บ่มกับสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆเป็นเวลา 2 วัน (n=4, p<0.05)



รูปที่ 4-15. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคทีวี่ของสารสกัดหยาบจากว่านมหาเมฆที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^4 g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=4, p<0.05)

4.8 การใช้ระบบยีสต์ทุไฮบริดที่ได้ในการทดสอบการวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสมุนไพรที่มีจำหน่ายบางชนิด

ในการศึกษานี้ยังได้ใช้ระบบยีสต์ทุไฮบริดที่ได้ในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสมุนไพรที่มีจำหน่ายอีก 4 ชนิด ได้แก่ โกฐหัวบัว โกฐเขมา โกฐสอ และดอกคำฝอย นอกจากนี้ยังได้ตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีในยาดำรับ/ผลิตภัณฑ์ 3 ชนิด ได้แก่ ยาเม็ดสตรีโปเซีย ยารอบชมพูทวีป และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกวางเครือศักดิ์พิศ ซึ่งสมุนไพรและยาดำรับ/ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีสรรพคุณเกี่ยวกับการบรรเทาอาการประจำเดือนมดลูกผิดปกติ หรือเพิ่มขนาดทรงอก ซึ่งสันนิษฐานว่าสมุนไพรและ/ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจมีเอสโตรเจนแอคติวิตี โดยในการศึกษานี้ได้ทดสอบระบบยีสต์ทุไฮบริดกับหัวผักกาดขาวที่ไม่มีรายงานถึงเอสโตรเจนแอคติวิตีด้วยเพื่อใช้เป็นพืชในชุดควบคุม สำหรับสมุนไพรและยาดำรับ/ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษามีรายละเอียดดังนี้

1) โกฐหัวบัว



ชื่อทั่วไป: โกฐหัวบัว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Conioselinum univittatum* Trucz

สรรพคุณ: มีกลิ่นหอม รสมัน สรรพคุณแก้ลมในกองริดสีดวง มีฤทธิ์ช่วยการไหลเวียนของเลือด รักษาอาการปวดจากเลือดคั่ง กระจายการตีบของเส้นเลือด ประจำเดือนมาไม่เป็นปกติ ปวดประจำเดือน ขับน้ำคาวปลาหลังคลอด เจ็บชายโครง เจ็บบริเวณหัวใจ เจ็บหน้าอก เจ็บจากการฟกช้ำ ช้ำบวมจากฝีหนอง และมีฤทธิ์ขับลม บรรเทาปวด รักษาอาการปวดศีรษะ

(ที่มา: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; คู่มือการใช้สมุนไพรไทย-จีน)

2) โกฐเขมา



ชื่อทั่วไป : โกฐเขมา

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Atractylodes lancea* Thunb.

สรรพคุณ : มีกลิ่นหอม รสร้อน ใช้เป็นยาบำรุงธาตุ แก้โรคเข้าข้อ แก้โรคในปาก เป็นยาเจริญอาหาร ยาขับปัสสาวะ มีฤทธิ์ขับลมและความชื้น แก้โรคในปากในคอ ระงับอาการหอบ แก้หัดคัดจุมูก แก้ไข้ แก้เหงื่อออกมากและแก้ไข้รากสาครือรัง

(ที่มา: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; คู่มือการใช้สมุนไพรไทย-จีน)

3) โกงฐสอ



ชื่อทั่วไป : โกงฐสอ (ทั่วไป); โกงฐสอจีน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Angelica sylvestris* Linn.

สรรพคุณ : มีกลิ่นหอม รสขมมัน มีฤทธิ์ขับเหงื่อ แก้ไข้ แก้หืด แก้ไอ บำรุงหัวใจ แก้เสมหะเป็นพิษ แก้สะอึก แก้หลอดลมอักเสบ แก้ไข้จับสั่น แก้อาการหวัดจากการกระทบลมเย็นภายนอก ปวดศีรษะ คัดจมูก บรรเทาปวด แก้อาการปวดศีรษะโดยเฉพาะอาการปวดศีรษะด้านหน้า ปวดฟัน ลดอาการคัดจมูกจากไข้หวัดหรือโรคโพรงอากาศอักเสบ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ลดบวม ขับหนอง แก้พิษแผลฝีหนอง บวมเป็นพิษ (ที่มา: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; คู่มือการใช้สมุนไพรไทย-จีน)

4) ดอกคำฝอย



ชื่อทั่วไป : ดอกคำฝอย, ดอกคำ, ดอกคำยอง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Carthamus tinctorius* Linn.

สรรพคุณ : ขับระดู บำรุงประสาท บำรุงหัวใจ แก้ดีพิการ ขับเหงื่อ ระบายประสาท บำรุงโลหิต ช่วยให้เลือดหมุนเวียน กระจายเลือดคั่ง ลดบวม ระบายปวด แก้ฟกช้ำ ช้ำใน เส้นเลือดหัวใจตีบ เจ็บ ปวด แน่นบริเวณหัวใจ แก้ผื่นแดง เลือดคั่งเนื่องจากภาวะร้อน แก้ตกเลือด แก้ไข้ในเด็ก แก้คิซ่าน แก้ไขข้ออักเสบ แก้หวัด น้ำมูกไหล แก้ปวดในรอบเดือน

(ที่มา: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ)

5) ยาเม็ดสตรีโปเซียม



ส่วนประกอบของตัวยา : เอื้อเซียม, เสีงทุ,แปะเจียก, โต้วตั้ง, เนกกุ้ย, ฮัวเอียะ, ตั้งกุยบ้วยซุฟ้วย, พั่วกู่จั่ว และ ฮวงเกียก

สรรพคุณ : ใช้สำหรับสตรีที่รอบเดือนมาไม่ปกติ

6) ปราบชมพู่ทวีป



ส่วนประกอบของตัวยา : หัสคุณเทศ, เหงือกปลาหมอ, พริกไทยดำ และ ใบกัญชาเทศ

สรรพคุณ : ช่วยให้การไหลเวียนของเลือด ดีขึ้น แก้แพ้อากาศ คัดจมูก หอบหืด แก้ปวดประจำเดือน

7) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกาวเครือสกัดคัพดี



ส่วนประกอบ : สารสกัดตั้งกุย, สารสกัดจากหอยนางรม, แอสคอร์บิต แอซิด, สารสกัดจากโปรตีนถั่วเหลือง, สารสกัดจากเมล็ดทับทิม, สารสกัดจากเปลือกส้ม และ สารสกัดจากกาวเครือขาว

สรรพคุณ : บำรุงโลหิต ช่วยให้ประจำเดือนมาปกติ แก้ปวดประจำเดือน ช่วยบรรเทาอาการปวดหัว ปวดเมื่อยตามเนื้อตัว กระตุ้นการไหลเวียนโลหิต บำรุงโลหิต กระตุ้นให้ออกขยายใหญ่ขึ้น ช่วยสมานแผล และด้านการอักเสบ ปรับสมดุลของร่างกาย

8) หัวผักกาดขาว

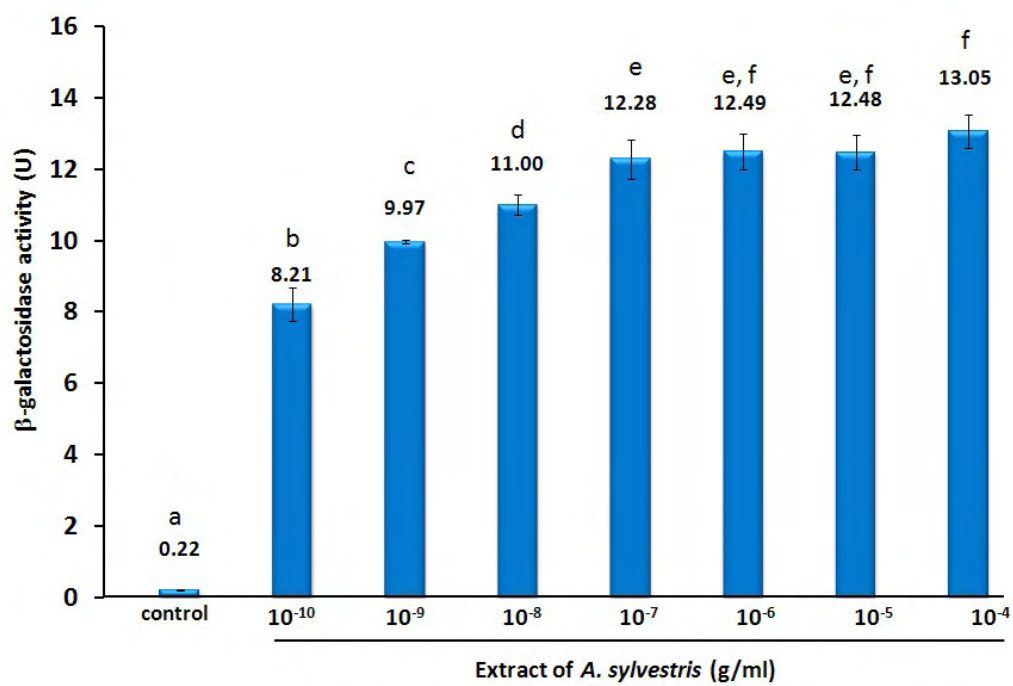


ชื่อวิทยาศาสตร์: *Raphanus sativus* Linn

สรรพคุณ : มีรสเผ็ดหวาน คุณสมบัติเย็น ช่วยย่อย แก้อาการท้องอืด ไม่มีเสียง อาเจียนเป็นโลหิต ท้องเสีย ช่วยล้างพิษ ส่งเสริมการทำงานของตับและระบบย่อยอาหาร

4.8.1 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของโกฐสอ

ในการศึกษานี้ ได้นำผงโกฐสอมาแช่ในน้ำอุ่นเป็นเวลา 30 นาที และทำให้แห้งโดยการ lyophilization ผงของสารสกัดหยาบของโกฐสอที่ได้ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ g/ml และนำไปทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของโกฐสอด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริดแสดงในรูปที่ 4-16 พบว่าสารสกัดหยาบของโกฐสอทุกความเข้มข้นตรวจพบว่ามีเอสโตรเจนแอกติวิตี โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 8.21 ± 0.48 , 9.97 ± 0.06 , 11.00 ± 0.28 , 12.28 ± 0.55 , 12.49 ± 0.50 , 12.48 ± 0.48 และ 13.05 ± 0.47 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) และค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดโกฐสอ (dose dependent response) ดังนั้นความไวของยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดโกฐสอ คือ 1×10^{-10} g/ml เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของรากสามสิบและว่านมหาเมฆในค่าความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดหยาบของโกฐสอมีค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีสูงที่สุด

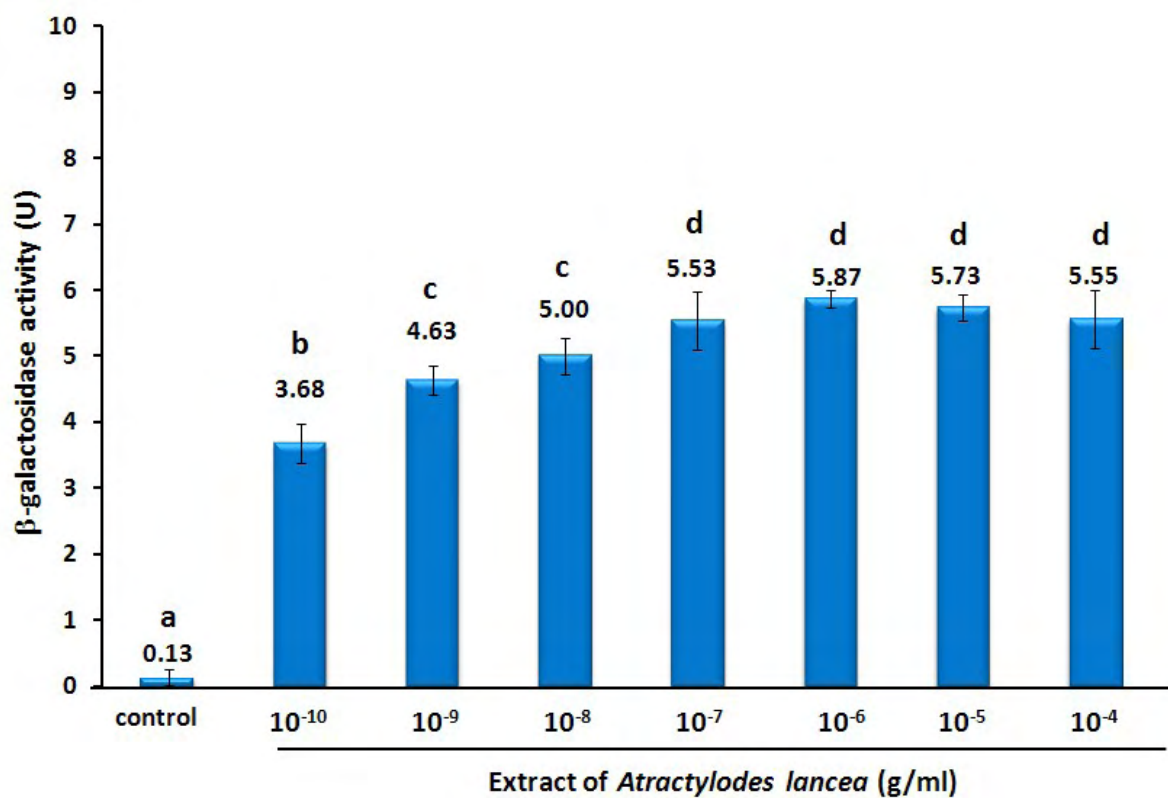


รูปที่ 4-16. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบจากโกฐสอที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^4 g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=5, p<0.05)

4.8.2 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบของโกฐเขมา

ในการศึกษานี้ได้ทำการสกัดสารจากผงโกฐเขมาด้วยวิธีเดียวกับการสกัดสารจากผงโกฐสอ กล่าวคือได้นำผงโกฐเขมาแช่ในน้ำอุ่นเป็นเวลา 30 นาที และทำให้แห้งโดยการ lyophilization ผงของสารสกัดหยาบของโกฐเขมาที่ได้ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ g/ml และนำไปทดสอบ เอสโตรเจนแอคติวิตีด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม

ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบของโกฐเขมาด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริดแสดง ในรูปที่ 4-17 พบว่าสารสกัดหยาบของโกฐเขมาที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml มีเอสโตรเจนแอคติวิตีซึ่งวัดได้จาก β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 3.68 ± 0.29 , 4.63 ± 0.22 , 5.00 ± 0.27 , 5.53 ± 0.44 , 5.87 ± 0.13 , 5.73 ± 0.20 และ 5.55 ± 0.44 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (DMSO) โดยค่าเอสโตรเจนแอคติวิตีที่วัดได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดโกฐเขมา (dose dependent response) ดังนั้นความไวของยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดโกฐเขมา คือ 1×10^{-10} g/ml หากเปรียบเทียบค่า β -galactosidase activity ของสารสกัดหยาบของโกฐเขมาและโกฐสอที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าโกฐสอมีค่าที่สูงกว่า

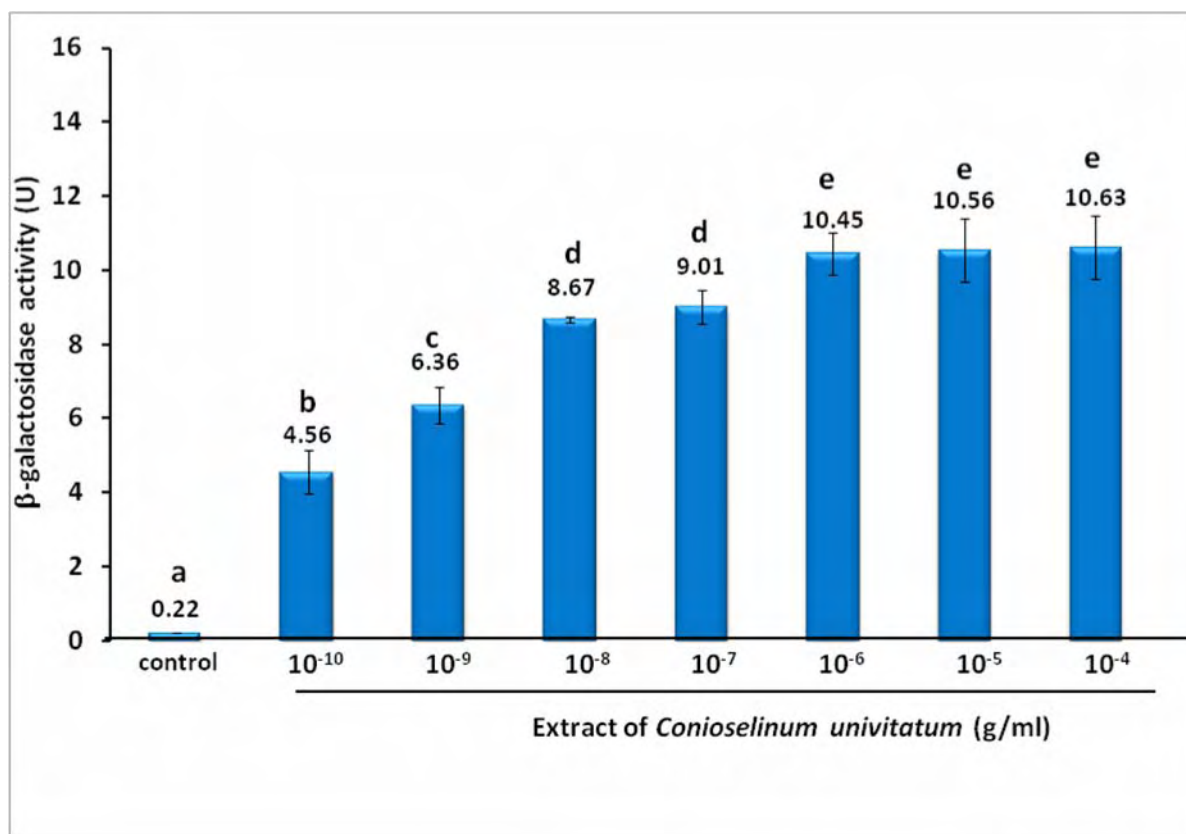


รูปที่ 4-17. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบจากโกฐเขมาที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริด (n=5, p<0.05)

4.8.3 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบของโกฐหัวบัว

การสกัดสารจากผงโกฐหัวบัวใช้วิธีเดียวกับการสกัดสารจากผงโกฐสอและโกฐเขมา กล่าวคือนำผงโกฐหัวบัวมาแช่ในน้ำอุ่นเป็นเวลา 30 นาที และทำให้แห้งโดยการ lyophilization ผงของสารสกัดหยาบของโกฐหัวบัวที่ได้ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml แล้วทดสอบเอสโตรเจนแอคติวิตีด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริด โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม

ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบของโกฐหัวบัวด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริดแสดงในรูปที่ 4-18 เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในสารสกัดหยาบของโกฐหัวบัวที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml พบว่ามีค่า β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 4.56 ± 0.60 , 6.36 ± 0.48 , 8.67 ± 0.08 , 9.01 ± 0.45 , 10.45 ± 0.58 , 10.56 ± 0.86 และ 10.63 ± 0.87 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม และค่าเอสโตรเจนแอคติวิตีที่วัดได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดโกฐหัวบัวในช่วง $10^{-10} - 10^{-6}$ g/ml (dose dependent response) ดังนั้นความไวของยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดโกฐหัวบัว คือ 10^{-10} g/ml

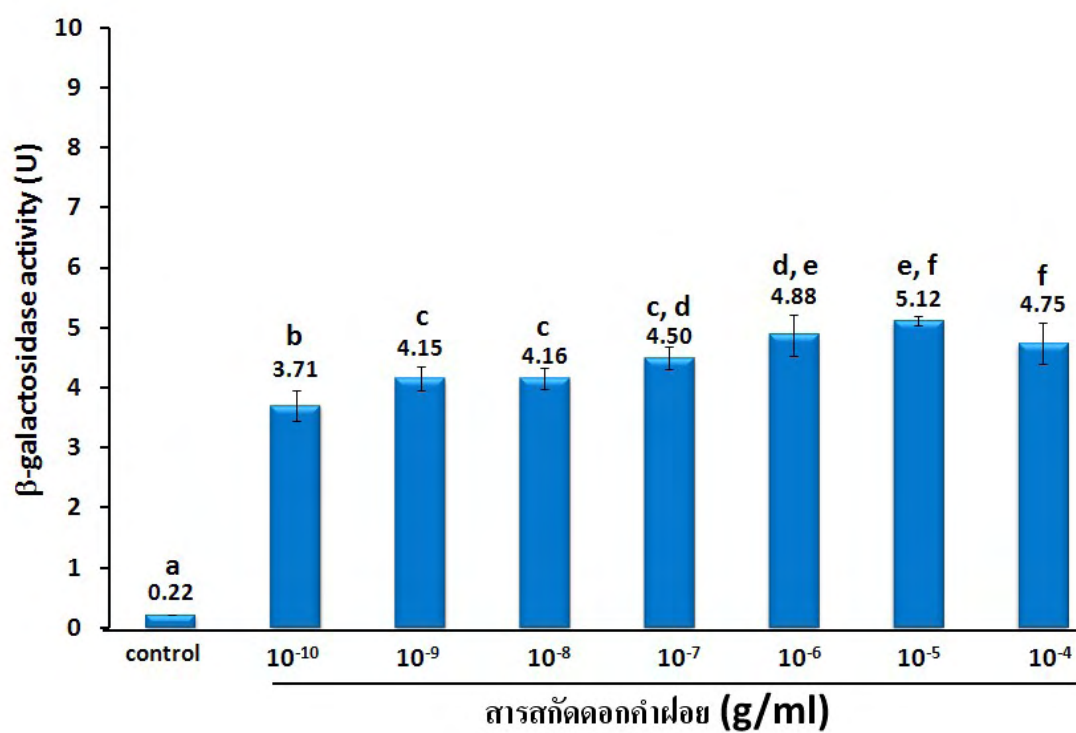


รูปที่ 4-18. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบจากโกฐหัวบัวที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^4 g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=5, $p<0.05$)

4.8.4 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของดอกคำฝอย

สกัดสารจากดอกคำฝอย โดยนำดอกคำฝอยแห้งมาแช่ในน้ำอุ่นเป็นเวลา 30 นาที และทำให้แห้งโดยการ lyophilization ผงของสารสกัดหยาบของดอกคำฝอยที่ได้ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml แล้วทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม

ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของดอกคำฝอยด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด แสดงในรูปที่ 4-19 เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในสารสกัดหยาบของดอกคำฝอยที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml พบว่ามีค่า β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 3.71 ± 0.20 , 4.15 ± 0.20 , 4.16 ± 0.18 , 4.50 ± 0.18 , 4.88 ± 0.34 , 5.12 ± 0.08 และ 4.75 ± 0.35 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) และค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดดอกคำฝอยในช่วง $10^{-10} - 10^{-5}$ g/ml (dose dependent response) หากความเข้มข้นของสารสกัดดอกคำฝอยสูงขึ้น 10^{-4} g/ml พบว่าค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีลดลงซึ่งน่าจะเกิดจากความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ สำหรับความไวของยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดดอกคำฝอย คือ 10^{-10} g/ml

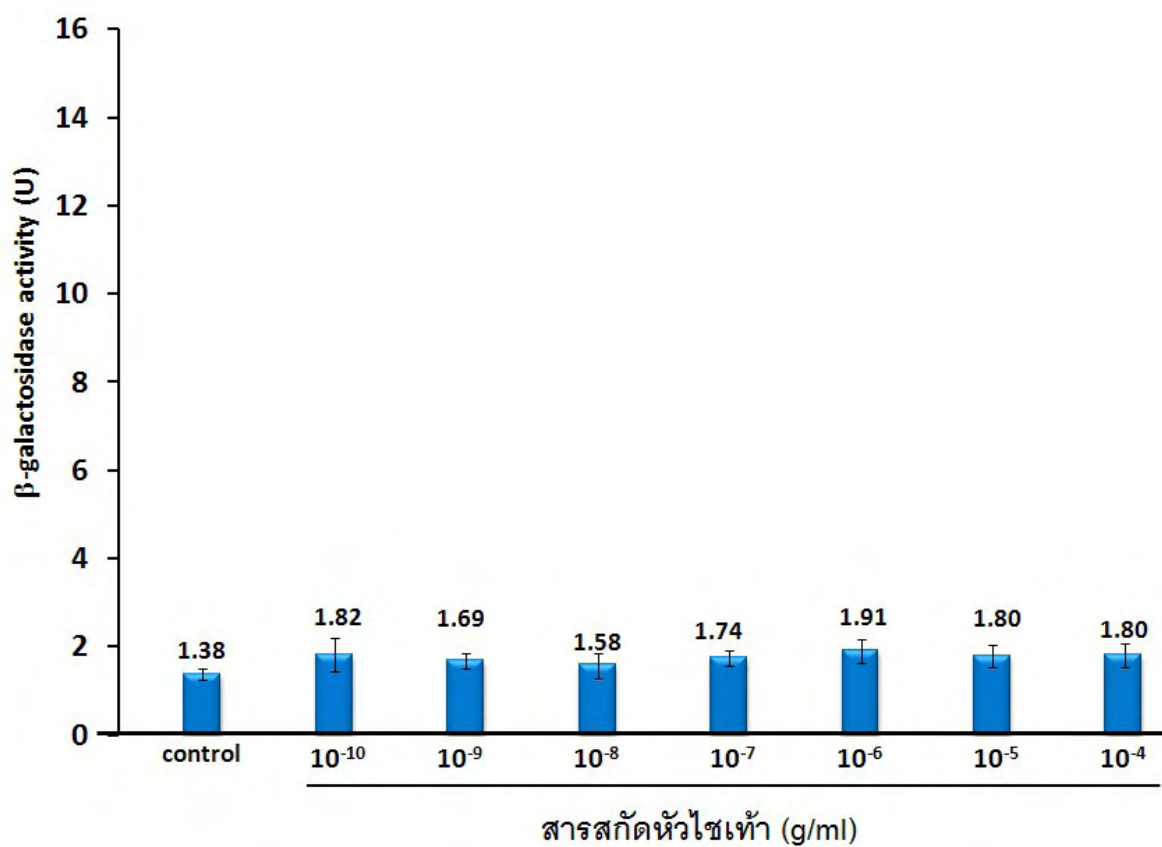


รูปที่ 4-19. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากดอกคำฝอยที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^4$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=5, p<0.05)

4.8.5 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของหัวไข่เต่า

ในการศึกษานี้ได้ใช้หัวไข่เต่าเป็นพืชควบคุม ซึ่งการสกัดสารจากหัวไข่เต่าทำโดยนำหัวไข่เต่าสดมาบดให้ละเอียดในน้ำกลั่น กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดกากหยาบ และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษ Whatman แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้งโดยการ lyophilization ผงของสารสกัดหยาบของหัวไข่เต่าที่ได้ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml แล้วทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริด โดยมี DMSO เป็นชุดควบคุม

ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของหัวไข่เต่าด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริดแสดงในรูปที่ 4-20 เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในสารสกัดหยาบของหัวไข่เต่าที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml พบว่ามีค่า β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 1.82 ± 0.39 , 1.69 ± 0.18 , 1.58 ± 0.29 , 1.74 ± 0.17 , 1.91 ± 0.27 , 1.80 ± 0.24 และ 1.80 ± 0.28 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) แสดงว่าสารสกัดหยาบของหัวไข่เต่าที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml ไม่มีเอสโตรเจนแอกติวิตี

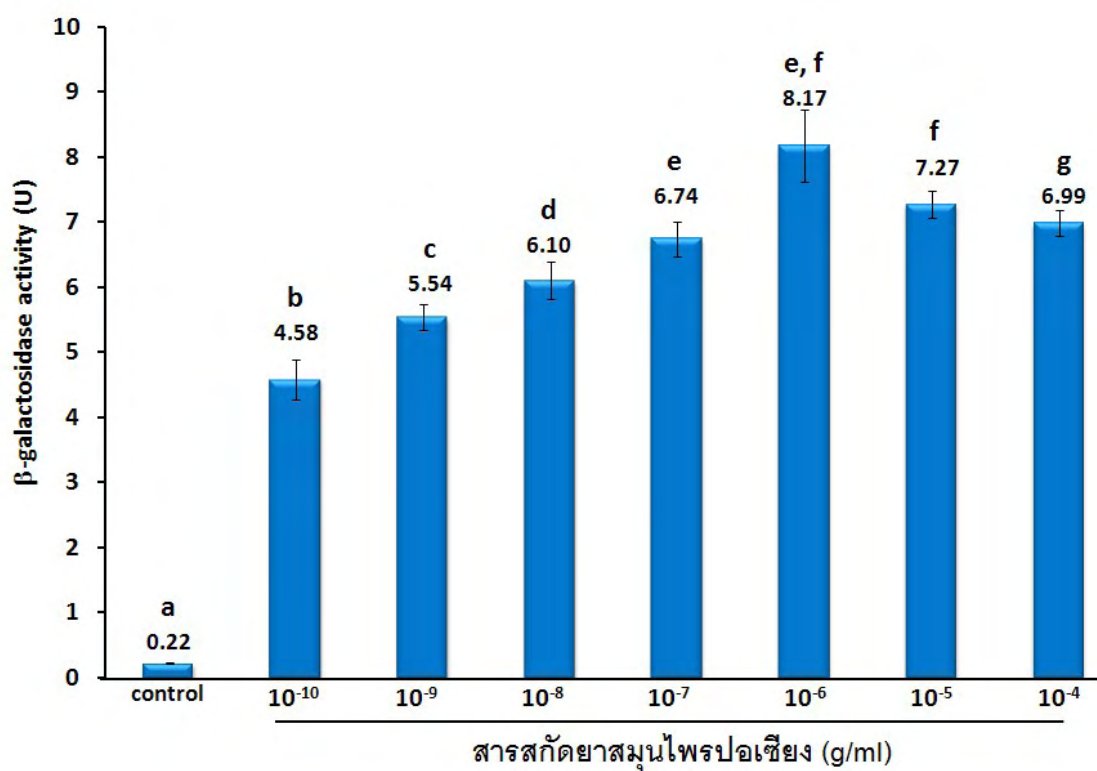


รูปที่ 4-20. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบจากหัวไข่เท้าที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^4 g/ml ด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริด (n=5, p<0.05)

4.8.6 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของยาสมุนไพรโปเซีย

ยาสมุนไพรโปเซียเป็นยาสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของตัวยาคือ เอียเซียม, เอียงทุ, เปะเจียก, โต้วตัง, เนกกุ้ย, ฮัวเอียะ, ตังกุยบัวชูฟวย, พักกุ๊จู้ และฮวงเกียง สำหรับการสกัดสารจากยาสมุนไพรโปเซีย ทำโดยนำเมล็ดยาสมุนไพรดังกล่าวบดให้ละเอียดและนำมาสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 นาที และทำให้แห้งโดยการ lyophilization เมื่อนำสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรโปเซียที่ได้ไปทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตี ได้ละลายสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรโปเซียใน DMSO ที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml การทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริดนี้ใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรโปเซียด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริดแสดงในรูปแบบที่ 4-21 เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตไซด์ในสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรโปเซียที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml พบว่ามีค่า β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 4.58 ± 0.30 , 5.54 ± 0.20 , 6.10 ± 0.29 , 6.74 ± 0.27 , 8.17 ± 0.55 , 7.27 ± 0.21 และ 6.99 ± 0.20 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) ทั้งนี้ค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรโปเซียในช่วง 10^{-10} - 10^{-6} g/ml แต่ค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีลดลงที่ความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-4} g/ml ความไวของยีสต์ทูไฮบริดในการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดยาสมุนไพรโปเซีย คือ 1×10^{-10} g/ml

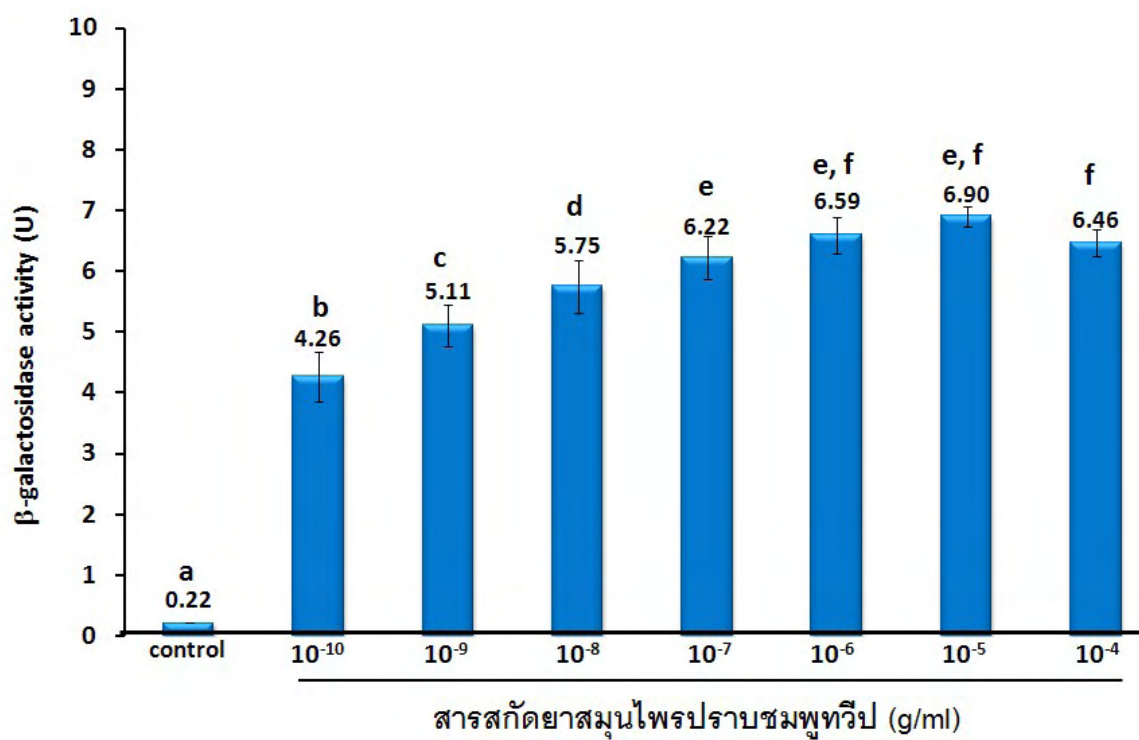


รูปที่ 4-21. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคทีวี่ของยาสมุนไพรโปเซียที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ซูไฮบริด (n=5, p<0.05)

4.8.7 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของยาสมุนไพรปราบชมพูทวีป

ยาสมุนไพรปราบชมพูทวีปเป็นยาสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของตัวยาคือ หัสคุณเทศ, เหงือกปลาหมอ, พริกไทยดำ และ ใบกะฉันทเทศ สำหรับการสกัดสารจากยาสมุนไพรปราบชมพูทวีป ทำโดยนำเม็ดยาสมุนไพรดังกล่าวบดให้ละเอียดและนำมาสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 นาที และทำให้แห้งโดยการ lyophilization เมื่อนำสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรปราบชมพูทวีปที่ได้ไปทดสอบเอสโตรเจนแอคติวิตี ได้ละลายสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรปราบชมพูทวีปใน DMSO ที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml การทดสอบเอสโตรเจนแอคติวิตีด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริดนี้ใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรปราบชมพูทวีปด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริดแสดงในรูปที่ 4-22 เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรปราบชมพูทวีปที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml พบว่ามีค่า β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 4.26 ± 0.41 , 5.11 ± 0.34 , 5.75 ± 0.43 , 6.22 ± 0.35 , 6.59 ± 0.29 , 6.90 ± 0.17 และ 6.46 ± 0.22 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) ทั้งนี้ค่าเอสโตรเจนแอคติวิตีที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรปราบชมพูทวีปในช่วง 10^{-10} - 10^{-7} g/ml แต่ค่าเอสโตรเจนแอคติวิตีคงที่และลดลงที่ความเข้มข้น 10^{-6} - 10^{-4} g/ml ความไวของยีสต์ยูไฮบริดในการวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของสารสกัดยาสมุนไพรปราบชมพูทวีป คือ 1×10^{-10} g/ml

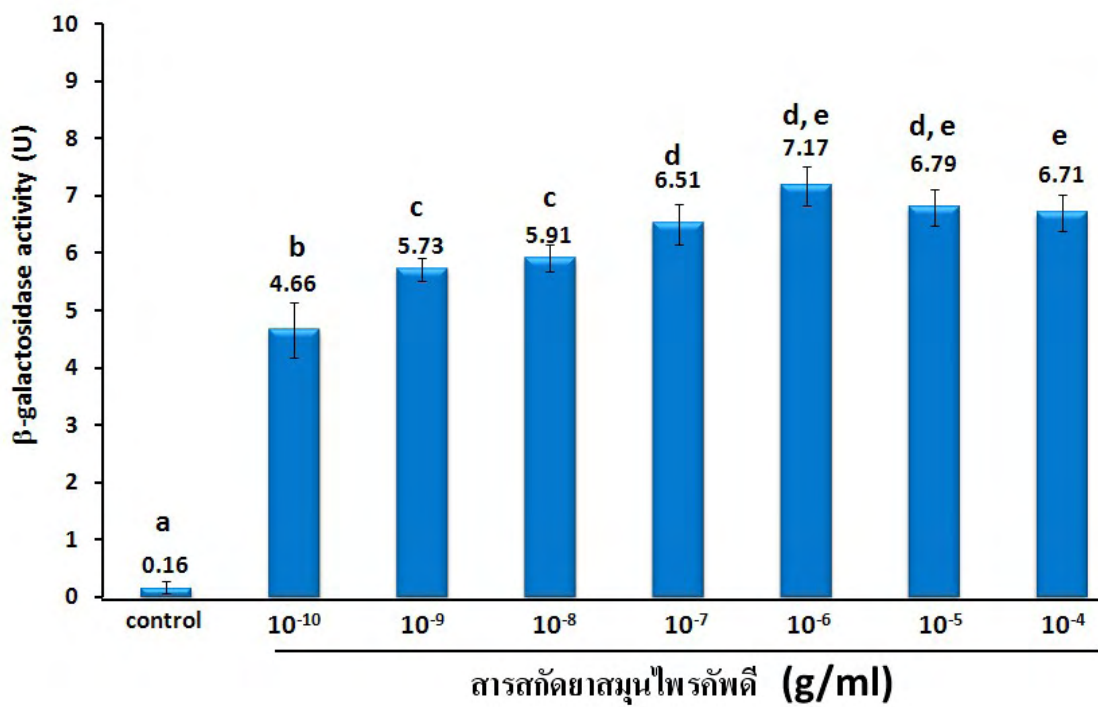


รูปที่ 4-22. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของยาสมุนไพรโปเชียงที่ความเข้มข้น $10^{-10} - 10^{-4}$ g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=5, p<0.05)

4.8.8 การตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของยาสมุนไพร

ยาสมุนไพรเป็นยาสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของตัวยาคือ สารสกัดตั้งกุย, สารสกัดจากหอยนางรม, แอสคอร์บิต แอซิด, สารสกัดจากโปรตีนถั่วเหลือง, สารสกัดจากเมล็ดทับทิม, สารสกัดจากเปลือกส้ม และสารสกัดจากกวาวเครือขาว สำหรับการสกัดสารจากยาสมุนไพรทำโดยนำเม็ดยาสมุนไพรดังกล่าวบดให้ละเอียดและนำมาสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 นาที และทำให้แห้งโดยการ lyophilization เมื่อนำสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรที่ได้ไปทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตี ได้ละลายสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรใน DMSO ที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml การทดสอบเอสโตรเจนแอกติวิตีด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริดนี้ใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

ผลการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรด้วยระบบยีสต์ยูไฮบริดแสดงในรูปที่ 4-23 เมื่อตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตไซด์ในสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml พบว่ามีค่า β -galactosidase activity (U) เท่ากับ 4.66 ± 0.48 , 5.73 ± 0.20 , 5.91 ± 0.23 , 6.51 ± 0.35 , 7.17 ± 0.34 , 6.79 ± 0.31 และ 6.71 ± 0.31 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (DMSO) ทั้งนี้ค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของยาสมุนไพรในช่วง 10^{-10} - 10^{-6} g/ml แต่ค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีคงที่และลดลงที่ความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-4} g/ml ความไวของยีสต์ยูไฮบริดในการวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดยาสมุนไพร คือ 1×10^{-10} g/ml

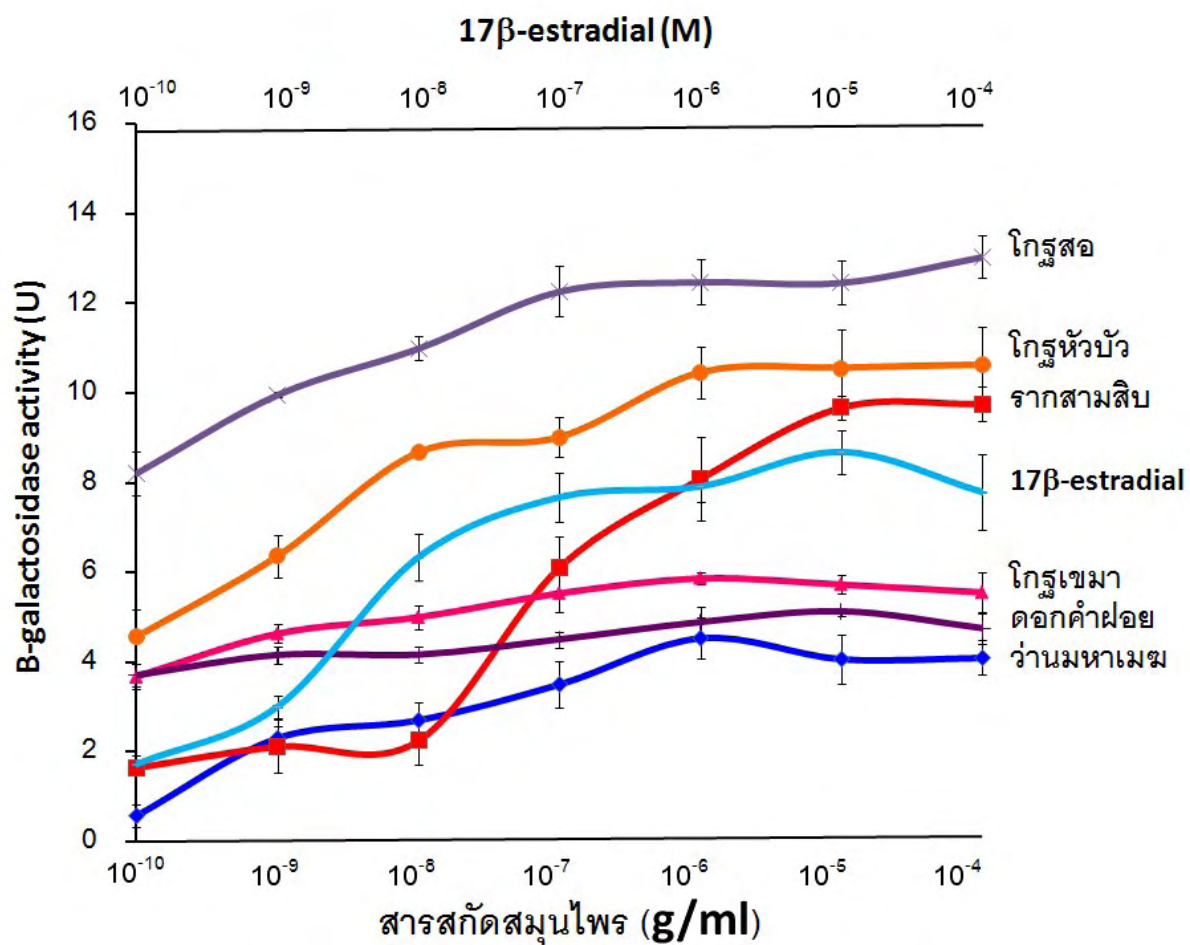


รูปที่ 4-23. การตรวจวัดเอสโตรเจนแอคติวิตีของยาสมุนไพรไพธัฟดีที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^4 g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด (n=5, p<0.05)

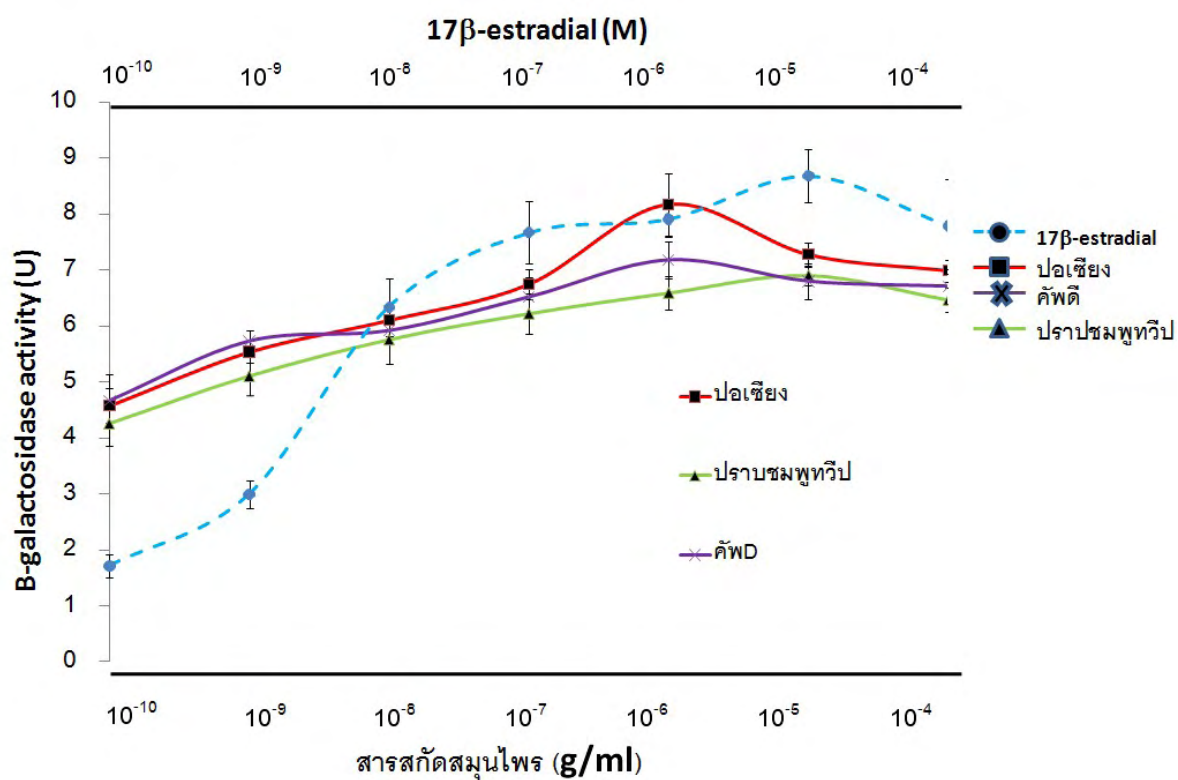
เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบของสมุนไพร 7 ชนิด คือ รากสามสิบ ว่านมหาเมฆ โกฐสอ โกฐเขมา โกฐหัวบัว ดอกคำฝอย และหัวไชเท้า พบว่าหัวไชเท้าไม่มีเอสโตรเจนแอกติวิตี สำหรับสมุนไพรอีก 6 ชนิดมีเอสโตรเจนแอกติวิตีทั้งหมด ซึ่งเรียงลำดับเอสโตรเจนแอกติวิตีจากมากไปน้อยได้ดังนี้ โกฐสอ > โกฐหัวบัว > รากสามสิบ > โกฐเขมา > ดอกคำฝอย > ว่านมหาเมฆ ข้อมูลที่น่าสนใจคือสารสกัดหยาบของโกฐสอและโกฐหัวบัวที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml มีค่าเอสโตรเจนแอกติวิตีสูงกว่าสารมาตรฐาน 17β -estradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} M ซึ่งการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเอสโตรเจนแอกติวิตีของพืชทั้งสองชนิดในประเทศไทยยังมีค่อนข้างจำกัด พืชทั้งสองชนิดจึงมีความน่าสนใจและมีศักยภาพในการใช้ทางเภสัชวิทยาต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบยาสมุนไพร 3 ตำรับที่มีสรรพคุณเกี่ยวข้องกับรักษาอาการผิดปกติของการมีประจำเดือน มดลูก และการเพิ่มขนาดทรวงอก คือ ยาสมุนไพรปอเซียง ยาสมุนไพรปราบชมพูทวีป และยาสมุนไพรคัพดี พบว่าสมุนไพรทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-4} g/ml มีเอสโตรเจนแอกติวิตีใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน 17β -estradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-8} - 10^{-4} M

จากข้อมูลข้างต้นที่แสดงถึงความสามารถของยีสต์ซูไฮบริดที่ได้ในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตี ดังนั้นระบบยีสต์ซูไฮบริดที่ได้นี้จึงมีศักยภาพในการใช้ศึกษาเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารไฟโตเอสโตรเจนจากพืชสมุนไพรหรือสารซีโนเอสโตรเจนจากสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 4-24. เปรียบเทียบเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบรากสามสิบ ว่านมหาเมฆ โกฐสอ โกฐเขมา โกฐหัวบัว และดอกคำฝอย ที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^{-4} g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด ($n=5$, $p<0.05$)



รูปที่ 4-25. เปรียบเทียบเอสโตรเจนแอกติวิตีของยาสมุนไพรปอเชียง ยาสมุนไพรปราบชมพูทวีป และยาสมุนไพรคัพดีที่ความเข้มข้น 10^{-10} – 10^{-4} g/ml ด้วยระบบยีสต์ทูไฮบริด ($n=5$, $p<0.05$)

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ยีสต์ทูไฮบริด (Estrogen receptor alpha + SRC1 coactivator) ซึ่งสามารถวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารมาตรฐาน 17 β -estradiol ได้ต่ำถึง 10^{-10} M และสามารถใช้ในการตรวจวัดเอสโตรเจนแอกติวิตีของสารสกัดหยาบของสมุนไพรได้
2. เตรียม manuscript 1 เรื่อง

เอกสารอ้างอิง

- Aldhaheeri A, Alhadrami G, Aboalnaga N, Wasfi I, Elridi M. (2004) Chemical composition of date pits and reproductive hormonal status of rats fed date pits. *Food Chemistry* 86(1), 93-97.
- Anuar N S, Zahari S S, Taib I A, Rahman M T (2008) Effect of green and ripe *Carica papaya* epicarp extracts on wound healing and during pregnancy. *Food and Chemical Toxicology* 46(7), 2384-2389.
- Barbosa N R, Pittella F, Gattaz W F. (2008) *Centella asiatica* water extract inhibits iPLA2 and cPLA2 activities in rat cerebellum. *Phytomedicine* 15(10), 896-900.
- Bramlett K S, Wu Y, Burris T P. (2001) Ligands specify coactivator (NR) box affinity for estrogen receptor subtypes. *Molecular Endocrinology* 15: 909-922.
- Brandi G, Schiavano G F, Zaffaroni N, De Marco C, Paiardini M, Cervasi B, Magnani M. (2005) Mechanisms of action and antiproliferative properties of *Brassica oleracea* juice in human breast cancer cell lines. *Journal Nutrition* 135(6), 1503-1509.
- Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. (2007) Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ER[alpha] and ER[beta]. *Maturitas* 58(2), 174-181.
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I. (2004) Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65(8), 995-1016.
- Diel P. (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicology Letters* 127(1-3), 217-224.
- Doty R L, Cameron E L. (2009) Sex differences and reproductive hormone influences on human odor perception. *Physiology and Behavior* 97(2), 213-228.
- Enmark E, Gustafsson J A. (1999) Oestrogen receptors-an overview. *Journal International Medicine* 246, 133-138.
- Hayashi T, Okamoto Y, Ueda K, Kojima N. (2006) Formation of estrogenic products from benzophenone after exposure to sunlight. *Toxicology Letters* 167, 1-7.
- Heery D M, Kalkhoven E, Hoare S, Parker M G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- Indra M, Murthy P S N, Sirsi M. (1956) Estrogenic activity, antibacterial action and some pharmacodynamic properties of *Cyperus rotundus* Linn. *Journal of the Mysore Medical Association* 21, 1.

- Jung J, Ishida K, Nishihara T. (2004) Anti-estrogenic activity of fifty chemicals evaluated by in vitro assays. *Life Sciences* 74, 3065–3074.
- Kamiya M, Toriba A, Onoda Y, Kizu R, Hayakawa K. (2005) Evaluation of estrogenic activities of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate. *Food Chemical Toxicology* 43, 1017-1027.
- Kim D S H L, Park S Y, Kim J Y. (2001) Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from [beta]A(1-42) insult. *Neuroscience Letters* 303(1), 57-61.
- Kovalchuk S N, Kozhemyako V B, Atopkina L N, Silchenko A S, Avilov S A, Kalinin V I, Rasskazov V A, Aminin D L. (2006) Estrogenic activity of triterpene glycosides in yeast two-hybrid assay. *Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 101, 226-231.
- Macgregor J I, Jordan V C. (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacology Review* 50(2), 151-196.
- Miller J, Staglilar I. (2004) Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods in Molecular Biology* 261, 247-262.
- Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, Shiraishi F, Koda T, Morita M. (2005) Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in Vitro* 19, 457-469.
- Mueller S O. (2002) Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B* 777(1-2), 155-165.
- Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dakeyama F, Matsuo M, Nishihara T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicology and applied pharmacology* 154, 76-83.
- Nomiyama K, Tanizaki T, Arizono K, Shinohara R. (2007) Endocrine effects generated by photooxidation of coplanar biphenyls in water using titanium dioxide. *Chemosphere* 66, 1138-1415.
- Okwuasaba F K, Osunkwo U A, Ekwenchi M M, Ekpenyong K I, Onwukeme K E, Olayinka A O, Uguru M O, Das S C (1991) Anticonceptive and and estrogenic effects of a seed extract of *Ricinus communis* var. minor. *Journal of Ethnopharmacology* 34, 141-145.
- Park J E, Pezzuto J M. (2002) Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews* 21(3), 231-255.

- Ramljak D, Romanczyk L J, Metheny-Barlow L J, Thompson N, Knezevic V, Galperin M, Ramesh A, Dickson R B. (2005) Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 4(4), 537-546.
- Riu A, Balaguer P, Perdu E, Pandelova M, Piccinelli R, Gustafsson J A, Leclercq C, Schramm K W, Dagnino S, Debrauwer L, Cravedi J P and Zalko D. (2008) Characterisation of bioactive compounds in infant formulas using immobilised recombinant estrogen receptor-[alpha] affinity columns. *Food and Chemical Toxicology* 46(10), 3268-3278.
- Siri S, K Incamnoi. (2008) Estrogenic activity of Wan-chak-mot-luk (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) evaluated by yeast two hybrid system. *KKU Science Journal (Supplement)* 36, 11-19.
- Sookvanichsilp N, Soonthornchareonnon N, Boonleang C. (2008) Estrogenic activity of the dichloromethane extract from *Pueraria mirifica*. *Fitoterapia* 79(7-8), 509-14.
- Tempfer C B, Bentz E K, Leodolter S, Tscherne G, Reuss F, Cross H S and Huber J C. (2007) Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. *Fertility and Sterility* 87(6), 1243-1249.
- Tham D M, Gardner C D, Haskell W L. (1998) Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83(7), 2223-2235.
- Vogel J J, Heine M J S, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO Journal* 15, 3667-3675.
- Wang C C, Prasain J K, Barnes S. (2002) Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 777, 3-28.
- Yadav R and Jain G C. (1999) Antifertility effect of aqueous extract of seeds of *Cassia fistula* in female rats. *Advances in Contraception* 15(4), 293-301.
- ชุมศักดิ์ พุกษาพงษ์. ผู้หญิงวัยทอง. นิตยสารใกล้หมอ ปีที่ 24 ฉบับที่ 5 พฤษภาคม 2543. จาก http://www.elib-online.com/doctors/senile_menopause7.html สืบค้นข้อมูลเมื่อ วันที่ 29 เมษายน 2552
- สินีนานู ศิริ และ กฤษณะ อินทร์คำน้อย. (2549) สารเอสโตรเจนจากสิ่งแวดลอม. *KKU Sci. J.* 34(2), 89-96.