โครงการย่อย D
การศึกษาสารออกฤทธิ์ของโปรตีนยับยั้งโปรตีเอส ต่อเชื้อก่อโรค และการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

D.1 การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนยับยั้งโปรตีเอสจากน้ำยางพารา (Hevea protease inhibitor, HPI)

เนื่องจาก HPI เป็นสารยับยั้งโปรตีเอสตัวใหม่ที่มีอยู่ในน้ำยางจึงจำเป็นต้องทราบข้อมูลคุณสมบัติด้านกายภาพและชีวภาพก่อน เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เหมาะสม โดยเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมน้ำยาง

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆโดยใช้ภาชนะแช่น้ำแข็งช่วยในการเก็บน้ำยาง เพื่อป้องกันการแตกของอนุภาคลูทอยด์) ไปแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (45,000g , 45 min) เพื่อแยกน้ำยางออกเป็นชั้นบนที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง ชั้นกลางหรือส่วนใสของ cytosol (C-serum) และ ชั้นก้นหลอด (bottom fraction, BF) ทำการแยกส่วนของเหลวที่เป็น C-serum และใช้ในการ purify HPI

b) การทำบริสุทธิ์ HPI

นำ C-serum ที่แยกได้จากน้ำยางสดหลังการทำ ultracentrifugation ไปตกตะกอนด้วย acetone โดยใช้ช่วง % acetone saturatuion ดังนี้ 0-50, 50-70, 70-80 และ 80-95% ตามลำดับ นำช่วงความอิ่มตัวที่ได้ PI สูงสุดไปใช้ในการเตรียม PI

c) การ assay HPI

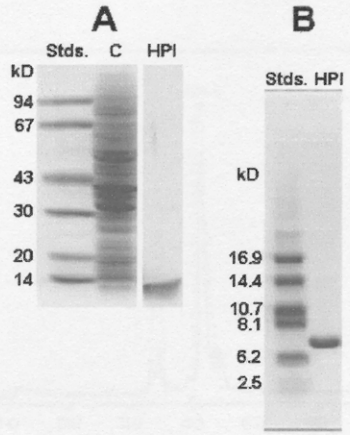
แอคติวิตีของ HPI สามารถวัดได้โดยดูจากความสามารถของ PI ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ โปรตีเอส เช่น trypsin หรือ gingipain ในการย่อย benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) ซึ่งเป็นสับเสตรทที่มีสี โดยการทำ stock solution ที่ประกอบด้วย BAPNA จำนวน 30 mg ซึ่งละลายอยู่ใน dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วไป dilute 100 เท่าด้วย 50 mM Tris-HCl pH 80.0 ก่อนใช้เป็น substrate solution นำ C-serum หรือ HPI sample ไป preincubate กับ trypsin (ปริมาตร 100 µl , 0.1 mg/ml ใน 50 mM Tris-HCl pH 7.5)ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที โดยมีปริมาตรรวม 300 µl หลังจากนั้นเริ่ม incubation ด้วยการเติม BAPNA substrate solution ปริมาตร 500 µl ที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 30% (v/v) ทำการวัดปริมาณของ p-nitoraniline ที่ถูกสลายออกมาจาก BAPNA ที่ OD 410 nm. โดย 1 unit ของ HPI activity จะเท่ากับปริมาณค่า O.D. ที่ 410 nm ที่ลดลง 0.1 หน่วย เมื่อเทียบกับ control ซึ่งมีแต่ trypsin หรือ gingipain อยู่ใน reaction mixture

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

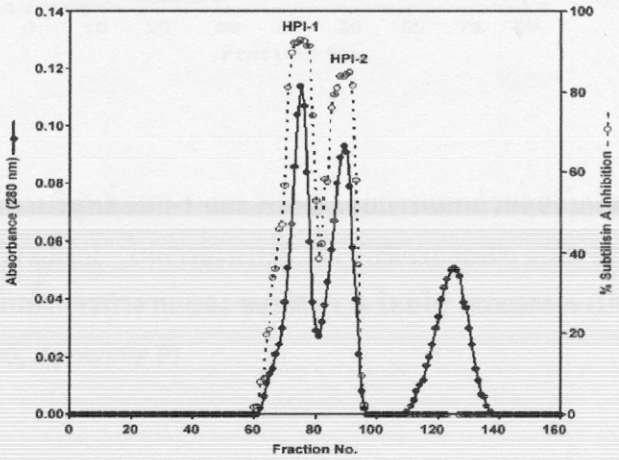
ได้ทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโน ของ protease inhibitor บริสุทธิ์ เพื่อการเปรียบเทียบกับ protease inhibitor ของพืชอื่นๆ การเตรียม protease inhibitor ให้บริสุทธิ์ อาศัยการตกตะกอน C-serum ด้วย acetone ที่ช่วงความเข้มข้นตัว 80-95% (รูปที่ D.1) แล้วนำไป purified ผ่าน คอลัมน์ Sephadex G-75 (รูปที่ D.2) ซึ่งสามารถแยกออกได้เป็น 2 isoprotease inhibitors (HPI-1 และ HPI-2) และได้นำแต่ละ isoinhibbitorไป purified ผ่าน HPLC (รูปที่ D.3) โดยสามารถแยกได้ 3 isoinhibitors คือ HPI-1 , HPI-2a และ HPI-2b หลังจากนั้นได้นำไปวิเคราะห์หาการเรียงลำดับของกรดอะมิโน พร้อมทั้งเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับพืชอื่นๆ ดังผลในรูปที่ (D.4) นอกจากนั้นยังพบว่า HPI เป็น serine protease inhibitor ที่มีประสิทธิภาพต่ำหรือประมาณ 14.47-18.15% แต่เป็นมีประสิทธิภาพสูงหรือประมาณ 57.59 % ในการยับยั้ง pronase. (รูปที่ D.5 และตาราง D. 1) ของเชื้อ *Streptomyces griseus* ซึ่งประกอบไปด้วย proteases หลายชนิดได้แก่ endopeptidases (serine และ metalloproteases), exopeptidases (carboxypeptidase และ aminopeptidase), neutral protease, chymotrypsin, trypsin, carboxypeptidase, และ aminopeptidase

ตารางที่ D.1 ระดับการออกฤทธิ์ยับยั้ง protease ชนิดต่างๆโดย HPI

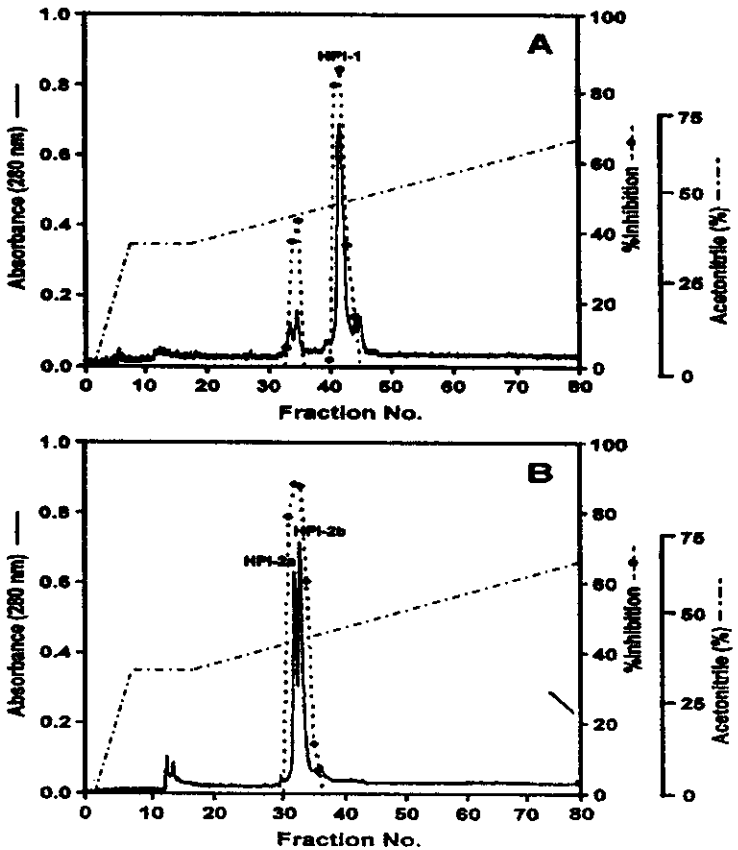
Type of Protease	Enzyme	Inhibition by HPI (%)
Serine protease	Trypsin	14.47
	Chymotrypsin	18.15
Metalloprotease	Thermolysin	4.61
Mix-proteases	Pronase	57.59
Cysteine protease	Papain	7.39
Aspartic protease (acid protease)	Pepsin	0
	Protease (Aspergillus saitoi)	0



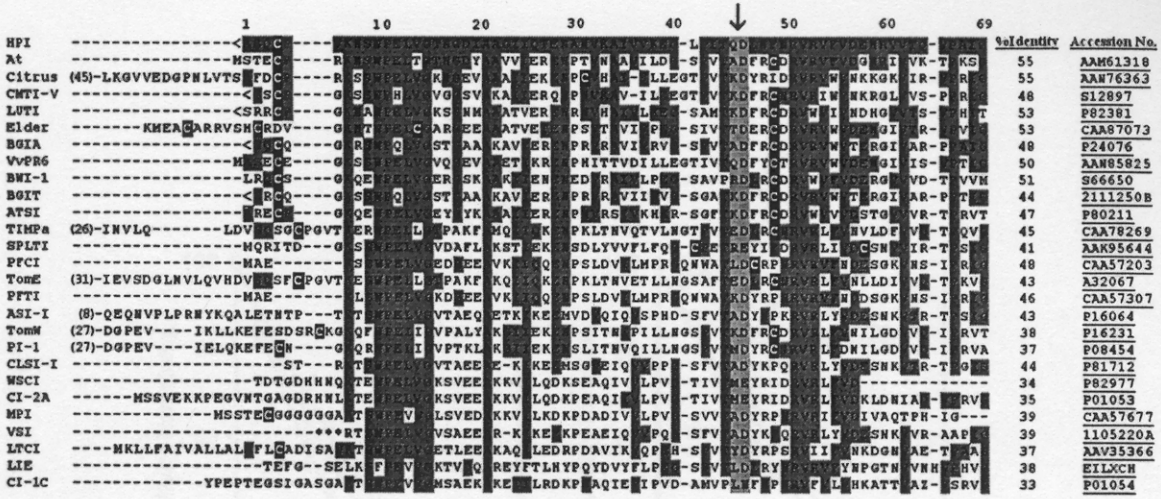
รูปที่ D.1 SDS-PAGE (A) และ Tricine SDS-PAGE (B) ของ *Hevea* protease inhibitor (HPI) ที่ ได้จากการตกตะกอน C-serum ด้วย acetone ช่วงความเข้มข้น 80-95%



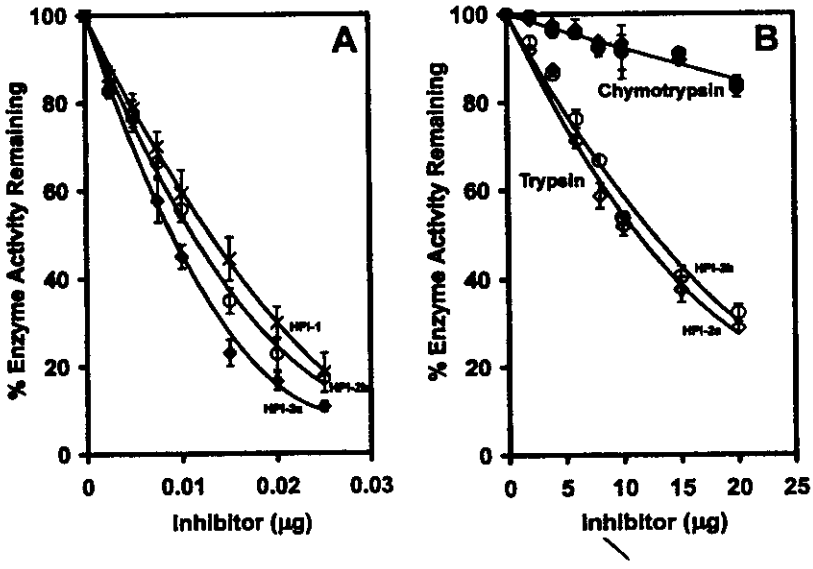
รูปที่ D.2 การนำ HPI จากรูป E.1 ไป purified ผ่าน Sephadex G-75 วิเคราะห์แอคติวิตีของ HPI จาก % การยับยั้ง subtilisin A โดยใช้ Azocasein เป็น สับสเตรท (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)



รูปที่ D.3 การทำบริสุทธิ์ HPI-1 และ HPI-2 โดยการแยกด้วยคอลัมน์ C18-HPLC โดยชะ ด้วย acetonitrile gradient ในสารละลาย 0.1% Trifluoroacetic acid แอคติวิตีของ PI ทำโดยดู การยับยั้งการทำงาน ของ subtilisin A โดยใช้ azocasein เป็นสับสเตรท (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)



รูปที่ D.4 ตารางเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง protease inhibitor จากน้ำยาง HPI) กับพืชอื่นๆ [At, *Arabidopsis thaliana*; Citrus, grapefruit flavedo (Citrus x paradise); CMTI-V, pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*); LUTI, common flax seeds (*Linum usitatissimum*); Elder (*Sambucus nigra*); BGIA and BGIT, bitter gourd seeds (*Momordica charantia*); Grapevine, Grapevine (*Vitis vinifera*); BWI-1, buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum*); ATSI, amaranth seeds (*Amaranthus caudatus*); TIMPa, tobacco (*Nicotiana tabacum*); SPLTI, Sweet potato leaves (*Ipomoea batatas*); PFCI and PFTI, pumpkin fruit (*Cucurbita maxima*); TomE, tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*); ASI-I, adzuki beans (*Vigna angularis*); TomW, tomato fruits of wild species (*Solanum peruvianum*); PI-1, potato (*Solanum tuberosum*); CLSI-I, beach canavalia seeds (*Canavalia lineate*); WSCI, bread wheat (*Triticum aestivum*); CI-2A and CI-1C, barley seeds (*Hordeum vulgare*); MPI, maize (*Zea mays*); VSI, broad bean (*Vicia faba*); LTCI, common earthworm (*Lumbricus terrestris*); LIE, eglin C from medicinal leech (*Hirudo medicinalis*)]. (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)



รูปที่ D.5 (A) Titration of the three purified isoinhibitor forms of HPI (HPI-1, HPI-2a, and HPI-2b) against subtilisin A (B) Titration of HPI-2a (◆, ◇) and HPI-2b (●, ○) with trypsin (open symbols) and chymotrypsin (closed symbols). (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)

D.2 การศึกษาคุณสมบัติของ HPI ต่อการยับยั้ง gingipain ของเชื้อ Porphyromonas gingivalis

เนื่องจากเอนไซม์ gingipains เป็น extracellular proteaseของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ทำหน้าที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อเหงือกและเป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontal disease)โดย gingipains จะทำการย่อยโปรตีนจำพวก อัลบูมิน และโกลบูลิน IgG และ IgA ในเลือดโดยที่ทำหน้าที่หล่อเลี้ยงเหงือก และเป็นภูมิคุ้มกันให้กับเหงือกตามลำดับ ปัจจุบันพบว่าสุขภาพในช่องปากคนไทยเป็นปัญหาระดับชาติปัญหาหนึ่ง เนื่องจากประชาชนขาดความรู้ ความเข้าใจและการดูแลเอาใจใส่ที่ดีพอ จึงกลายเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดผลเสียทางเศรษฐกิจอื่นๆตามมา ประชากรทางภาคใต้ของไทยในจังหวัดสงขลา มีความเสี่ยงต่อสภาวะโรคปริทันต์ในระดับสูง โดยพบว่าร้อยละ 84-93 มีสภาวะโรคปริทันต์อักเสบเล็กน้อยถึงปานกลาง และ ร้อยละ 10-30 มีสภาวะโรคระดับรุนแรง

เอนไซม์ gingipains ประกอบด้วย Arg-gingipain (Rgp) and Lys-gingipain (Kgp) จัดอยู่ในกลุ่ม cysteine proteases ที่มีกิจกรรมประเภท "trypsin-like" จากตารางที่ E.1 จะเห็นว่า HPI สามารถยับยั้ง protease ทั้งชนิด trypsin และ cysteine proteases ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะประเมินความสามารถในการยับยั้ง gingipains ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมเชื้อ *P. gingivalis*

ทำการเลี้ยงเชื้อ *P. gingivalis* W50 และ P. gingivalis ATTC 33277 ในอาหาร brain heart infusion broth (BHI) ที่เสริมด้วย yeast extract, hemin และ vitamin k แล้วนำไปเลี้ยงภายใต้บรรยากาศ H_2 10%, CO_2 10% และ N_2 80% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน

b) การสกัดเอนไซม์ gingipain ของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis*

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. gingivalis* ที่มีอายุ 3 วัน ทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้และนำไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้น 60% จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บตะกอนที่ได้ที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที ตะกอนที่ได้จะถูกนำมาเป่าเพื่อไล่อะซิโตนออกด้วยแก๊สไนโตรเจนจากนั้นนำมาละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 7.4 และนำไปไดอะไลซ์ใน50 mM Tris-HCl pH 7.4 นาน 24 ชั่วโมงที่ 4 °C จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้นโดยอาศัย CM cellulose ดูดน้ำออกจาก dialysis bag ทำการกำจัดส่วนที่ไม่ละลายออกโดยนำไปหมุนเหวี่ยง และเก็บสารละลายโปรตีน (crude gingipain)ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

c) การทดสอบการยับยั้ง gingipain ด้วย HPI

แอคติวิตีของตัวยับยั้ง gingipain สามารถวัดได้โดยดูความสามารถในการลดความสามารถของ Arg-gingipain ต่อการย่อย สับเสตรท benzoyl-Arg-p-nitroanilide (BAPNA) (0.5 mM) ซึ่งละลายอยู่ในบัปเฟอร์ 100 mM Tris-HCl, pH7.4 ที่ประกอบด้วย 1 mM $CaCl_2$,

50 mM L-Cysteineและ Lys-gingipain ต่อการย่อยสับเสตรท N-p-tosyl-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide (Lys-pNA) (0.5 mM) ซึ่งละลายอยู่ใน 100 mM Tris-HCl , pH 8.0 ที่ประกอบด้วย 5mM L-Cysteine

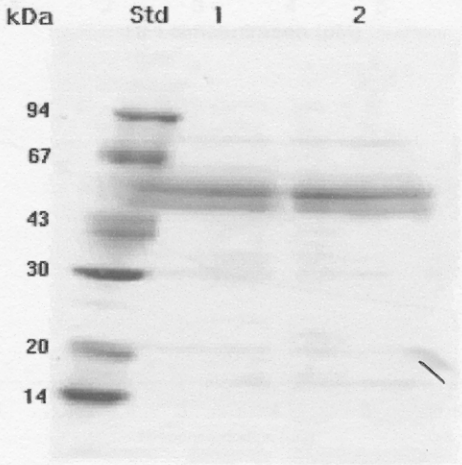
นำ HPI ที่ได้จากการตกอะซิโตน C-serum ในช่วงความเข้มข้น 80-95% มาทำการเจือจางแบบลำดับสอง (2-fold serial dilution)และนำไปบ่มกับ crude gingipain เชื้อที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติมสับสเตรทลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 30%(v/v) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น410 นาโนเมตร กำหนดให้ความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิตเท่ากับ 1 ไมโครโมลของ *p*-nitroanilide ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายสับสเตรทเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหาค่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์จินจิเปนที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

การศึกษาผลการยับยั้งของตัวยับยั้งอื่นๆ คือ 0.1mM *p*-chloromercuribenzoic acid, 0.1mM N-Ethylmaleimide, 0.5 mM Leupeptin, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM Iodoacetamide และ 0.01g/ml Trypsin inhibitor from soybean ทำโดยนำตัวยับยั้งที่ต้องการทดสอบมาทำการเจือจางแบบลำดับสองและบ่มกับ gingipain เพื่อหาค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ดังวิธีการที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

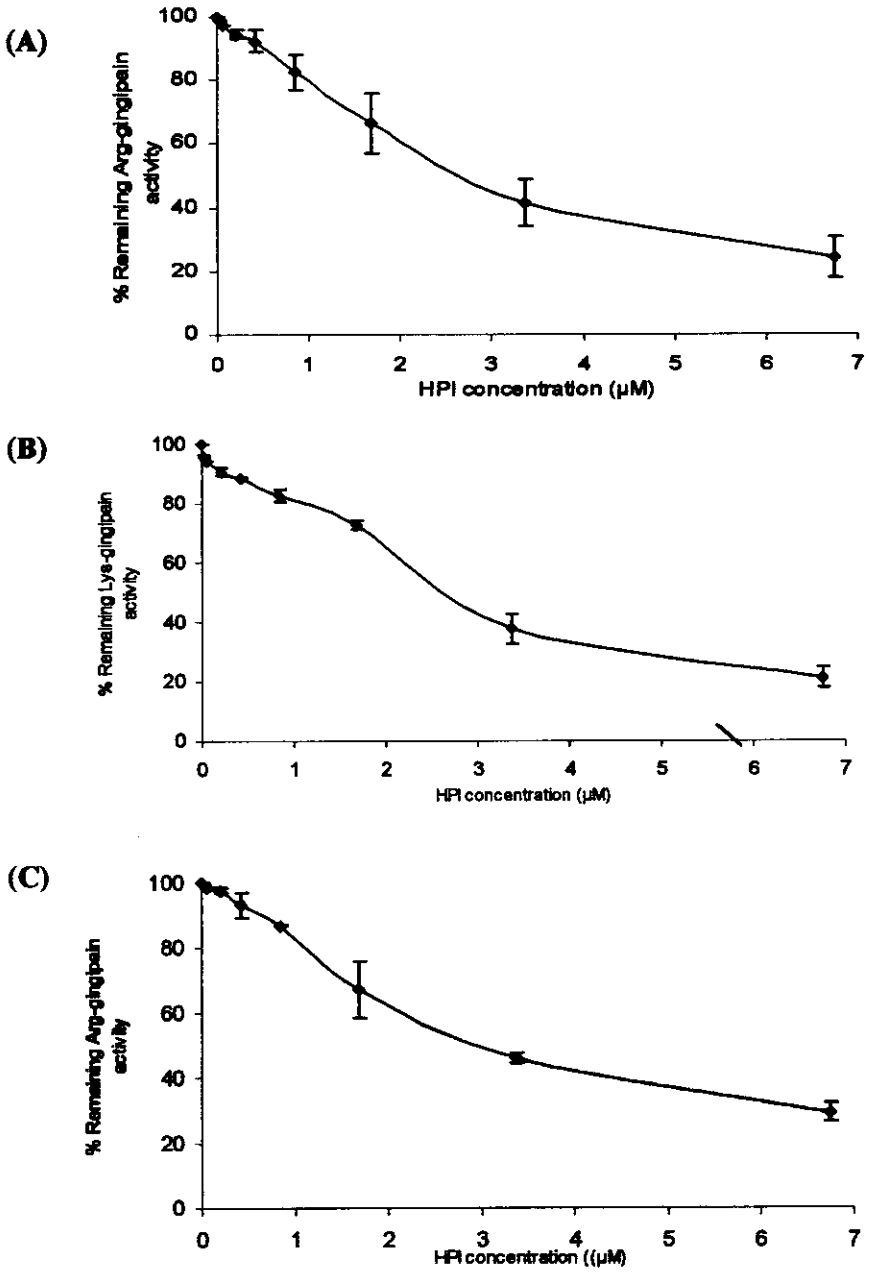
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการการสกัด crude protease (gingipain) จากส่วนของน้ำเลี้ยงที่ใช้เลี้ยง เชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งในสภาพที่เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontal disease) gingipain จะที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อเหงือก โดยนำน้ำเลี้ยงไปตกตะกอนด้วย acetone ที่ความเข้มข้น 60% แล้วนำตะกอนโปรตีนไปวิเคราะห์โดยการทำ SDS-PAGE จะเห็นแถบโปรตีนหลักช่วงที่ตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของ gingipain ประมาณ 44 -51 kD (รูปที่ D.6) เมื่อนำ HPI ไปยับยั้ง arg- และ lys-gingipain ใน crude gingipain ที่เตรียมได้ พบว่าสามารถยับยั้งได้ โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งขึ้นตรงกับปริมาณ protease inhibitor (รูปที่ D.7) โดยค่า specific inhibition หรือ IC_{50} ต่อ Arg- และ Lys-gingipain ของเชื้อ *P. gingivalis* 33277 เท่ากับ 1.387 – 2.663±0.548 µM และ 1.279 – 2.458±0.06 µM ตามลำดับ และโดยค่า IC_{50} ต่อ Arg-gingipain ของเชื้อ *P.gingivalis* W50 เท่ากับ 1.478 – 2.838±0.37 µM แต่ไม่พบค่าแอคติวิตี lys-gingipain ของ *P.gingivalis* W50 (ตารางที่ D.1) จากรายงานผลการวิจัย leupeptin เป็น cysteine proteinase inhibitor ที่ได้มาจากเชื้อ Actinomycetes สามารถออกฤทธิ์จัดยับยั้งโปรตีเอสที่จำเพาะกับ arg-gingipain ซึ่งสามารถยับยั้งการสลาย collagen โดย *P. gingivalis* ได้เกือบหมด การที่ HPI สามารถยับยั้ง arg-gingipain ได้ใกล้เคียงกับ leupeptin (ตารางที่ D.2, D.3) แสดงว่า HPI มีศักยภาพสำหรับใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคปริทันต์อักเสบได้ดีพอๆกับ leupeptin โดยอาจใช้เสริมหรือแทนยาปฏิชีวนะ tetracycline, doxycline และ chlorhexidine ซึ่งเป็นตัวยาที่ทำหน้าที่ยับยั้ง collagenase activity ของ arg-gingipain

ซึ่งยาปฏิชีวนะดังกล่าวมักส่งผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ โดยทำให้สีเนื้อฟันหม่น เกิดอาการแสบบริเวณเยื่อบุช่องปาก หรือ บางครั้งก็ส่งอิทธิพลต่อการแปรเปลี่ยนประสาทรับรสอาหารด้วย นอกจากนั้นจะทำให้เชื้อรา *Candida albicans* ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณลิ้น เจริญเติบโตได้รวดเร็วยิ่งขึ้น และทำให้เกิดโรคติดเชื้อ candidiasis ในช่องปาก (oral candidiasis) ซึ่งพบว่าคนไทยมีความชุกของโรคนี้ ร้อยละ 10



รูปที่ D.6 SDS-PAGE ของโปรตีนพบหลังการนำส่วนของน้ำเลี้ยงของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* มาตกตะกอนด้วย acetone ที่ความอิ่มตัว 60%



รูปที่ D.7 กราฟการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Arg และ Lys-gingipain ด้วย HPI

A-B = การยับยั้งกิจกรรมของ Arg- และ Lys-gingipain ของเชื้อ *P. gingivalis* 33277

C = การยับยั้งกิจกรรม Arg-gingipain ที่แยกจากเชื้อ *P. gingivalis* w50

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ตารางที่ D.2 แสดงค่าการยับยั้งแอคติวิตีที่ร้อยละ 50 ของ arg- และ lys-gingipain โดย HPI

Microorganism	50% Inhibitory concentration (IC_{50})	
	BAPNA hydrolysis (arg-gingipain)	Z-lys-*P*NA hydrolysis (Lys-gingipain)
P.gingivalis ATCC 33277 Crude gingipain + HPI	1.387 – 2.663±0.548 μM	1.279 – 2.458±0.06 μM
P.gingivalis W50 Crude gingipain + HPI	1.478 – 2.838±0.37 μM	*

* no detectable enzyme activity

ตารางที่ D.3 ค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ของตัวยับยั้งต่างๆต่อเอนไซม์ gingipain

Inhibitor	IC_{50}
p-Chloromercuribenzoic acid	1.52 ±0.375 mM
N-ethylmaleimide	5.59 ±0.296 mM
Iodoacetamide	3.24 ±0.0035 mM
EDTA	1.12 ±0.311 mM
Leupeptin	1.43 ±0.216 μM
Trypsin inhibitor from soybean	44.75 ±7.53 μM
HPI	2.912– 5.59 ±0.296 μM

D.3 การศึกษาคุณสมบัติของ HPI ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ hepatitis B virus (HBV)

เนื่องจากเอนไซม์ protease NS3 เป็น chymotrypsin-like serine protease ที่จำเป็นสำหรับ proliferation หรือ replication cycle ของ HBV และ HPI จากน้ำยางพารามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง chymotypsin (ตารางที่ D.1 และรูปที่ D.5) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะประเมินฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้ง HBV

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ PLC/PRF/5

สารเลี้ยงประกอบด้วย MEM (EBSS) + 10% FBS + 2mM L-Glutamine + 1% non-essential amino acids ทำการเลี้ยงที่ 37 $^{\circ}$C ภายใต้ 5% CO_2

b) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง HBsAg

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง HBsAg: ทำโดยเตรียมเซลล์ PLC/PRF/5 ที่ความหนาแน่น 10^5 cell/ ml ใน 24 well plate หลุมละ 1 ml บ่ม 37 $^{\circ}$C , 24 ชม. , ดูด supernatant ทิ้ง และเติม 1 ml HPI (5.24 mg/ml) ที่ละลายใน 2% MEM โดยมีสัดส่วนการเจือจาง 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1: 320, 1:640, 1:1280, และ 1:2560 ตามลำดับ บ่ม 37 $^{\circ}$C , 24 ชม. แล้วนำ supernatant มาวัด OD 450 เพื่อหาปริมาณ HBsAg ที่ลดลง เทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงใน 2% MEM โดยไม่มี HPI

การวิเคราะห์ปริมาณ HBsAg ใช้ชุดทดสอบ Monolisa Ag-HBs Plus ของDiagnostics Pasteur (France) โดยนำ ELISA plate ที่เคลือบด้วย anti-HBsAg monoclonal antibodies ซึ่งมี 3 ชนิด เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหา HBsAg ลงในหลุม แล้วบ่มที่ 37° C เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง HBsAg และ anti-HBsAg ทำการล้าง plate ด้วยน้ำกลั่นทั้งนี้เพื่อขจัดแอนติเจนที่เหลือ เติม anti-HBsAg monoclonal antibodies peroxidase conjugateซึ่งมี 2 ชนิด และต่างจาก 3 ชนิดแรกลงในหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการล้าง plate ด้วย (Tris/NaCl, pH 7.4) จากนั้นเติมสารละลายที่เป็น developer (hydrogen peroxide และ O-phenylenediamine dihydrochloride) ลงไป แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาไม่เกิน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 2 M หลุมละ 50 µl จากนั้นประเมินปริมาณ HBsAg โดยอ่านค่าความเข้มข้นสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น(ค่าO.D)ในแต่ละหลุมของ ELISA plate ที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับค่า O.D. ที่ได้จาก มาตราฐาน HBsAg ที่ใช้เป็น positive control

c) การทดสอบฤทธิ์ anti-proliferation ของ HPI ที่มีต่อ PLC/PRF/5

การทดสอบฤทธิ์ anti-proliferation ทำโดยการวัดปริมาณ cell proliferation และ cell viability โดยดูการ cleavage ของเกลือ tetrazolium WST-1 เปลี่ยนเป็น fromazan (สีดำแดง) โดยอาศัยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ใน viable cells โดย เตรียมเซลล์

PLC/PRF/5 ที่ความหนาแน่น 10^5 cell/ml ใน 96 well plate หลุมละ 100 µl บ่ม 37 °C , 24 ชม., ดูด supernatant ทิ้ง และเติม 100 µl HPIที่ละลายใน 2% MEM โดยมีสัดส่วนการเจือจาง 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1: 320, 1:640, 1:1280, และ 1:2560 ตามลำดับ บ่ม 37 °C , 24 ชม., เติม WST-1 10 µl ทุกหลุม บ่ม 4 ชม. 37 °C ทำการเขย่า 1 นาที แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 nm

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากผลการวิจัยซึ่งได้นำ HPI กึ่งบริสุทธิ์ ที่เตรียมได้จากการนำ C-serum โดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วงความอิ่มตัว 80-95% ไปทดสอบดูฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง HBsAg (ตารางที่ D.4, รูปที่ D.8) จากการวัดหา hepatitis B antigen ด้วยวิธี Monolisa Ag HBs พบว่า HPI สามารถยับยั้งการสร้าง HBsAg ของเซลล์ PLC/PRF/5 โดยค่า IC_{50} คิดเป็น dilution ratio ประมาณ 1:74 หรือ ความเข้มข้น HPI ประมาณ 70 µg/ml (9.3 µM) นอกจากนั้นเมื่อนำ HPI ไปทดสอบดูฤทธิ์ anti-proliferation ที่มีต่อ PLC/PRF/5 พบว่า HPI จากน้ำยางมีฤทธิ์ anti-proliferation โดยค่า IC_{50} คิดเป็นสัดส่วนการเจือจาง 1: 36 หรือ ความเข้มข้น 145.36 µg/ml (19 µM) (ตารางที่ D.5 , รูปที่ D.9)

ตารางที่ D.4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งปริมาณการผลิต HBsAg ที่สัดส่วนการเจือจางต่างๆ ของสารละลาย HPI ของเซลล์ PLC/PRF/5

Dilution ratio 1:	Assay			%Inhibition
	No. 1 (OD_{450})	No.2 (OD_{450})	Average(OD_{450})	
2560	3.85	3.859	3.855	3.64
1280	4	3.972	3.986	0.35
640	3.866	4	3.933	1.68
320	3.156	4	3.578	10.55
160	2.807	2.977	2.892	27.70
80	2.203	2.76	2.482	37.96
40	1.4	1.311	1.356	66.11
20	0.869	0.845	0.857	78.58
10	0.778	0.188	0.483	87.93
5	1.295	1.011	1.153	71.18
Control Test	4.00			

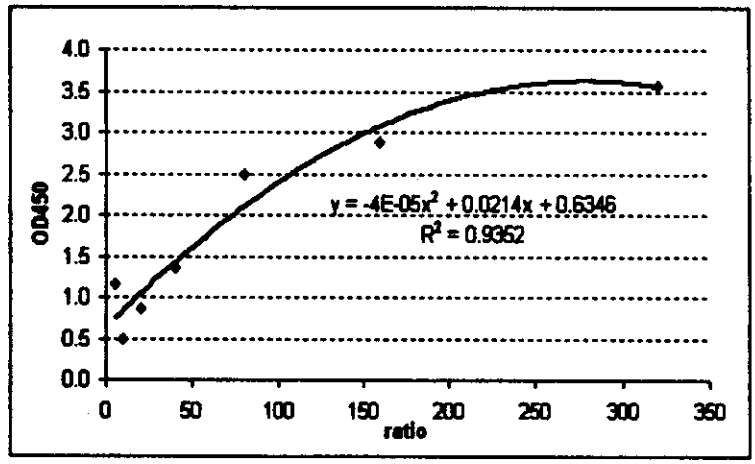
จากความสำเร็จที่สามารถใช้ aspartic protease inhibitor ในการกำจัด HIV ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นในทำนองเดียวกันเราก็น่าจะสามารถใช้ HPI ในการกำจัด HBV ได้เช่นกัน โดยอาจใช้ใช้เป็นยาสมุนไพรกินป้องกันหรือยับยั้งการรุกรานของ HBV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ นอกจากนั้นยังสามารถใช้ HPI ทำลาย HBV ออกจากภาชนะที่สัมผัสกับผู้ป่วย เพื่อป้องกันการติดต่อของโรคได้อีกด้วย

ตารางที่ D. 5 Anti-proliferation activity ต่อเซลล์ PLC/PRF/5 ที่สัดส่วนการเจือจางต่างๆ ของสารละลาย HPI*

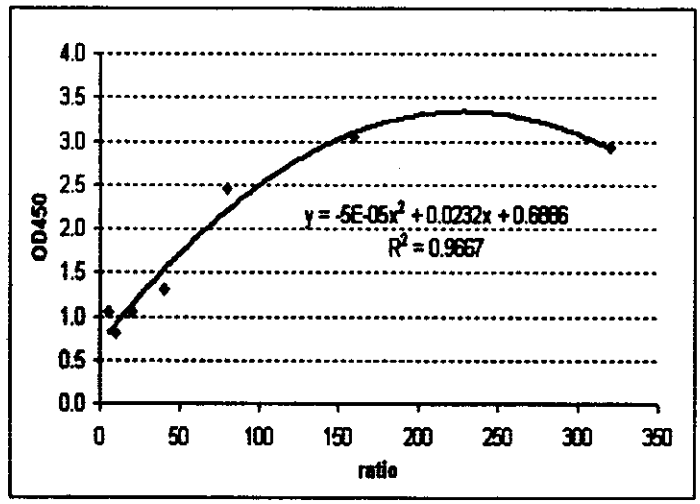
%Proliferation of PLC/PRF/5*

5	64.358
10	72.500
20	63.733
40	55.454
80	16.096
160	-4.144
320	-0.043
640	-0.788
1280	-6.147
2560	-0.094

5	0.617	0.633	0.677	0.677	0.651	0.031
10	0.496	0.576	0.517	0.517	0.527	0.034
20	0.463	0.478	0.462	0.462	0.466	0.008
40	1.174	1.507	1.616	1.616	1.478	0.209
80	2.107	2.294	2.526	2.526	2.363	0.203
160	2.031	2.427	2.376	2.376	2.303	0.183
320	1.950	2.232	2.281	2.242	2.176	0.152
640	2.294	2.316	2.417	2.325	2.338	0.054
1280	2.157	1.929	2.343	2.438	2.217	0.225
2560	2.118	2.362	2.344	2.316	2.285	0.113
control	2.040					



รูปที่ D.8 Monolisa Ag HBs Assay :กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD450 สัดส่วนการเจือจางสารละลาย HPI



รูปที่ D.9 Anti-proliferation assay: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD450 สัดส่วนการเจือจางสารละลาย HPI

D.4 การศึกษาคุณสมบัติของ HPI ต่อการเสริมฤทธิ์ heveinในการยับยั้งแคนดิด้า

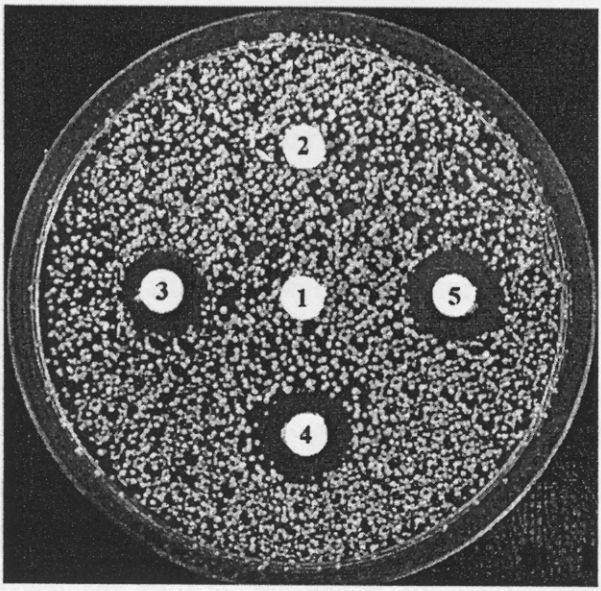
เนื่องจาก HPI ไม่สามารถยับยั้ง aspartic protease (ตารางที่ D.1) ซึ่งเป็น extracellular protease ของแคนดิด้า แต่ HPI สามารถยับยั้ง pronase ซึ่งประกอบไปด้วย proteases หลายชนิดได้แก่ endopeptidases (serine และ metalloproteases), exopeptidases (carboxypeptidase และ aminopeptidase), neutral protease, chymotrypsin, trypsin, carboxypeptidase และ aminopeptidase เนื่องจาก aminopeptidase ก็เป็นหนึ่งใน intracellular protease ของแคนดิด้า โดยเมื่อแคนดิด้าตายลง aminopeptidase ก็จะมีโอกาสย่อยหรือทำลายฤทธิ์ของ hevein ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะประเมินการเสริมฤทธิ์ของ hevein โดย HPI

อุปกรณ์และวิธีการ

รายละเอียดวิธีการเลี้ยงแคนดิด้าเหมือนในโครงการย่อย 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากผลที่ได้ พบว่า HPI สามารถไปเสริมฤทธิ์ anti-candida ของ hevein (รูปที่ D.10) ดังนั้น HPI อาจทำหน้าที่ยับยั้ง intracellular proteases ของเชื้อแคนดิด้า ช่วยป้องกันไม่ให้ hevein ถูกทำลาย ทำให้ hevein สามารถออกฤทธิ์ได้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ถึงแม้ว่า hevein เป็นสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งไม่สามารถประยุกต์ใช้ในการรักษาทางการแพทย์ แต่ข้อมูลที่ได้นี้ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ HPI เสริมฤทธิ์ยา anti-candida ประเภทเบปไทด์อื่นๆได้ เช่น histatin



รูปที่ D.10 การเสริมฤทธิ์ anti-candida ของ hevein โดย HPI สารตัวอย่างใน dics 1 ประกอบด้วย 40 µl ของ Tris-HCl buffer; disc 2 ประกอบด้วย 400 µg ของ HPI; disc 3, 40 µg ของ hevein; disc 4-5, 40 µg ของ hevein ผสมกับ 200 และ 400 µg ของ HPI ตามลำดับ (Kanokwiroon et al, 2008, Appendix 7)